

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
QUÍMICA DE MINAS GERAIS**

**Caracterização Termodinâmica e Estrutural de Sistemas Supramoleculares Envolvendo
Pentoxifilina e Ciclodextrinas**

Charles Augusto Santos Morais

Itajubá, Junho de 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
QUÍMICA DE MINAS GERAIS**

Charles Augusto Santos Morais

**Caracterização Termodinâmica e Estrutural de Sistemas Supramoleculares Envolvendo
Pentoxifilina e Ciclodextrinas**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Química de Minas
Gerais como parte dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Química.**

Área de Concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa

**Junho de 2016
Itajubá**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela força dada em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais, Éder e Ana, que amo e me ensinam com sabedoria e simplicidade a amar a vida e o próximo.

À minha irmã, Sara, pelo carinho fraterno.

À toda minha família, base do que hoje sou.

Ao meu orientador, professor Frederico, pela paciência, disponibilidade e por todo o aprendizado no decorrer dessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório, Francieli, Maria Cecília, Larissa, André, Rafael, Clara, Angélica e Laura por todas as vezes que se fizeram prestativos e por todos os momentos de alegria vividos.

Aos colegas da UNIFEI, Christina, Selma, Djovani, Bruna e Lucas, pelos trabalhos em conjunto e pelos cafés animados na cozinha do Biomateriais.

Ao professor Maurício dos Santos pelo auxílio, aprendizado e paciência durante a realização das sínteses.

Ao professor Éder Tavares que me salvou durante várias vezes em que tive de ficar em Itajubá e, também, pelo apoio científico.

Às colegas do Instituto Federal, Andressa e Priscila, pela disponibilidade na mudança dos meus horários no trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas – Pouso Alegre, pela cessão de tempo para que eu pudesse realizar essa pós-graduação.

Ao CNPq, Capes e Fapemig pelo fomento às nossas pesquisas, à Rede Mineira de Química e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais que possibilitaram a implementação e oportunidade do curso por mim realizado.

Resumo

A Pentoxifilina é um medicamento há muito tempo utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares, especificamente a aterosclerose. Ciclodextrinas são compostos constituídos por monômeros de glicose e possuem conformação cíclica, podendo abrigar moléculas em sua cavidade interna hidrofóbica, modificando as suas características físico-químicas. Até o presente momento, segundo nossa pesquisa e conhecimento, não há registros na literatura de estudos sobre a inclusão da Pentoxifilina em ciclodextrinas. O presente trabalho avaliou a interação no estado sólido e em solução entre ciclodextrinas (α e β -CD) e a molécula Pentoxifilina, caracterizando os sistemas de forma estrutural e termodinâmica. Para isso foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de RMN, FT-IR e UV-Vis, além da análise termodinâmica por ITC, permitindo inferir sobre a topologia, a estequiometria e os parâmetros termodinâmicos dos sistemas.

Os resultados obtidos pelo RMN e FT-IR indicam a existência, em solução, de duas formas de complexo entre a β -CD e a Pentoxifilina, uma envolvendo a parte alifática desta molécula e outra a estrutura dos anéis. Os sinais de correlação no ROESY referentes aos hidrogênios das estruturas cíclicas, ou próximos a estas, foram mais evidentes, pelo que são fortes indícios de que a inclusão nos anéis seja a mais estável. Corrobora com isso os resultados do ITC: a 25 °C a estequiometria encontrada foi de 1:1, a 15 °C foi verificado 2:1 (β -CD:Pentoxi), de modo que uma temperatura menor possibilita as interações mais fracas na cadeia alifática devido a diminuição da energia cinética das moléculas. O ITC também mostrou que esse sistema é regido pela entropia e que o processo de inclusão ocorre de forma espontânea, mesmo possuindo uma constante de associação baixa. As titulações no UV-Vis, realizadas em temperatura ambiente e expressas graficamente, geraram uma inflexão próxima da estequiometria 1:1 e no RMN de hidrogênio houve consideráveis variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos anéis e nos localizados na parte média da cadeia alifática quando comparados antes e depois da inclusão. Houve deslocamentos na absorção na região do infravermelho dos principais bandas da β -CD e Pentoxifilina quando estas foram avaliadas na forma livre e no composto de inclusão obtido por liofilização, indicando que o procedimento foi eficaz e que existem interferências nas duas moléculas e nas duas extremidades da Pentoxifilina.

No sistema α -CD/Pentoxi, os estudos com titulação no FT-IR não mostraram grandes interferências nas absorções das duas moléculas pela variação da razão molar. No ITC foi verificada uma menor constante de associação quando comparado ao sistema β -CD/Pentoxi e,

mesmo com uma liberação de calor mais expressiva, a formação do complexo não é favorecida por fatores entrópicos. Também foi obtida uma estequiometria 1:1.

Abstract

Pentoxifylline is a drug used for treatment of cardiovascular diseases for a long time, acting specifically on atherosclerosis. Cyclodextrins are compounds constituted by glucose units, getting a cyclic conformation that can interact with another molecules in the hydrophobic hollow, modifying the physicochemical properties of those. Until now, based on our research and knowledge, there is no reference in the literature of inclusion compounds involving Pentoxifylline and cyclodextrins. The present study evaluates the interaction between cyclodextrins and Pentoxifylline in solution and solid state, characterizing the systems structurally and thermodynamically. The spectroscopic techniques NMR, FT-IR and UV-Vis, besides the thermodynamic analyses by ITC were utilized to determine the topology, stoichiometry and thermodynamic characteristics of the systems.

The results obtained by NMR and FT-IR show that in solution there are two forms of complexes between β -CD and Pentoxifylline, one involving the aliphatic part of the molecule and another the structure of rings. The ROESY's correlation signals of hydrogens belonging to rings, or near to that, were more evident, indicating a stable association in this portion. Corroborating these results the ITC: in 25 °C a stoichiometry 1:1 was found, in 15 °C was verified 2:1 (β -CD/Pentoxi), so that a lower temperature allows the stability of weak interactions in the aliphatic chain because the kinetic energy of the molecules is less. The ITC also shows that the system is governed by entropy and the process of inclusion occurs spontaneously even with a small association constant. The titrations in the UV-Vis were made in the ambient temperature and the graphics showed one inflexion near of 1:1 stoichiometry, the NMR of hydrogen presented considerable variations on the chemical shifts of ring's hydrogens and located in the middle portion of aliphatic chain when compared before and after inclusion. There was displacement in the infrared absorption of some major signals of β -CD and Pentoxifylline when compared the free molecules and inclusion compound obtained by lyophilization, indicating the efficiency of this method, the interference in both molecules and the association in two extremities of Pentoxifylline.

In the α -CD/Pentoxi system, the study of titration analyzed by FT-IR does not demonstrate considerable interferences on the absorption of both molecules when the molar ratio ranges. The ITC experiment verified a smaller association constant when compared with β -CD/Pentoxi and, even with a expressive heat liberation, the complex formation is not favorable because of entropic factors. The stoichiometry obtained was also 1:1.

Índice de Figuras

<i>Capítulo 1: Introdução</i>	14
Figura 1.1 - Alguns exemplos de sistemas supramoleculares biológicos: a) complexo enzima-substrato; b) dupla fita de DNA e c) bicamada lipídica	16
Figura 1.2 - Representação estrutural das principais ciclodextrinas naturais obtidas pela hidrólise enzimática do amido.....	17
Figura 1.3 - Fatores, em respectivas proporções, associados ao processo de inclusão.....	23
Figura 1.4 - Representação dos tipos de sistemas supramoleculares frequentemente observados.....	24
Figura 1.5 - Prevalência de causas de mortes prematuras registradas no Brasil estratificada por gênero no ano de 2011	25
Figura 1.6 - Fórmula estrutural da Pentoxifilina.....	26
Figura 1.7 - Representação de duas artérias. a) Artéria normal com fluxo sanguíneo sadio; b) Artéria com placa aterosclerótica e fluxo sanguíneo prejudicado. (Adaptado de http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis).....	27
<i>Capítulo 2: Material e Métodos</i>	30
Figura 2.1 - Fórmula estrutural de β -ciclodextrina.....	31
Figura 2.2 - Fórmula estrutural da α -ciclodextrina.....	32
Figura 2.3 - Fórmula estrutural da Pentoxifilina.....	32
Figura 2.4 - O processo de excitação eletrônica.....	34
Figura 2.5 - Esquema da trajetória da radiação no acessório HATR.....	35
Figura 2.6 - Sigmóide resultante da variação de entalpia (ΔH) por razão molar (n) de duas espécies, obtido numa titulação calorimétrica.....	38
Figura 2.7 - Exemplo de subtração do espectro da água do espectro da Pentoxifilina em solução 100 mmol.L^{-1}	40
Figura 2.8 - Esquema da titulação realizada no FT-IR.....	41
Figura 2.9 - Esquema da titulação realizada no UV-Vis.....	43
<i>Capítulo 3: Resultados e Discussão</i>	46
Figura 3.1 - Representação estrutural das moléculas estudadas com códigos representativos para os átomos. a) monômero de ciclodextrina; b) Pentoxifilina.....	47

Figura 3.2 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina e composto de inclusão obtidos pelo módulo HATR, região entre 4000 e 650 cm^{-1}	49
Figura 3.3 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina e composto de inclusão obtidos pelo módulo HATR, região entre 3750 e 2750 cm^{-1}	50
Figura 3.4 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina e composto de inclusão obtidos pelo módulo HATR, região entre 2000 e 1000 cm^{-1}	51
Figura 3.5 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina, composto de inclusão 1:1 e mistura mecânica 1:1.....	52
Figura 3.6 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina, composto de inclusão 2:1 e mistura mecânica 2:1.....	53
Figura 3.7 - Perfil da absorção em 1032 cm^{-1} da β -CD. $P_{\text{em}\beta\text{CD}}$ =Titulação de solução de Pentoxifilina em solução de β -CD . $A_{\text{em}\beta\text{CD}}$ =Titulação de água em solução de β -CD...	55
Figura 3.8 - Perfil da absorção em 1699 cm^{-1} da Pentoxifilina. $P_{\text{em}\text{Água}}$ = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. $P_{\text{em}\beta\text{CD}}$ = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de β -CD.....	56
Figura 3.9 - Perfil da absorção em 1638 cm^{-1} da Pentoxifilina. $P_{\text{em}\text{Água}}$ = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. $P_{\text{em}\beta\text{CD}}$ = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de β -CD.....	56
Figura 3.10 - Perfil da absorção em 1032 cm^{-1} da α -CD. $P_{\text{em}\alpha\text{CD}}$ = Titulação de solução de Pentoxifilina em solução de α -CD . $A_{\text{em}\alpha\text{CD}}$ = Titulação de água em solução de α -CD..	58
Figura 3.11 - Perfil da absorção em 1699 cm^{-1} da Pentoxifilina. $P_{\text{em}\text{Água}}$ = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. $P_{\text{em}\alpha\text{CD}}$ = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de α -CD.....	59
Figura 3.12 - Perfil da absorção em 1638 cm^{-1} da Pentoxifilina. $P_{\text{em}\text{Água}}$ = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. $P_{\text{em}\alpha\text{CD}}$ = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de α -CD.....	59
Figura 3.13 - Espectro no Ultravioleta-Visível da Pentoxifilina obtido numa concentração $3,0 \times 10^{-5}$ M.....	60
Figura 3.14 - Perfil da absorção da Pentoxifilina em 275 nm. $A_{\text{em}\text{Pent}}$ = Titulação de água em solução de Pentoxifilina. $\beta\text{CD}_{\text{em}\text{Pent}}$ = Titulação de solução de β -CD em solução de Pentoxifilina.....	62
Figura 3.15 - Perfil da absorção da Pentoxifilina em 208 nm. $A_{\text{em}\text{Pent}}$ = Titulação de água	

em solução de Pentoxifilina. β CDemPent = Titulação de solução de β -CD em solução de Pentoxifilina.....	62
Figura 3.16 - Diferença nos valores de absorção da molécula Pentoxifilina [(Absorbância da solução Pentoxifilina + β -ciclodextrina) – (Absorbância da solução Pentoxifilina)] para 208 e 275 nm.....	63
Figura 3.17 - Espectros de soluções Pentoxifilina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs..	64
Figura 3.18 - Expansão dos espectros de soluções Pentoxifilina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs.....	64
Figura 3.19 - Espectros de soluções Pentoxifilina e β -CD, ambas $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes pHs.....	65
Figura 3.20 - Expansão dos espectros de soluções Pentoxifilina e β -CD, ambas $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes pHs.....	66
Figura 3.21 - Espectro de RMN de ^1H da β -ciclodextrina a 600 MHz.....	67
Figura 3.22 - Espectro de RMN de ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz.....	68
Figura 3.23 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz, entre 1,40 e 2,65 ppm.....	69
Figura 3.24 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz, entre 3,30 a 4,94 ppm.....	70
Figura 3.25 - Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz.....	71
Figura 3.26 - Espectro de RMN de ^1H do composto de inclusão a 400 MHz.....	72
Figura 3.27 - Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto de inclusão a 400 MHz, região entre 3,4 e 4,0 ppm.....	73
Figura 3.28 - Mapa de contorno 2D ROESY ^1H - ^1H a 400 MHz para o sistema β -CD/Pentoxifilina 1:1.....	75
Figura 3.29 - Expansão do mapa de contorno 2D ROESY ^1H - ^1H a 400 MHz para o sistema β -CD/Pentoxifilina 1:1.....	76
Figura 3.30 - Variação da entalpia e curva final após ajuste não-linear para a titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em β -CD (4 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	77
Figura 3.31 - Variação da entalpia e curva final após ajuste não-linear para a titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em β -CD (4 mmol.L^{-1}): a) Titulação a $15 \text{ }^\circ\text{C}$; b) Titulação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$	79
Figura 3.32 - Variação da entalpia e curva final após ajuste não linear para a titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em α -CD (4 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	81

Índice de Tabelas

<i>Capítulo 1: Introdução</i>	14
Tabela 1.1 - Características estruturais das principais ciclodextrinas naturais.....	18
<i>Capítulo 3: Resultados e Discussão</i>	46
Tabela 3.1 - Relação de alguns modos vibracionais da molécula de β -ciclodextrina atribuídos através do seu espectro de absorção na região do infravermelho.....	48
Tabela 3.2 - Relação de alguns modos vibracionais da molécula Pentoxifilina atribuídos através do se espectro de absorção na região do infravermelho.....	49
Tabela 3.3 - Deslocamento químico (δ) e multiplicidade dos hidrogênios da β -ciclodextrina a 600 MHz.....	67
Tabela 3.4 - Multiplicidade e deslocamento químico (δ) dos hidrogênios da Pentoxifilina a 400 MHz.....	69
Tabela 3.5 - Valores do deslocamento químico para hidrogênios da Pentoxifilina e composto de inclusão.....	73
Tabela 3.6 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema Pentoxifilina/ β -CD a 25 °C.....	78
Tabela 3.7 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema Pentoxifilina/ β -CD a 15 e 37 °C.....	80
Tabela 3.8 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema Pentoxifilina/ α -CD à 25 °C.....	81

Índice de Abreviaturas e Siglas

<i>Aem</i> Pent	Água em solução de Pentoxifilina
<i>Aem</i> βCD	Água em solução de beta-ciclodextrina
ATP	Trifosfato de Adenosina
CI	Composto de inclusão
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopia de Correlação
Dimetil-β-CD	Dimetil-beta-ciclodextrina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FT-IR	Infravermelho por Transformada de Fourier
g	Gramas
HATR	Reflectância Total Atenuada Horizontal
HPβCD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
ITC	Calorímetro/Calorimetria Isotérmica de Titulação
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kJ	Kilo-Joule
L	Litro
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
m	Massa
mmol	Milimol
MM	Mistura mecânica
nm	Nanômetro
NOE	Efeito Nuclear Overhouser
<i>Pem</i> Água	Solução de Pentoxifilina em água
<i>Pem</i> βCD	Solução de Pentoxifilina em solução de beta-ciclodextrina
Pentoxi	Pentoxifilina
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	Efeito Espectroscópico Overhouser de Rotação da Estrutura Nuclear
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIFEI	Universidade Federal de Itajubá

UV-Vis	Ultravioleta-Visível
α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
β CDemPent	Solução de beta-ciclodextrina em solução de Pentoxifilina
μ L	Microlitro
γ -CD	Gama-ciclodextrina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Química supramolecular	15
1.2. Ciclodextrinas e suas aplicações	17
1.3. A físico-química e os compostos de inclusão	21
1.4. Doenças cardiovasculares	24
1.5. Pentoxifilina	26
1.6. Objetivos do trabalho	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1. Reagentes utilizados	31
2.1.1. β -ciclodextrina	31
2.1.2. α -ciclodextrina	31
2.1.3. Pentoxifilina	32
2.2. Equipamentos e acessórios	33
2.3. Descrição das técnicas de caracterização utilizadas	33
2.3.1. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-VIS)	34
2.3.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)	35
2.3.3. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	36
2.3.4. Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)	37
2.4. Descrição dos procedimentos realizados	39
2.4.1. Titulação com análise por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)	39
2.4.2. Titulação com análise por Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	42
2.4.3. Influência do pH na absorção da Pentoxifilina com análise por Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	43
2.4.4. Preparo e análise dos compostos de inclusão por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	44
2.4.5. Preparo e análise da mistura mecânica por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)	44
2.4.6. Análise por Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)	45

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1. Análise do composto de inclusão no estado sólido	47
3.1.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)	48
3.2. Análises em solução aquosa	54
3.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho por Reflectância Total Horizontal Atenuada (FTIR-HATR)	54
3.2.2. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	60
3.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	66
3.2.4. Calorimetria Isotérmica da Titulação (ITC)	77
4. CONCLUSÃO	83
5. REFERÊNCIAS	85

Capítulo 1

Introdução

1.1. Química Supramolecular

Por muito tempo a química foi descrita como a ciência que observa os elementos da natureza, suas características e processos de obtenção. A descoberta do átomo trouxe outros desafios, tornando-a mais complexa devido não somente ao estudo da caracterização dessas entidades de forma individual, como também pela disposição com que elas podem se associar e, assim, formar estruturas maiores e heterogêneas. A associação de átomos por ligações covalentes, bem como a energia envolvida, descrevem a química molecular (LEHN, 1978). Entretanto, muitos fenômenos não são explicados por essas interações fortes.

A química supramolecular corresponde ao estudo das interações intermoleculares e foi primeiramente proposta por Jean-Marie Lehn, que recebeu o Prêmio Nobel em 1987 juntamente com Donald J. Cram e Charles J. Pedersen, por seus trabalhos no desenvolvimento e utilização de moléculas de estrutura específica com interações de alta seletividade. Por se tratar de uma disciplina detalhista, a química supramolecular exige um rigoroso entendimento da estrutura e das ligações a nível molecular (STEED, 2015). Ligações de hidrogênio, interações iônicas, dipolo-dipolo, dipolo permanente-dipolo induzido, forças de dispersão bem como o efeito hidrofóbico configuram essa área que é amplamente investigada devido a sua abrangência de aplicações, onde a arquitetura supramolecular sintética tem como plano de fundo a mimetização dos sistemas biológicos (LEHN, 1985; UHLENHEUER, PETKAU *et al.*, 2010).

É justamente nos sistemas biológicos que a química supramolecular tem sua inspiração e baseia o seu entendimento. Há diversos exemplos de como as pequenas interações repercutem de forma fina e elaborada em uma resposta biológica: a afinidade de uma enzima, no qual o sítio ativo é específico a um substrato, sendo capaz de distinguir mesmo isômeros ópticos; a união entre as duas fitas de DNA pelas ligações de hidrogênio das bases nitrogenadas e por interações eletrostáticas entre os grupos fosfato; o enovelamento de uma proteína em sua conformação nativa, resultado das interações entre os diversos resíduos de aminoácidos, sendo capaz de exercer sua funcionalidade; a agregação dos fosfolipídios para constituir a dupla camada de todas as membranas celulares, resultado de forças de dispersão e do efeito hidrofóbico que unem as cadeias hidrocarbonadas, Figura 1.1 (SERVICE, 2005; UHLENHEUER, PETKAU *et al.*, 2010). Nesse último, trata-se de uma força muito fraca quando levado em consideração apenas duas dessas biomoléculas, contudo, a soma de um universo maior de unidades garante o sinergismo capaz de estabilizar a estrutura.



<http://biofuels.mines.edu>

<http://logicalfaith.org>

<http://en.wikipedia.org>

Figura 1.1 - Alguns exemplos de sistemas supramoleculares biológicos: a) complexo enzima-substrato; b) dupla fita de DNA e c) bicamada lipídica.

A química supramolecular pode ser dividida em três partes:

i) **do reconhecimento molecular:** tem-se estudos dos mecanismos de reconhecimento que ocorrem de forma específica entre uma molécula e outra por meio de interações não-covalentes, muitas vezes envolvendo complementariedade. Como exemplo temos a interação entre um patógeno e um anticorpo;

ii) **dos sistemas hóspede-hospedeiro:** compreende os complexos formados por duas ou mais moléculas através de interações não-covalentes onde, na maioria, as moléculas hóspedes são anfifílicas e seus grupos ou partes mais afins interagem uns com os outros. As ciclodextrinas e suas moléculas hóspedes figuram nesse tipo;

iii) **dos agregados moleculares ou auto-agregados:** onde temos a união de sistemas supramoleculares independentes para compor um conjunto maior com propriedades diferentes daqueles isolados. Proteínas com estrutura quaternária, nas quais há o envolvimento de duas cadeias de aminoácidos, são exemplos desses agregados.

Dos muitos desafios da ciência, o estudo da automontagem molecular revela-se com significância (LEHN, 2002; WHITESIDES e BONCHEVA, 2002; SERVICE, 2005). Entender como essas interações intermoleculares perfazem arquiteturas complexas a ponto de formar estruturas que vão desde organelas celulares a materiais rígidos da construção civil tornou-se um trabalho meticuloso para químicos e físicos dessa área há mais de quatro décadas. De todo esse tempo, pode-se dizer sobre duas premissas básicas: o conceito de que semelhante interage com semelhante, adentrando as ideias de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, e o conceito de que a automontagem é governada por processos

energeticamente favoráveis (SERVICE, 2005). Sistemas em solução ou em estado sólido são os mais observados por perfazerem arquiteturas supramoleculares discretas ou arranjos tridimensionais cristalinos, contudo, estudos da química de superfícies têm sido emergentes ao longo dos últimos anos, englobando interações de coordenação e com halogênios (SLATER, PERDIGAO *et al.*, 2014).

A química supramolecular, no desafio de encarar sistemas de grande complexidade, produz descobertas de importância e que concernem aplicações reais em vários segmentos. Estudos como a de um teste comercial para câncer de próstata, com base na luminescência de complexos de európio capazes de reconhecer citrato; polímeros que mimetizam a capacidade anti-congelante de proteínas encontradas em alguns peixes e um novo método de polimerização, baseado na reação dos monômeros com uma molécula iniciadora, que gera um centro ativo para a reação, estão entre algumas das novidades que faz desta uma área promissora (STEED, 2015).

1.2. Ciclodextrinas e suas aplicações

Ciclodextrinas são compostos sintéticos obtidos enzimaticamente pela degradação do amido, se tratando de moléculas cíclicas constituídas, principalmente, com seis até oito resíduos de glicopirranose unidas por ligações α -1,4. Existem três tipos de ciclodextrinas ditas nativas ou naturais que se diferenciam, dentre outros aspectos, pelo número de resíduos de açúcar: a α (alfa) com seis, a β (beta) com sete e a γ (gama) com oito. Essas se encontram representadas na Figura 1.2, a seguir, e a Tabela 1.1 apresenta algumas das suas características estruturais segundo József Szejtli e Norico Ogawa e colaboradores (SZEJTLI, 1998; OGAWA, TAKAHASHI *et al.*, 2015).

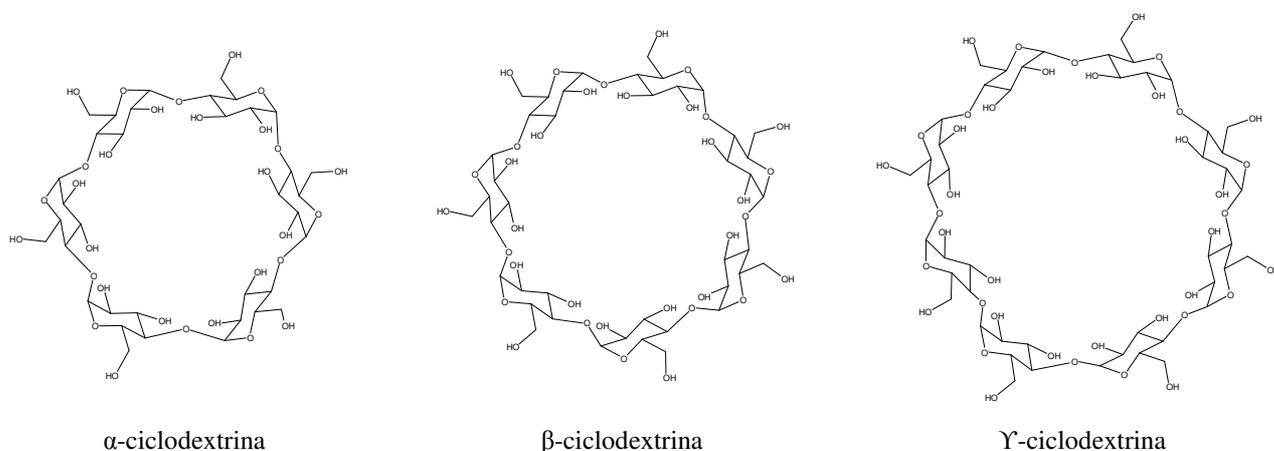


Figura 1.2 - Representação estrutural das principais ciclodextrinas naturais obtidas pela hidrólise enzimática do amido.

Tabela 1.1 - Características estruturais das principais ciclodextrinas naturais.

	Nº de resíduos de glicose	Massa molar	Diâmetro da abertura maior (Å)	Diâmetro da abertura menor (Å)	Volume aproximado da cavidade (Å ³)	Altura (Å)
α-CD	6	972	5,3	4,7	174	7,9
β-CD	7	1135	6,5	6,0	262	7,9
γ-CD	8	1297	8,3	7,5	427	7,9

Variações no número de glicopiranoses e modificações em seus grupos hidroxilas, com a adição de grupos funcionais, conferem a essas moléculas características físico-químicas distintas. Por exemplo, a α -ciclodextrina é mais solúvel que a β , mas menos solúvel que a γ (α : 14,5 g/100 mL de água, β : 1,85 g/100 mL de água, γ : 23,2 g/ 100 mL de água, a 25 °C), sendo que um dos motivos que explicam essa variação na solubilidade é a disposição dos átomos em cada ciclodextrina, o que permite um maior ou menor número de interações intracadeia dessas estruturas na contrapartida com as interações delas com o solvente (SZEJTLI, 1998).

Dos mais de 15.000 derivados registrados por Szejtli em 2004, chama atenção a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) por ser mais solúvel que a precursora β -ciclodextrina e possibilitar aplicações onde há a necessidade de uma maior concentração (SZEJTLI, 2004). A hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP γ CD) também é outra derivada que mescla ótima habilidade de encapsulamento e boa solubilidade, já sendo encontrada em composições farmacêuticas comerciais como no diclofenaco sódico (Voltaren) e no Tc-99 Teboroxime (CardioTec) (BREWSTER, 2007).

Todas as ciclodextrinas possuem conformação cíclica capaz de formar um ambiente interno hidrofóbico, o que permite hospedar moléculas, ou parte destas, em seu interior. Em ambiente aquoso, o interior hidrofóbico é ocupado por moléculas de água de forma energeticamente desfavorável, vindo a ser substituídas por outro composto menos polar, Liu e Guo verificaram que essas não interferem/impedem de forma apreciável o fenômeno de

inclusão de outros compostos no interior (LIU e GUO, 2002). Já a superfície externa hidrofílica interage facilmente com moléculas de água através, principalmente, de ligações de hidrogênio que são estabelecidas. A complexação é orientada de forma a maximizar o contato entre a parte hidrofóbica da molécula e a cavidade apolar da ciclodextrina, minimizando a energia resultante, aumentando o número e intensidade das interações intermoleculares e, conseqüentemente, formando sistemas mais estáveis. Essa característica de hospedeira molecular pode modificar as propriedades químicas, físicas e mesmo biológicas dos compostos incluídos, gerando aplicações em diversos setores: farmacêutico, alimentício, químico, cromatográfico, biotecnológico, têxtil, da agricultura, higiene, medicina e meio-ambiente (LOPEZ, DE VRIES *et al.*, 2011; MARCOLINO, ZANIN *et al.*, 2011; GOUREVICH, DOGADKIN *et al.*, 2013; YOUWIE e YINZHE, 2013).

Embora as ciclodextrinas tenham sido descobertas há mais de 120 anos, suas pesquisas só ganharam força na década de 1980 através de aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos (CRINI, 2014). Segundo József Szejtli, pesquisador húngaro pioneiro nessa área, o histórico dessas moléculas pode ser dividido em três períodos (SZEJTLI, 1998):

- **Período da descoberta:** Em 1891 o farmacêutico e químico Antoine Villiers realizava experimentos em seu laboratório utilizando o fermento *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*) em amido de batata quando notou a formação de um cristal com propriedades particulares, ao qual deu o nome de celulosina, por apresentar semelhanças com a celulose como resistência à hidrólise ácida e ausência de propriedade redutora. Naquela época ele já havia percebido a formação de dois tipos distintos de cristais, provavelmente a α e a β ciclodextrinas. Cerca de 20 anos depois, Shardingger percebeu a diferença na coloração desses dois cristais ao reagi-los com iodo, a cor era verde-cinza para a α -ciclodextrina seca, que mudava para azul na presença de água, e acastanhada para a β -ciclodextrina, não importando se estava seca ou úmida. Esse período perdurou até início da década de 1930.
- **Período de estudos sistemáticos:** Entre as décadas de 1930 e 1970 houve avanços na caracterização dessas moléculas. Karl J. Freudenberg, através de seus experimentos e da observação dos trabalhos de outros colegas, chegou a conclusão de que as ciclodextrinas eram estruturas cíclicas. Mais tarde, esse mesmo pesquisador elucidou a estrutura da terceira ciclodextrina natural, a γ . Grupos de dois pesquisadores, Dexter

Frech e Friedrich Cramer, trabalharam extensivamente na produção enzimática das ciclodextrinas, bem como na sua purificação e caracterização. Cramer também voltou sua atenção na formação dos complexos de inclusão.

- **Período de produção industrial:** Esse período vai da década de 1970 até os dias atuais. Após muitos estudos terem constatado que as ciclodextrinas não eram tóxicas, houve um grande aumento na produção à partir da década de 1970, fazendo com que o preço desses compostos caísse, se tornassem mais acessíveis e possibilitando pesquisas em diferentes áreas (CRINI, 2014).

Além dos três períodos referidos, pode-se destacar, mais recentemente, uma fase de grande avanço na aplicabilidade dessas moléculas, resultante da síntese de derivados que permitiram extrapolar algumas limitações existentes nas ciclodextrinas naturais relacionadas à solubilidade, além de proporcionarem maior associação das hóspedes e concomitante estabilização destas moléculas que adentram no interior. Conforme revisão de Neha Sharma e Ashish Baldi (SHARMA e BALDI, 2016), atualmente as ciclodextrinas tornam possível a liberação de compostos por via oral, retal, nasal e transdérmica, além da administração tópica na oftalmologia por meio da formulação de colírios que geram menos irritação e aumentam o tempo de meia-vida dos compostos atuantes.

Na área farmacêutica as ciclodextrinas são utilizadas como excipientes em cerca de 40 produtos e permanecem promissoras: se por um lado 90 % dos fármacos em desenvolvimento tem problemas relacionados à solubilidade, por outro lado as ciclodextrinas apresentam características hidrofílicas ($\log K_{o/w}$ entre -8 e -12), grande número de hidrogênios receptores/doadores e não toxicidade por via oral, com excreção direta de grande parte administrada e digestão bacteriana no cólon (LOFTSSON e BREWSTER, 2010). Sua ação como transportadora também é apreciável, encapsular fármacos e lançá-los próximo ao seu sítio de ação conferem a essas função de liberadores moleculares, dando proteção ao longo de todo o caminho no organismo e aumentando a eficácia. Outras vantagens de sua utilização consistem em uma melhor formação de estruturas cristalinas, diminuição da sensibilidade de certos fármacos, já que esses não ficam prontamente expostos, redução de efeitos colaterais muitas vezes relacionados a uma menor quantidade administrada e atenuação de sabores desagradáveis (CRINI, 2014).

Na medicina, a vacina Daptacel (*Diphtheria and Tetanus Toxoids and Acellular Pertussis Vaccine Adsorbed*) já é formulada utilizando a dimetil- β -CD e estudos com anestésicos locais incluídos também foram recentemente avaliados com bons resultados (BRANDARIZ e IGLESIAS, 2013). O pequeno tamanho de sua cavidade interna e grande resistência à degradação enzimática dão a α -ciclodextrina um grande potencial na indústria de alimentos, utilizadas na solubilização de ácidos-graxos e vitaminas e para estabilidade de aromatizantes, corantes e adoçantes (LI, CHEN *et al.*, 2014). Na química, ciclodextrinas tem sido empregadas com sucesso e vários avanços foram obtidos na separação de compostos quirais por cromatografias líquida, gasosa ou de fluido supercrítico, como visto na revisão de Xiao (XIAO, NG *et al.*, 2012).

Recentemente, essas moléculas também têm sido empregadas na síntese de polímeros, ou associadas a essas estruturas, para liberação controlada de fármacos. A presença de hidroxilas em sua superfície externa e a existência de uma cavidade interna são atributos das ciclodextrinas na constituição de polímeros, seja por interações hóspede-hospedeiro ou mesmo por ligações covalentes entre as unidades (ZHOU e RITTER, 2010)(WEI e YU, 2015). A associação entre a ciência dos polímeros e técnicas de liberação controlada de substâncias resultam em arquiteturas químicas com múltiplas funcionalidades e aplicações biomédicas (OLIVEIRA, SUAREZ *et al.*, 2015) e constituem uma linha de pesquisa em potencial, pois embora vários trabalhos *in vitro* e *in vivo* demonstrem sua eficiência na terapia de doenças como o câncer, ainda há pouco conhecimento sobre a biocompatibilidade, toxicidade e biodegradação desses sistemas supramoleculares (WEI e YU, 2015).

1.3. A físico-química e os compostos de inclusão

Segundo o *Gold Book* da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a definição de um composto ou complexo de inclusão consiste em um componente hospedeiro possuir cavidade capaz de alocar uma segunda entidade (hóspede) sem a existência de ligações covalentes (IUPAC, 2015). Assim, o estudo dos compostos de inclusão inserem-se na química supramolecular e desvendar as interações intermoleculares entre essas duas espécies torna-se de interesse. Nessa relação, características inerentes tanto da molécula hóspede como da hospedeira devem ser observadas, inserindo também fatores externos como o ambiente em que essas moléculas se encontram (tipo de solvente, pH, temperatura, força iônica, dentre outros).

A energia é encontrada em diferentes formas como potencial elétrica, potencial elástica, cinética e química, e o seu fluxo é o objeto de estudo da termodinâmica (DEMIREL, 2013). Os conceitos da termodinâmica, muito bem definidos ao longo de mais de duzentos anos por grandes cientistas como Carnot, Clausius e Gibbs, são de fundamental importância no estudo de compostos de inclusão no sentido de discutir sobre a estabilidade e espontaneidade da formação desses sistemas. Não somente é necessário uma caracterização estrutural, observando as partes envolvidas e o tipo de interação, como também a determinação de parâmetros físico-químicos como ΔG , ΔH e $T\Delta S$, que conduzem ao entendimento do tipo de complexo em questão.

No caso dos compostos de inclusão envolvendo ciclodextrinas, as quantidades termodinâmicas obtidas são consequência da entrada da parte hidrofóbica da molécula hóspede na cavidade e saída das moléculas de água, com destaque para as interações de van der Waals e as hidrofóbicas (REKHARSKY e INOUE, 1998). Uma técnica que responde bem a essa finalidade em ambiente aquoso é a calorimetria isotérmica de titulação, que informa a entalpia de reação, a constante de associação envolvida e, inclusive, a estequiometria do sistema (BOUCHEMAL e MAZZAFERRO, 2012). A termogravimetria e a calorimetria exploratória diferencial também fornecem suporte para tal caracterização por revelarem curvas diferenciadas entre as moléculas livres e envolvendo o composto de inclusão (CORCIOVA, LAZAR *et al.*, 2010; YAO, YOU *et al.*, 2014).

A importância das moléculas de água no processo de inclusão foi algo extensivamente investigado. Em soluções aquosas, o interior da ciclodextrina é ocupado por moléculas de água através de interações polar-apolar (polar por parte das moléculas de água, apolar por parte da ciclodextrina), gerando um estado energeticamente desfavorável e, por isso, sendo rapidamente ocupado por quaisquer moléculas que diminuam a alta entalpia desse sistema (OGAWA, TAKAHASHI *et al.*, 2015). O processo de substituição, como já mencionado, é governado pelas forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, ficando as ligações de hidrogênio e os efeitos estéricos em segundo plano. Entretanto, cada sistema responde de forma singular e ponderal a cada tipo de interação intermolecular, a depender, principalmente, da molécula hóspede investigada (REKHARSKY e INOUE, 1998). A Figura 1.3 esquematiza outros fatores associados ao processo de inclusão.

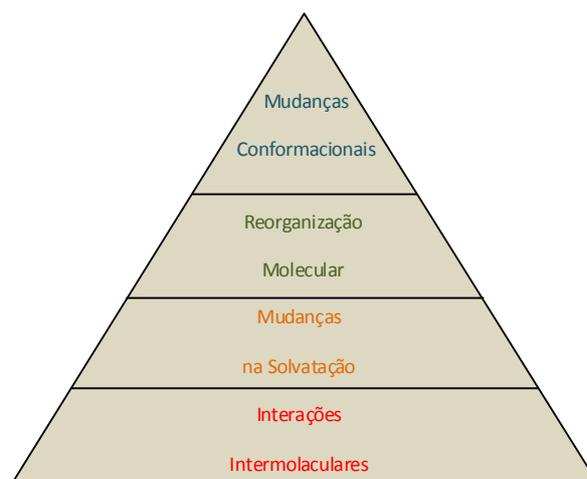


Figura 1.3 - Fatores, em respectivas proporções, associados ao processo de inclusão.

Do ponto de vista termodinâmico, pode-se dizer que a inclusão por uma ciclodextrina, sendo regida por um conjunto de interações intermoleculares, gera um ganho entálpico significativo. Este ganho é compensado pela perda de entropia ocasionada pela união entre as duas moléculas até então separadas. Quando, em alguns sistemas, uma segunda ciclodextrina agrega a um composto de inclusão já formado (estequiometria 2:1), a constante de associação obtida é consideravelmente menor frente a primeira pois a barreira entrópica imposta é maior (PURKAYASTHA, JAFFER *et al.*, 2012).

O campo da química supramolecular foi por muito tempo visto sob a óptica do controle termodinâmico, no qual o equilíbrio de montagem vinculado à termodinâmica persiste por períodos maiores. Essa ideia é razoável visto que as interações não-covalentes são fracas, sendo quebradas e geradas de forma constante porque as barreiras de ativação não são significativamente altas. Entretanto, incorporar todas as situações a esse regime, de certo grau estático, pode levar a conclusões equivocadas. Recentemente, tem-se falado também de sistemas de montagem vinculados à cinética e sistemas de montagem longe do equilíbrio. Os primeiros remetem a sistemas que são temporariamente duráveis mas que podem vir a ocupar um vale de menor energia, seja por uma modificação no ambiente, como a mudança na concentração de um dos componentes do sistema, seja pelo fornecimento de uma certa quantidade energética suficiente para transpor uma barreira de ativação maior e, assim, adquirir maior estabilidade. A segunda situação necessita de uma contínua demanda de energia para formação e quebra das interações ao longo de um caminho ou rota química no qual várias moléculas participam e diferentes interações ocorrem. Quando o fornecimento de

energia para o sistema longe do equilíbrio é interrompido, esse torna-se termodinâmico ou cinético, como descrito anteriormente. O comportamento longe do equilíbrio é frequentemente observado no meio intracelular, como na rota de quebra do ATP para a constituição de macromoléculas termodinamicamente desfavoráveis, um processo contínuo envolvendo uma intrincada rede de reações e moléculas que só termina com a morte da célula (MATTIA e OTTO, 2015). A Figura 1.4 esquematiza esses três tipos de sistemas.

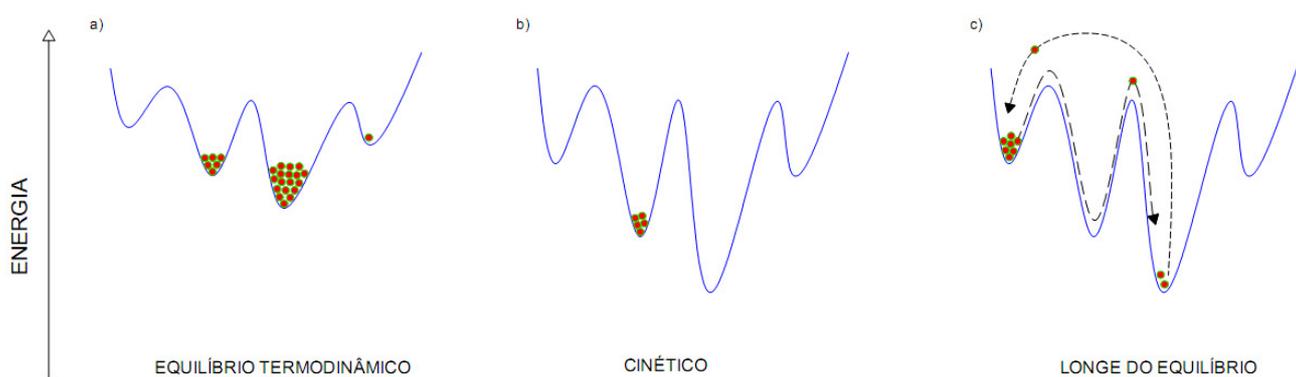


Figura 1.4 - Representação dos tipos de sistemas supramoleculares frequentemente observados.

Nesse contexto, é fácil pensar em regimes caracteristicamente termodinâmicos para os compostos de inclusão com ciclodextrinas pelo fato de que as interações envolvidas geram barreiras energéticas baixas, mas há casos na literatura que não se enquadram nesse perfil. Um exemplo é o trabalho de Krabbenborg (KRABBENBORG, 2014): ferroceno ácido carboxílico é continuamente oxidado e reduzido por meio de dois eletrodos, uma superfície possuindo β -CD é colocada entre os eletrodos e em contato com a solução de ferroceno. As ciclodextrinas da superfície podem se ligar, por intermédio de uma molécula de adamantano modificada, apenas aos ferrocenos reduzidos, gerando um gradiente de concentração localizado. Esse sistema é caracterizado como longe do equilíbrio porque ele persiste somente quando há corrente entre os eletrodos, pelo que na ausência desta o gradiente de concentração é desfeito pela falta de interação entre o ferroceno reduzido e a ciclodextrina.

1.4. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são causadas por desordens do coração e dos vasos sanguíneos e incluem as doenças coronarianas, as cerebrovasculares, as de aumento da pressão arterial, as doenças congênitas e reumáticas do coração e das artérias periféricas. Os principais fatores de risco são o fumo, sedentarismo, dieta desequilibrada, abuso de álcool e a

predisposição genética, sendo este um fator não modificável. Em 2012, cerca de 31 % das mortes registradas no mundo foram decorrentes de doenças cardiovasculares, o que representou 17,5 milhões de óbitos, sendo a maior parte, 75 %, registrada em nações desenvolvidas ou em desenvolvimento (WHO, 2015). A maior incidência nesses países, que inclui o Brasil, está relacionada ao estilo de vida adotado, já que sedentarismo, dieta inadequada e estresse são comuns nessas populações e condicionam o indivíduo a essas doenças. Além disso, há um tendência de elevação no número desses quadros em países em desenvolvimento, agravando a morbidade e mortalidade (ESPOSITO, CARAMELLI *et al.*, 2007). A Figura 1.5 mostra gráficos do cenário das mortes prematuras de homens e mulheres no Brasil em 2011.

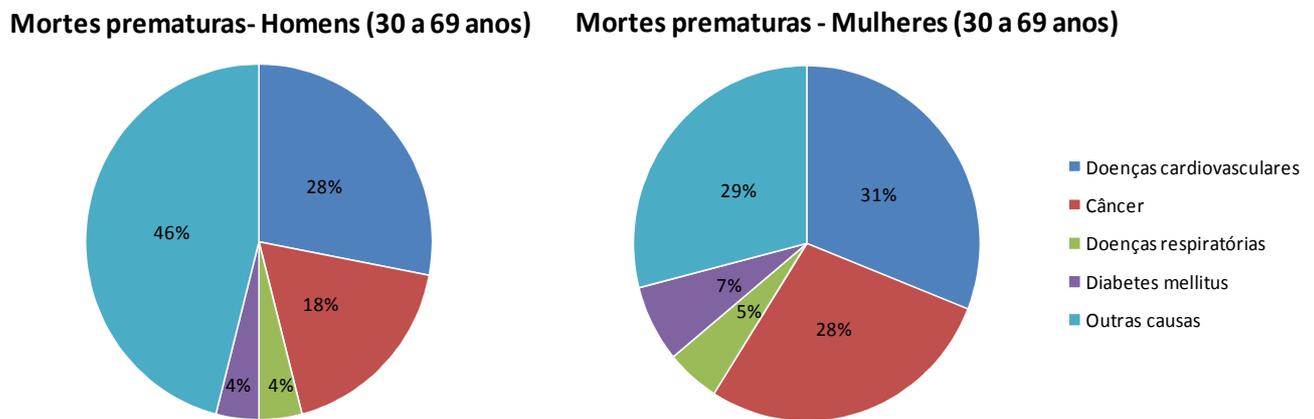


Figura 1.5 - Prevalência de causas de mortes prematuras registradas no Brasil estratificada por gênero no ano de 2011.

Apesar de a maioria das instâncias que levam ao surgimento das doenças cardiovasculares se tratarem de fatores modificáveis e, portanto, considerados preventivos, estima-se que elas ocasionem, em 2030, cerca de 25 milhões de mortes (OKWUOSA, LEWSEY *et al.*, 2016), isso porque, em contrapartida à prevenção, novos fatores como a poluição, encontrada especialmente nos grandes centros urbanos, a exposição a solventes, metais pesados, pesticidas e extremos sonoros e de temperatura também têm chamado a atenção para a vulnerabilidade do coração e do sistema vascular (COSSELMAN, NAVAS-ACIEN *et al.*, 2015).

Frequentemente são observadas doenças oclusivas do sistema circulatório nos pacientes, seja em artérias pequenas ou de grande calibre. A aterosclerose é uma dessas doenças e se caracteriza por uma inflamação crônica em resposta a uma agressão do endotélio de artérias de médio a grande calibre, possuindo vários desencadeantes, como dislipidemias e

hipertensão arterial. A placa aterosclerótica formada compromete o fluxo sanguíneo e é resultado de um depósito de lipídeos, tecido fibroso e células do sistema imunológico que se agregam ao local (XAVIER, IZAR *et al.*, 2013). A aterosclerose pode ser fatal quando atinge artérias de órgãos que resistem poucos minutos sem oxigênio, como o coração e o cérebro.

Desse modo, a necessidade de se trabalhar de forma preventiva torna-se emergente, alertando sobre os riscos dessas doenças e a mudança no estilo de vida para hábitos mais saudáveis. Paralelamente, a Organização Mundial da Saúde enfatiza as pesquisas de desenvolvimento de novos tratamentos e medicamentos nessa área na busca de minimizar os casos de óbito, já que a condição da vida moderna da população mundial como um todo tende a ser irreversível.

1.5. Pentoxifilina

A molécula Pentoxifilina [nome IUPAC: 3,7-dimetil-1-(5-oxo-hexil)purina-2,6-diona] é derivada da base purínica xantina, sendo constituída por dois anéis, um de cinco e outro de seis membros, e uma parte alifática com um grupo cetona próxima à extremidade, conforme visto na Figura 1.6.

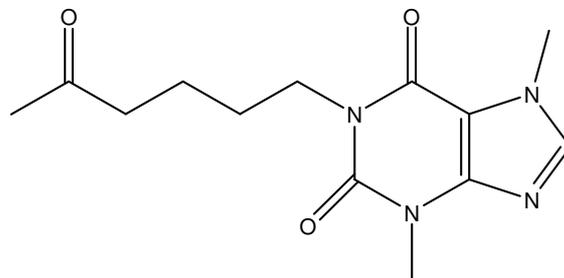


Figura 1.6 - Fórmula estrutural da Pentoxifilina.

A Pentoxifilina é um medicamento comumente indicado para o tratamento de doenças oclusivas arteriais periféricas, distúrbios arteriovenosos de natureza aterosclerótica ou diabética e alterações circulatórias cerebrais, todas essas englobadas no conjunto de doenças cardiovasculares, as quais matam milhões e descritas no item 1.4. A Figura 1.7 ilustra a artéria normal e comprometida com a aterosclerose.

Embora não se saiba o real mecanismo bioquímico de sua ação, segundo dados da literatura a molécula atua no aumento da flexibilidade dos eritrócitos (glóbulos vermelhos) e diminuição da viscosidade sanguínea, dificultando a adesão dos leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas nas células da parede endotelial dos vasos sanguíneos (REILLY, QUINTON *et al.*, 1987; AZHAR e EL-BASSOSSY, 2015). Evidências científicas de sua ação

vasodilatadora foram verificadas pelo fato dela promover o incremento das concentrações de adenosina monofosfato cíclica, sendo esses resultados vistos somente quando administrada em doses superiores às normalmente utilizadas (KAMPHUIS, SMITS *et al.*, 1994; AHMADI e KHALILI, 2016), corroborando para sua eficiência no tratamento das doenças cardíacas crônicas haja vista a obstrução ocasionada pela aterosclerose.

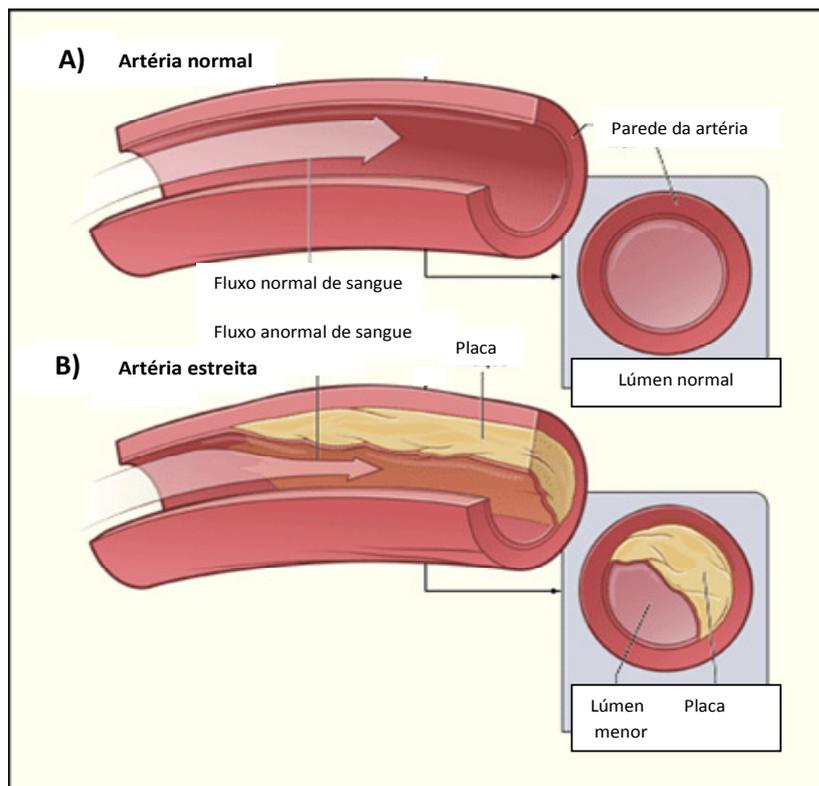


Figura 1.7 - Representação de duas artérias. a) Artéria normal com fluxo sanguíneo sadio; b) Artéria com placa aterosclerótica e fluxo sanguíneo prejudicado. (Adaptado de <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis>)

Também há resultados *in vitro* e *in vivo* da sua ação anti-inflamatória já que a molécula é um inibidor não-específico da fosfodiesterase, atuando na supressão da citocina TNF- α e sua consequente sinalização celular que promove a vasoconstrição (EL-BASSOSSY, EL-MOSELHY *et al.*, 2011). Essa ação antiinflamatória também desfavorece o processo depositário/inflamatório que obstrui a luz dos vasos sanguíneos na aterosclerose. Sua ação contra a trombose é relatada pela sua indução na síntese de prostaglandina e inibição da enzima fosfodiesterase E (AMBRUS, STADLER *et al.*, 1995).

Por todas essas atribuições fisiológicas e bioquímicas, a Pentoxifilina foi, e continua sendo, estudada não somente em relação às doenças cardiovasculares, como também na terapia de diversas outras enfermidades. Em acesso a base científica Web of ScienceTM (Thomson ReutersTM) inserindo uma busca contendo no título a palavra “Pentoxifylline” de 2010 até 30 de janeiro de 2016 revelou um quantitativo de 454 publicações das mais variadas linhas: foi verificado que a administração desse fármaco com inibidores do sistema renina-angiotensina gerou uma redução na albuminúria residual em pacientes com diabetes tipo 2 (NAVARRO-GONZALEZ, MORA-FERNANDEZ *et al.*, 2015). Decorrências hepáticas, como a hipertensão portal (aumento da pressão das veias que levam o sangue dos órgãos abdominais para o fígado) e a hepatite alcoólica severa também foram investigadas (AHMED, EL-MARAGHY *et al.*, 2012; PARK, KIM *et al.*, 2014; THURSZ, RICHARDSON *et al.*, 2014), bem como câncer (BRAVO-CUELLAR, ORTIZ-LAZARENO *et al.*, 2010; GOEL e GUDE, 2011; 2014) e disfunção erétil (ALBERSEN, FANDEL *et al.*, 2011; KUMAR, KUMAR *et al.*, 2015), muitos apresentando resultados promissores. Uma revisão feita por Ahmadi e Khalili investigou o uso dessa molécula na cicatrização de feridas e concluiu que o seu uso, tanto na administração oral como parenteral, mostrou efeitos benéficos na anastomose colorretal, cicatrizes de queimaduras recentes, injúrias induzidas por radiação, úlceras venosas, estomatite aftosa recorrente e leishmaniose cutânea/mucocutânea (AHMADI e KHALILI, 2016).

O grande potencial da Pentoxifilina e sua utilização na linha de frente do tratamento das doenças cardiovasculares empenham esta pesquisa. Até o presente momento, com base nas buscas realizadas, não há registros na literatura da inclusão dessa molécula em ciclodextrinas. Sua inclusão poderia proporcionar modificações nas características físico-químicas, terapêuticas e farmacológicas que contribuíssem numa melhor administração, onde se desejam menores doses, melhor interação específica, maior solubilidade e diminuição dos indesejados efeitos colaterais. A Pentoxifilina apresenta boa solubilidade em água (276,7 mmol/L à 25 °C) e é bem absorvida pelo trato gastrointestinal ($\geq 95\%$), entretanto essa molécula apresenta duas problemáticas: a primeira consiste no fato de que sua estrutura é semelhante à cafeína e à teofilina, demandando um cuidado rigoroso em pacientes sensíveis a estas duas substâncias, a segunda está relacionada à sua rápida degradação metabólica no fígado, isso já na primeira passagem, onde ocorre perda de 60 a 70 % de massa (INDRAYANTO, SYAHRANI *et al.*, 1998; PUBCHEM, 2015a). A sua inclusão com ciclodextrinas poderia resolver essas questões: no primeiro caso o processo poderia promover

uma menor dosagem na administração do medicamento, o que diminuiria o fator da sensibilidade, além de promover uma melhor eficiência e economicidade no preço do tratamento, no segundo, a inclusão protegeria a molécula da extensa degradação enzimática que ocorre no fígado, de modo que a sua atuação permaneceria de uma forma mais eficaz e por mais tempo.

1.6. Objetivos do trabalho

O presente trabalho teve como objetivo preparar complexos supramoleculares entre ciclodextrinas e a Pentoxifilina, um medicamento muito utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares. As caracterizações tiveram como base os estudos com a β -ciclodextrina pelo fato desta ser aprovada pela *Food And Drug Administration (FDA)* e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (DE SOUSA, 2007), entretanto a α -ciclodextrina também foi verificada por possuir um menor tamanho, permitindo uma comparação relacionada aos fatores estéricos.

Como citado anteriormente, há um alto metabolismo da Pentoxifilina no fígado, o que faz com que essa molécula seja degradada rapidamente. Um meio de se resolver essa questão estaria na sua inclusão com ciclodextrinas, pelo que esse processo proporcionaria proteção. Além disso, as doses administradas atualmente poderiam ser reduzidas, melhorando a questão dos efeitos colaterais e problemas relacionados com a sensibilidade à essa droga, seus metabólitos e moléculas semelhantes.

Após o preparo dos complexos, houve a caracterização físico-química por diversos métodos analíticos, permitindo um amplo estudo termodinâmico e estrutural desses sistemas, buscando dados ainda inexistentes na literatura.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1. Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados na caracterização dos sistemas supramoleculares estudados estão listados a seguir com algumas informações e propriedades físico-químicas.

2.1.1. β -ciclodextrina

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hepta-glucoamilose.

Fórmula molecular: $C_{42}H_{70}O_{35}$

Massa molecular média: $1135 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (SZEJTLI, 1998).

Solubilidade em água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$: $15,9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (SZEJTLI, 1998).

Ponto de fusão: $311,31 \text{ }^\circ\text{C}$ (SAENGER, 1980).

Fórmula estrutural:

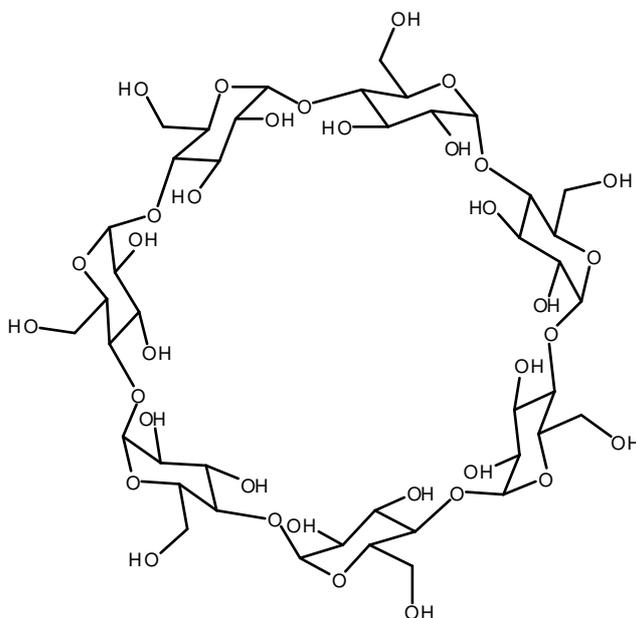


Figura 2.1 - Fórmula estrutural de β -ciclodextrina.

2.1.2. α -ciclodextrina

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hexa-glucoamilose.

Fórmula molecular: $C_{36}H_{60}O_{30}$.

Massa molecular média: $972,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PUBCHEM, 2015b).

Solubilidade em água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$: $149,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (SZEJTLI, 1998).

Ponto de fusão: $277,8 \text{ }^\circ\text{C}$ (PUBCHEM, 2015b).

Fórmula estrutural:

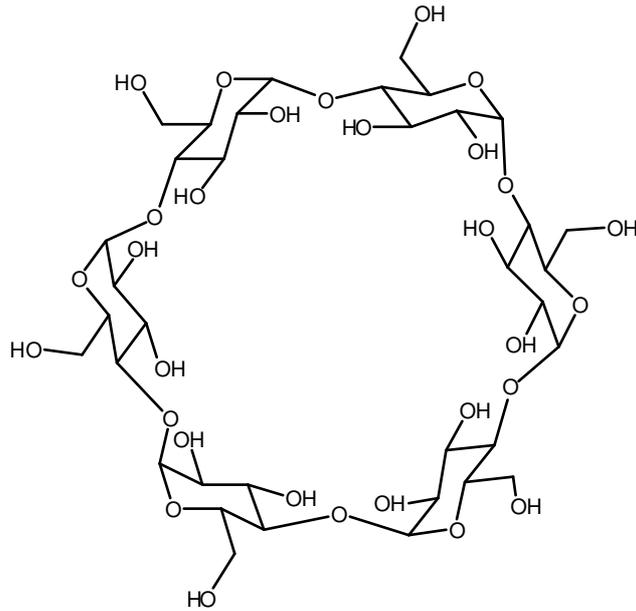


Figura 2.2 - Fórmula estrutural da α -ciclodextrina

2.1.3. Pentoxifilina

Nomenclatura IUPAC: 3,7-dimetil-1-(5-oxo-hexil)purina-2,6-diona

Fórmula molecular: $C_{13}H_{18}N_4O_3$.

Massa molecular média: $278,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PUBCHEM, 2015a) .

Solubilidade em água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$: $276,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (PUBCHEM, 2015a).

Ponto de fusão: $105 \text{ }^\circ\text{C}$ (PUBCHEM, 2015a).

Característica: pó branco cristalino, de gosto amargo, odor leve e característico.

Fórmula estrutural:

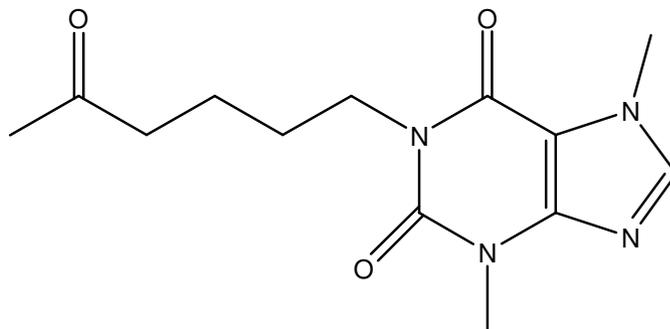


Figura 2.3 - Fórmula estrutural da Pentoxifilina.

2.2. Equipamentos e acessórios:

- Espectrofotômetro de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR), Perkin Elmer Spectrum 100;
- Acessório para Infravermelho, Reflectância Total Atenuada Horizontal (HATR);
- Cella de Seleneto de Zinco (ZnSe), para FTIR-HATR;
- Espectrofotômetro na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Varian Cary 50 Scan;
- Cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico;
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker Avance DRX-400, operando a 400 MHz;
- Tubos de quartzo para RMN de 0,8 polegadas de comprimento e 5 milímetros de diâmetro externo;
- Liofilizador marca JJCientífica, modelo LJJ04;
- Microcalorímetro VP-ITC , MicroCal.

As análises utilizando o Espectrofotômetro de Absorção na Região do Infravermelho e Espectrofotômetro na região do Ultravioleta-Visível foram realizadas no Centro de Estudos de Investigação e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologias da UNIFEI. Análises com o Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Departamento de Química da UFMG. Análises com o Microcalorímetro VP-ITC foram conduzidas no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria – LNBio, na UFJF – Campus Governador Valadares e no Centro de Estudos de Investigação e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologias da UNIFEI-Itajubá.

2.3. Descrição das técnicas de caracterização utilizadas

Para a caracterização, tanto da molécula hóspede, como dos compostos de inclusão, foram utilizadas técnicas espectroscópicas já bem definidas para essa finalidade (BUDAL, 2003; DE SOUSA, OLIVEIRA *et al.*, 2008; FLOARE, PIRNAU *et al.*, 2013): Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR) por meio da Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) e Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A técnica não espectroscópica calorimetria isotérmica de titulação (ITC) também foi empregada para a elucidação termodinâmica e estequiométrica dos sistemas.

2.3.1. Espectroscopia de Absorção na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O espectro eletromagnético do ultravioleta-visível vai de 190 a 800 nm e se baseia no processo de excitação eletrônica que é quantizado, Figura 2.4. Geralmente, o elétron é promovido do orbital ocupado de maior energia (HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). A maioria das moléculas orgânicas e dos grupos funcionais não são detectáveis nessa faixa, porém, para as moléculas detectáveis, a técnica pode trazer informações valiosas, registrando pequenas variações com elevada sensibilidade (PAVIA, LAMPMAN *et al.*, 2010).

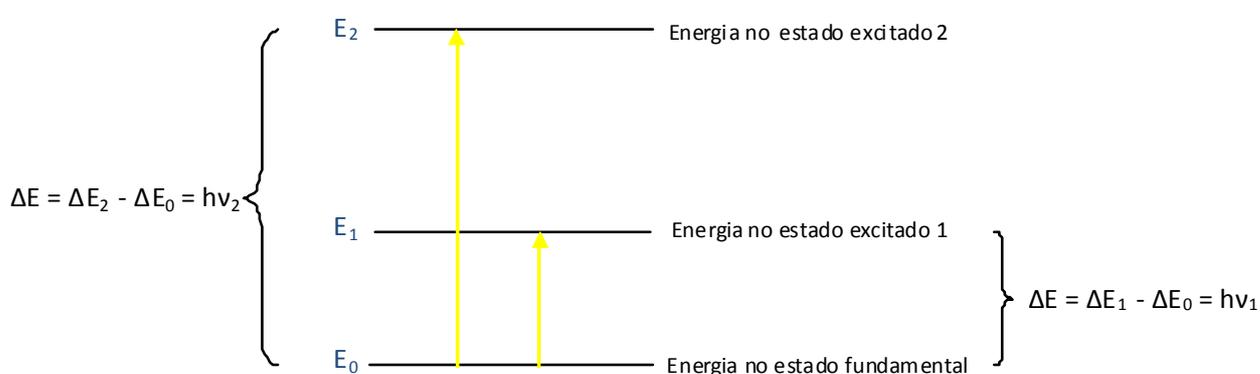


Figura 2.4 - O processo de excitação eletrônica.

Moléculas hóspedes livres ou solubilizadas em um solvente podem apresentar modificações em seu espectro UV-Vis quando na presença de ciclodextrinas (ZIA, RAJEWSKI *et al.*, 2001; CHEN, WANG *et al.*, 2014). Deslocamentos para comprimentos de onda maiores (batocrômicos) ou comprimentos de ondas menores (hipsocrômicos), efeito hiperacrômico (aumento de intensidade da banda) ou hipocrômico (diminuição da intensidade da banda), bem como alargamento ou estreitamento das bandas podem ocorrer mediante a formação do complexo de inclusão que protege parcialmente os cromóforos que adentram na cavidade. Contudo, em sistemas envolvendo ciclodextrinas, são mais frequentemente observados deslocamentos batocrômicos e/ou alargamento de bandas (BUDAL, 2003).

A Pentoxifilina é derivada da molécula xantina, uma base purínica altamente conjugada, e apresenta uma cadeia alifática com um grupo carbonila (Figura 2.3). Isso possibilita transições eletrônicas recorrentemente observáveis no espectro UV-Vis, como a $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Como já descrito na literatura (INDRAYANTO, SYAHRANI *et al.*,

1998), há duas principais absorções nessa região: uma menos intensa, próximo a 275 nm, e outra mais intensa, próximo a 207 nm. A técnica foi empregada no sentido de verificar possíveis alterações nessas bandas após a inclusão, o que poderia dar indícios da intensidade da interação e região da molécula incluída. Dessa forma, foi delineado um experimento de titulação, no qual a Pentoxifilina foi o titulado e a β -CD o titulante. Além disso, no UV-Vis pode-se estudar sobre a estequiometria dos compostos de inclusão através do Método de Job de variação contínua, no qual são acompanhadas mudanças em uma propriedade físico-química das moléculas envolvidas ao longo de variações na fração molar (BOLAND e STONE, 2013; LONG e PFEFFER, 2015).

2.3.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)

Pesquisas envolvendo compostos de inclusão, nos quais a água é utilizada como solvente, são complexas. As interações intermoleculares que a água exerce podem ser intensas a ponto de sobrepor aquelas que, de fato, interessam, tornando os sistemas difíceis de monitorar. Métodos físico-químicos capazes de verificar essas interações são, ainda, um desafio.

No FT-IR, pode-se avaliar quase todos os compostos que tenham ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, com atenção para as vibrações de estiramento e deformação angular que são ampliadas pela energia que é absorvida nessa faixa, da ordem de 8 a 40 kJ/mol (PAVIA, LAMPMAN *et al.*, 2010). A Reflectância Total Atenuada Horizontal (HATR) é um acessório do FT-IR capaz de adquirir espectros de alta resolução e qualidade a partir de soluções aquosas ou sólidos. Nele a radiação é refletida pela interface da amostra e o cristal, num processo que ocorre várias vezes até chegar ao detector, como representado na Figura 2.5.

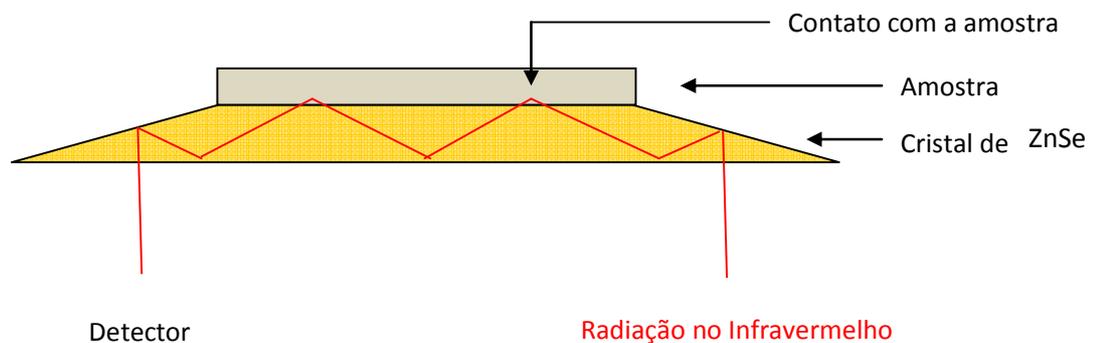


Figura 2.5 - Esquema da trajetória da radiação no acessório HATR.

Desse modo, espectros de alta resolução em diferentes concentrações podem ser obtidos *in situ* de forma eficiente, rápida e simples, se tornando uma excelente alternativa para análises em solução, possibilitando, por exemplo, o monitoramento da agregação de moléculas ou mesmo a criação de métodos analíticos que permitam quantificar compostos (SUAREZ, GARCIA *et al.*, 2013; GABRIENKO, MOROZOV *et al.*, 2015). Embora a espectroscopia FTIR-HATR seja utilizada há muito tempo para diversos processos químicos, compostos de inclusão envolvendo ciclodextrinas foram explorados por essa técnica recentemente (DE SOUSA, OLIVEIRA *et al.*, 2008), o que requer meticulosidade na interpretação dos dados. O processo de inclusão, que pode alterar de forma mais ou menos intensa os modos vibracionais das moléculas livres, torna o FTIR-HATR uma nova e potencial técnica para tais análises.

2.3.3. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é um dos instrumentos mais responsivos na determinação estrutural e dinâmica de moléculas, biomoléculas e complexos de pequeno e médio tamanho (ZANGGER, 2015). Ela permite a diferenciação de núcleos atômicos magneticamente distintos e estabelece, como na difração de raios X, a conectividade entre eles. A qualidade desse tipo de espectro está relacionada a dois fatores básicos: sensibilidade e resolução. Nas últimas décadas, a evolução na sensibilidade foi elevada em mais de uma ordem de magnitude (MOLINSKI, 2010), permitindo analisar pequenas quantidades de compostos e, conseqüentemente, fornecendo melhores possibilidades nos estudos da química supramolecular do tipo hóspede-hospedeiro envolvendo ciclodextrinas. Na busca de se conhecer os sítios de interação do complexo formado, técnicas complementares de RMN dão evidências fidedignas da correlação espacial existente e das forças que direcionam o acoplamento (SCHNEIDER, HACKET *et al.*, 1998).

No RMN de hidrogênio (^1H), modificações nos deslocamentos químicos de uma primeira espécie, quando na presença de uma segunda, podem ocorrer, significando que os núcleos intermoleculares estão interagindo de forma efetiva, resultado direto de uma complexação ou inclusão (PASSOS, DE SOUSA *et al.*, 2011; FLOARE, PIRNAU *et al.*, 2013). Variações nas concentrações das espécies também podem ser feitas para verificar aumento ou decaimento nos sinais e estabelecer a estequiometria do sistema (SCHNEIDER, HACKET *et al.*, 1998).

Atualmente, o RMN em duas dimensões é o pilar dos métodos de determinação estrutural de um composto. Isso porque permite correlacionar núcleos atômicos que possuam

alguma relação escalar ou espacial entre si (MARTIN, 2011). A técnica bidimensional ROESY (*Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) envolve interações decorrentes do Efeito Nuclear *Overhauser* (NOE) entre hidrogênios que estão espacialmente próximos, até 5 Å de distância, sendo ideal para moléculas de tamanho médio (entre 700 e 1200 g/mol). Quaisquer núcleos de ^1H que se envolvam por meio de uma relaxação dipolar serão revelados como picos cruzados em um espectro ROESY, resultado de núcleos diretamente acoplados e, especialmente, não acoplados mas que estão próximos no espaço (PAVIA, LAMPMAN *et al.*, 2010). O experimento de ROESY é bastante útil na determinação de estruturas de biomoléculas. Em estudos envolvendo compostos de inclusão, a técnica possibilita que sejam estabelecidos o sítio de interação, a estequiometria e interações intermoleculares envolvidas (CLARIDGE, 2009; DE SOUSA, DENADAI *et al.*, 2010; LULA, DE SOUSA *et al.*, 2012).

2.3.4. Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)

Conhecer sobre a termodinâmica envolvida na formação de um composto de inclusão é muito importante no estudo de sistemas supramoleculares tendo em vista as interações intermoleculares que permeiam o sistema em estudo. Avaliar se o processo é exotérmico ou endotérmico, se é entropicamente favorável, se há muita ou pouca tendência na formação dos complexos e se ocorre espontaneamente são dados indispensáveis nessa caracterização. Concomitantemente é preciso estabelecer quantas moléculas estão envolvidas em uma unidade supramolecular.

A calorimetria isotérmica de titulação contribui para o entendimento dos mecanismos de regulação, controle biológicos e processos químicos a nível molecular, pois permite medir a energia envolvida em reações químicas, bioquímicas e interações intermoleculares existentes, por exemplo, entre a enzima e seu substrato, a proteína e seu ligante e a ciclodextrina e seu hóspede (FREIRE, MAYORGA *et al.*, 1990). No ITC, a composição química do sistema é modificada através da titulação de uma solução contendo uma das espécies em uma cela onde está presente uma solução com uma segunda espécie, semelhante ao que ocorre em uma titulação de bancada convencional. Uma vez que os processos reacionais ocorrem pela quebra ou formação de interações intermoleculares e ligações químicas, um fluxo de calor sempre estará envolvido. Tal fluxo, no calorímetro, é tateado em uma cela isotérmica e isobárica. Dessa forma, a quantidade de calor recebida ou fornecida será igual ao ΔH (Equação 2.1), em uma relação direta com a razão molar entre as espécies, a pressão constante.

$$\Delta H = \left(\frac{dQ_p}{d[X]} \right) \quad \text{Eq. 2.1}$$

Q_p é um parâmetro medido experimentalmente, entretanto este fluxo de calor demora certo tempo, dt , para ser adicionado ou retirado do sistema. Logo,

$$\Delta H = \left(\frac{dQ_p}{d[X]} \right)_p = \int_{t_1}^{t_2} F dt \quad \text{Eq. 2.2}$$

F = Fluxo de calor

Para os sistemas que possuem uma estequiometria definida (ou seja, que não tendem a formar agregados moleculares em solução) e, ainda, que apresentam valores relativamente altos para a constante de interação ($K > 10^5$), a curva de titulação calorimétrica tende a ser uma sigmóide, como mostra a Figura 2.6 a seguir.

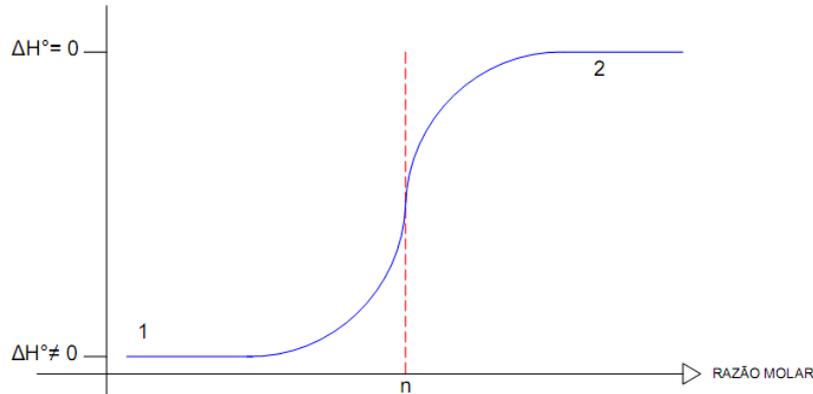


Figura 2.6 - Sigmóide resultante da variação de entalpia (ΔH) por razão molar (n) de duas espécies, obtido em uma titulação calorimétrica.

A curva com tendência sigmoidal, também chamada de Isoterma de Wiseman, pode ser dividida em duas regiões: na região 1 há um excesso de titulado e cada injeção resultará em uma variação de entalpia diferente de zero, com valores expressivos nas primeiras adições, nela o titulado interage com o titulante em suas devidas proporções de equilíbrio; na região 2 há um excesso de titulante e há pouca variação da entalpia pelo fato do sistema caminhar para a saturação, sendo esta alcançada quando a adição do titulante já não promove significativo fluxo de calor.

De todos os modelos de ajuste de ligação descritos na literatura, a Isoterma de Wiseman é a mais conhecida, sendo muito aplicada em titulações de receptores com um sítio de ligação ou que tenham n sítios de ligação equivalentes (HERRERA e WINNIK, 2013). Para as ciclodextrinas, o modelo se ajusta adequadamente pois elas possuem uma única cavidade, ou sítio, de interação com a moléculas hóspede, sendo possível determinar, mesmo para moléculas que exibem pequena afinidade, a entalpia (ΔH), a estequiometria (n) e a constante de equilíbrio (K) do sistema, tudo em um único experimento (TURNBULL e DARANAS, 2003). A entalpia é obtida pela integral da curva, a estequiometria é o valor da abscissa no ponto de inflexão e a constante de equilíbrio é o coeficiente angular da curva no ponto de inflexão (WISEMAN, WILLISTON *et al.*, 1989). Com as equações 2.3 e 2.4, chegamos aos valores de ΔG e $T\Delta S$, resultando numa completa caracterização termodinâmica e quantitativa do sistema.

$$\Delta_{int}G = -RT \ln K \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$\Delta_{int}G = \Delta_{int}H - T\Delta_{int}S \quad \text{Eq. 2.4}$$

2.4. Descrição dos procedimentos realizados

2.4.1. Titulação com análise por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)

Para o experimento da titulação em FTIR-HATR foram preparadas soluções nas seguintes concentrações:

- Pentoxifilina 100 mmol.L⁻¹;
- β -ciclodextrina 10 mmol.L⁻¹.

A titulação foi delineada em três grupos: um grupo com adição de água em solução de β -ciclodextrina ($Aem\beta CD$), outro com adição de solução de Pentoxifilina em água ($Pem\text{Água}$) e um último com adição de solução de Pentoxifilina em solução de β -ciclodextrina ($Pem\beta CD$). Os dois primeiros grupos constituem o branco para a efetiva titulação entre as duas espécies, que ocorre no terceiro. Para o grupo $Aem\beta CD$ foi mantido 500 μL de solução de ciclodextrina 10 mmol.L⁻¹ em todos os tubos *ependorfs* com adição de volumes

crecentes de água. Para o grupo *Pem*Água foi mantido 500 μL de água em todos os tubos *ependorfs* com adição de volumes crescentes de solução Pentoxifilina 100 mmol.L^{-1} . Para o grupo *Pem* βCD foi mantido 500 μL de solução β -ciclodextrina 10 mmol.L^{-1} em todos os tubos *ependorfs* com adição de volumes crescentes de solução Pentoxifilina 100 mmol.L^{-1} . A Figura 2.8 ilustra o procedimento, realizado em duplicata.

Os espectros foram obtidos em Espectrofotômetro PerkimElmer, Spectrum 100, com acessório para Reflectância Total Atenuada Horizontal que possui cela de Seleneto de Zinco (ZnSe), operando com 4 cm^{-1} de resolução, 16 scans e leitura entre 4000 a 650 cm^{-1} na temperatura ambiente. Todos os espectros obtidos foram subtraídos do espectro da água destilada, a fim de uma melhor valorização dos modos vibracionais das duas moléculas analisadas, como exemplificado pela Figura 2.7, onde se pode notar que ficam evidentes algumas bandas da Pentoxifilina que não são percebidas quando se tem apenas o seu espectro em solução. Os dados foram salvos no formato ASCII utilizando o programa Spectrum do equipamento e, posteriormente, tratados no Origin 7.0, OriginLab Corporation.

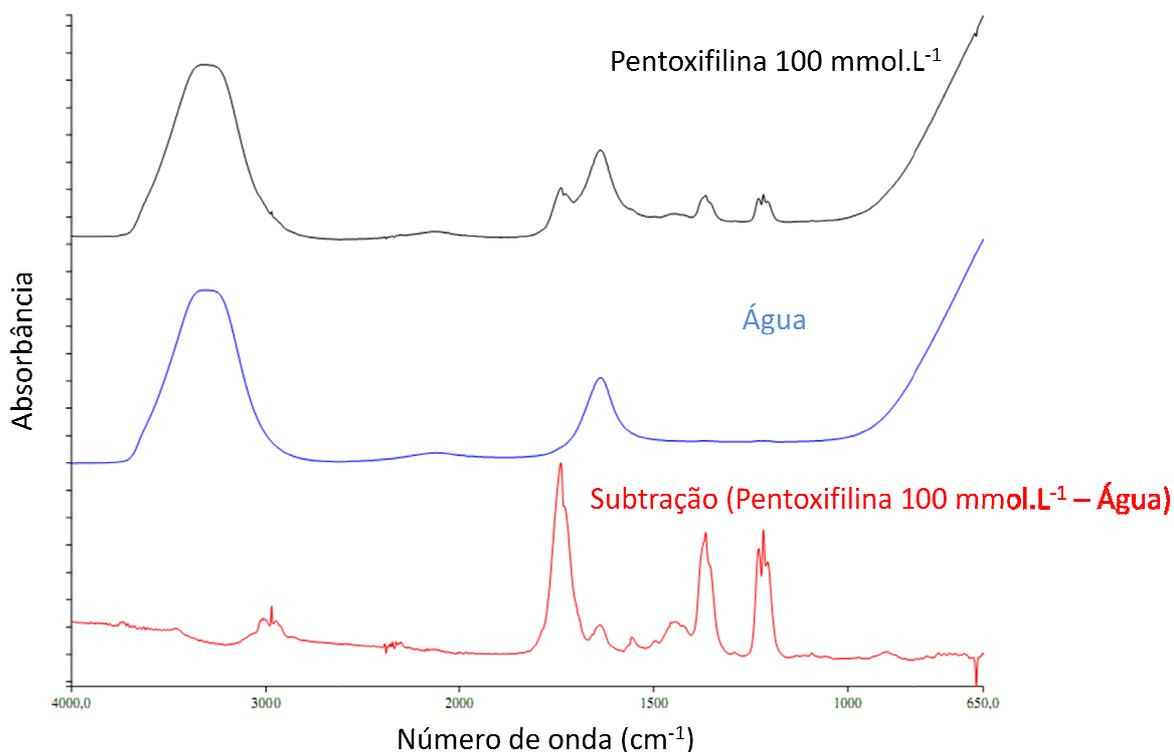
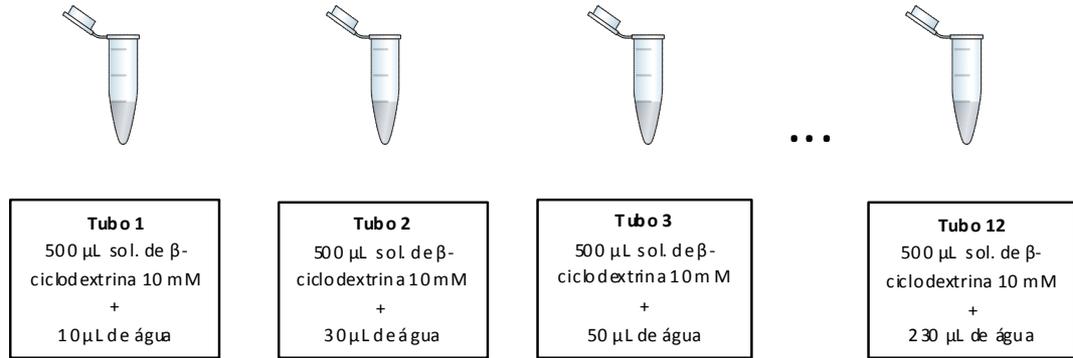
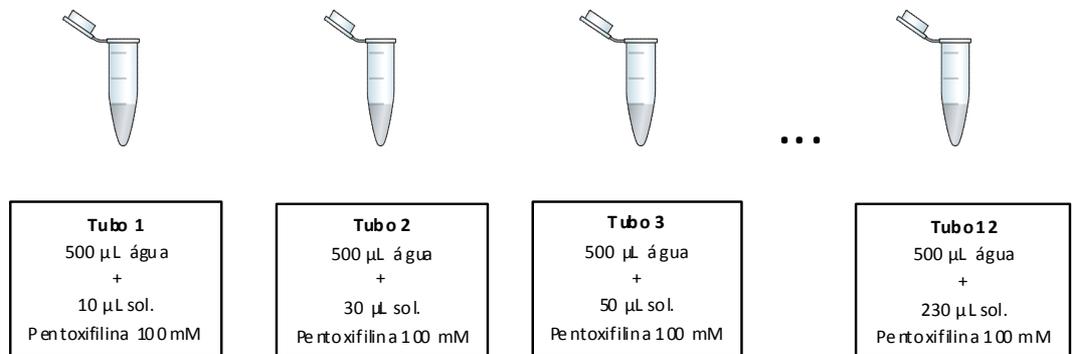


Figura 2.7 – Exemplo de subtração do espectro da água do espectro da Pentoxifilina em solução 100 mmol.L^{-1} .

A) Grupo AemBCD:



B) Grupo PemAgua



C) Grupo PemBCD:

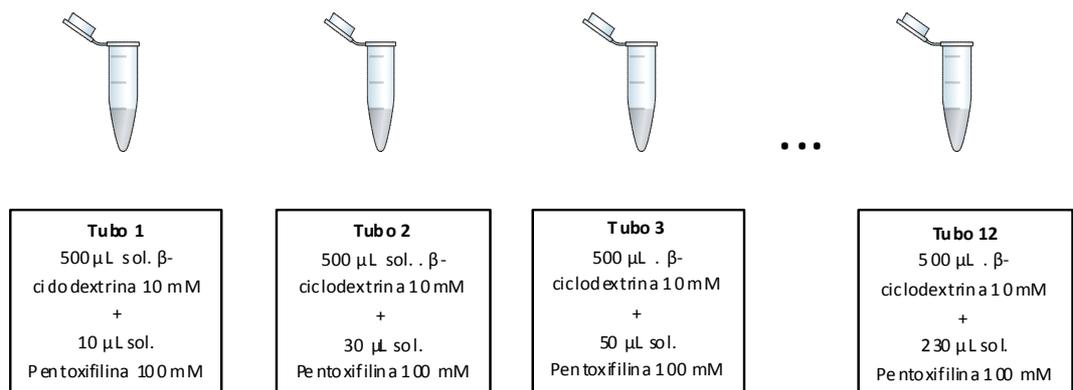


Figura 2.8 - Esquema da titulação realizada no FT-IR.

A análise no FT-IR da titulação com α -ciclodextrina foi realizada de modo análogo, em substituição da solução de β -CD.

2.4.2. Titulação com análise por Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

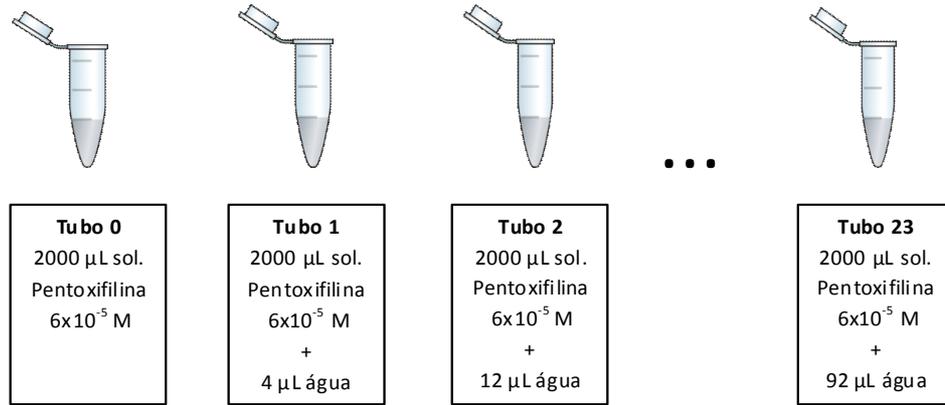
A titulação no equipamento UV-Vis procedeu-se de modo semelhante ao FTIR-HATR, sendo delineada em dois grupos: um grupo com adição de água em solução de Pentoxifilina (*AemPent*) e outro com adição de solução β -ciclodextrina em solução de Pentoxifilina (β CD*emPent*), vide Figura 2.9. Nesse caso, ajustou-se uma menor concentração nas soluções de Pentoxifilina para que não excedesse o valor de 2 na absorbância. O volume total em cada amostra foi maior (aproximadamente 2000 μ L), para um bom preenchimento da cubeta de quartzo utilizada na leitura e, além disso, o titulante e o titulado foram invertidos em relação ao FTIR-HATR, evitando prejuízos ocasionados pela extrapolação da absorbância da Pentoxifilina.

O espectrofotômetro da Varian, Cary 50 Scan, foi ajustado para leituras entre 800 e 200 nm no modo rápido e o experimento foi realizado em triplicata na temperatura ambiente. Antes das leituras das soluções nos tubos do tipo *ependorf*, foi registrado no aparelho o branco, sendo, nesse caso, água destilada. Os dados foram salvos no formato ASCII pelo programa do equipamento e, posteriormente, tratados no Origin 7.0, OriginLAB Corporation.

As soluções preparadas foram:

- Pentoxifilina 6×10^{-5} mol.L⁻¹;
- β -ciclodextrina 6×10^{-3} mol.L⁻¹.

A) Grupo AemPent



B) Grupo BCDemPent

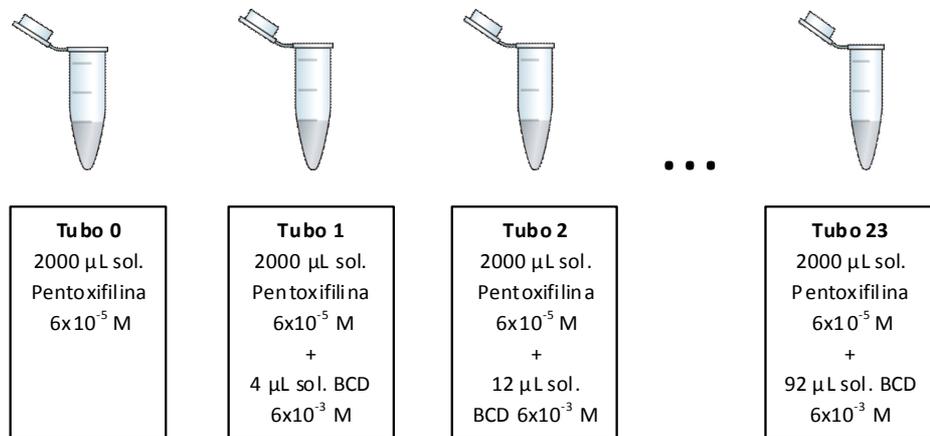


Figura 2.9 - Esquema da titulação realizada no UV-Vis.

2.4.3. Influência do pH na absorção da Pentoxifilina com análise por Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Foi realizada a leitura da absorção no UV-Vis da Pentoxifilina, livre e na presença de β -CD, em soluções com diferentes valores de pH que variaram de 1,00 até 12,00. Ao todo, foram preparadas 24 soluções: 12 contendo apenas Pentoxifilina na concentração $6,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, onde cada uma foi destinada a um dos 12 valores de pH; as outras 12 contendo Pentoxifilina na concentração $6,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ e β -CD na concentração $6,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (caracterizando uma estequiometria 1:1), onde cada amostra foi, mais uma vez, destinada a um dos 12 valores de pH estudados. Para o ajuste do pH dessas soluções utilizou-se HCl 6,0 e 1,0 mol.L⁻¹ e NaOH 15 % e 1,5 % (m/m). Tal análise foi realizada no mesmo aparelho e condições do item 2.4.2, não sendo triplicata. Os dados foram salvos no formato ASCII

utilizando o programa do equipamento e, posteriormente, tratados no Origin 7.0, OriginLAB Corporation.

2.4.4. Preparo e análise dos compostos de inclusão por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para o preparo dos composto de inclusão foi utilizado o método de liofilização (HEDGES, 1998; SUAREZ, CONSUEGRA *et al.*, 2014), uma vez que a Pentoxifilina apresenta uma boa solubilidade em água (PUBCHEM, 2015c). Esse método consistiu no preparo de duas soluções, uma contendo a molécula hóspede e outra a ciclodextrina, ambas em quantidades equimolares (1:1). As soluções foram misturadas e deixadas sob agitação constante por tempo suficiente para que o sistema entrasse em equilíbrio. Em seguida, foi resfriado rapidamente a fim de preservar as interações e, logo após, deixado em equipamento liofilizador até a obtenção de um sólido completamente seco (SUAREZ, CONSUEGRA *et al.*, 2014).

A Pentoxifilina, a β -ciclodextrina e o composto de inclusão foram analisados no aparelho FTIR-HATR, operando com 4 cm^{-1} de resolução, 16 scans e leitura entre 4000 a 650 cm^{-1} na temperatura ambiente. O experimento de RMN foi realizado em equipamento Bruker DRX 400 – Avence, a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, operando a 400 e 600 MHz, em tubos de quartzo de 5 mm. Realizou-se a técnica de supressão de água residual (WATERGATE) em todos os experimentos de ^1H . Como referência, o deslocamento químico da água foi tido com o valor de $\delta = 4,80$ em todas as análises. Os três sólidos supracitados foram dissolvidos separadamente em D_2O e analisados por parâmetros que envolviam o deslocamento químico dos hidrogênios (^1H) e o Efeito Nuclear *Overhauser*, esse último através do experimento ROESY. Para a caracterização estrutural e determinação da pureza da Pentoxifilina e ciclodextrinas utilizadas, outros experimentos de RMN uni e bidimensionais foram realizados.

2.4.5. Preparo e análise da mistura mecânica por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)

A mistura mecânica foi preparada pesando-se as duas espécies secas, Pentoxifilina e β -CD, para obtenção de duas quantidades estequiométricas, 1:1 e 2:1 (β -CD:Pentoxi). Os dois sólidos foram, então, plenamente misturados com o auxílio de um almofariz e um pistilo até

que a observação de uma mistura homogênea que foi posteriormente verificada no FTIR-HATR nas mesmas condições do composto de inclusão, como relatado no item 2.4.4.

2.4.6. Análise por calorimetria isotérmica de titulação (ITC)

Essa análise de titulação foi realizada tanto para o sistema Pentoxifilina/ β -ciclodextrina quanto para Pentoxifilina/ α -ciclodextrina. As titulações ocorreram a 15, 25 e 37 °C e consistiram em 50 injeções sucessivas, com intervalos de 300 segundos entre cada uma. A primeira injeção, de 1 μ L durante 2,0 s, foi descartada para se eliminar os efeitos de diluição do titulante na cela. Para a construção da curva, as outras 50 consistiram em injetar 5 μ L do titulante (solução de Pentoxifilina 60 mmol.L⁻¹) na cela com, inicialmente, 1,5 mL do titulado (solução de α - ou β -ciclodextrina 4 mmol.L⁻¹), cada injeção durando 10 segundos.

Para o tratamento de dados dos dois complexos de titulação analisados, utilizou-se o software Microcal Origin 5.0 para ITC. À curva de cada titulação foi subtraída a de diluição do fármaco, utilizada como branco do processo (SUAREZ, CONSUEGRA *et al.*, 2014; BUDRYN, PALE CZ *et al.*, 2015).

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Neste capítulo serão abordados os resultados dos experimentos descritos no item 2, sendo divididos em análises no estado sólido e análises em solução. A análise em estado sólido visou verificar a interação entre a Pentoxifilina e a β -ciclodextrina por meio da Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR), abordando a influência das interações nos modos vibracionais dessas espécies. Para as análises em solução aquosa foram utilizados a Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal, a Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) buscando estabelecer os sítios de interação e a estequiometria do sistema. A Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC), também um método realizado em solução aquosa, foi usada na caracterização termodinâmica e estequiométrica.

Para a apresentação desses resultados, os átomos das moléculas de Pentoxifilina e ciclodextrina serão descritos utilizando o código conforme Figura 3.1a e 3.1b.

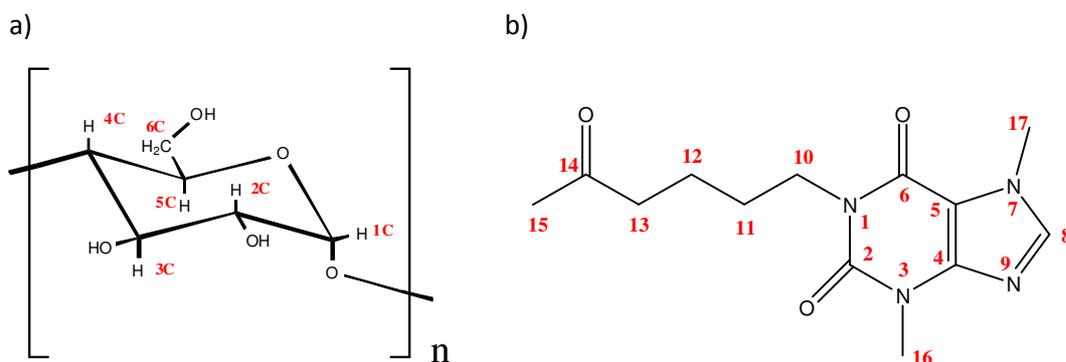


Figura 3.1 - Representação estrutural das moléculas estudadas com códigos representativos para os átomos. a) monômero de ciclodextrina; b) Pentoxifilina.

3.1. Análise do composto de inclusão no estado sólido

O composto de inclusão obtido, segundo descrição no item 2.4.4, bem como a mistura mecânica, descrita no item 2.4.5, foram analisadas por meio de FTIR-HATR. O objetivo dessa análise foi realizar um comparativo nos espectros do composto, da mistura mecânica, da molécula hóspede e da hospedeira, permitindo verificar interações intermoleculares e sugerindo inclusão pelas interferências nos modos vibracionais dessas espécies.

3.1.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR)

A Figura 3.2 apresenta três espectros de infravermelho sobrepostos: do composto de inclusão, da β -CD e da Pentoxifilina. Conforme tabelas 3.1 e 3.2, foram atribuídos alguns modos vibracionais da β -CD e Pentoxifilina, respectivamente, levando-se em consideração dados já bem estabelecidos na literatura (EGYED, 1990; INDRAYANTO, SYAHRANI *et al.*, 1998; DENADAI, SANTORO *et al.*, 2006). Nos resultados foram abordados apenas os de maior relevância na caracterização estrutural do sistema estudado e que tiveram alteração após a inclusão.

De forma geral, houve redução no número de modos vibracionais no composto de inclusão quando comparado à Pentoxifilina livre: bandas bem características, em 2960 e 2946 cm^{-1} , relativos ao estiramento C-H, não foram verificadas no composto de inclusão, além disso houve redução nos modos vibracionais das carbonilas, que será descrito em maiores detalhes posteriormente. Essa diminuição pode ser associada a uma menor mobilidade da molécula, sugerindo que ela interage com a β -CD.

A β -CD apresentou uma absorção larga centrada em 3285 cm^{-1} , sendo referente ao estiramento O-H de suas hidroxilas. Nessa mesma região, o composto de inclusão apresentou banda com intensidade um pouco menor e deslocada em relação à β -CD, em 3316 cm^{-1} . A Figura 3.3 é uma expansão do espectro da Figura 3.2. Mudanças no perfil dessa banda podem estar relacionados a modificações nas ligações de hidrogênio que ocorriam com as moléculas de água antes da inclusão, em um processo no qual estas saem da cavidade da ciclodextrina e dão lugar à molécula hóspede. Diferenças no grau de associação via ligações de hidrogênio durante a processo de complexação tem sido postulados para explicar mudanças reveladas no espectro de infravermelho (CRUPI, FICARRA *et al.*, 2007).

Tabela 3.1 - Relação de alguns modos vibracionais da molécula de β -ciclodextrina atribuídos através do seu espectro de absorção na região do infravermelho.

Região (cm^{-1})	Possível atribuição
3285	v (O-H)
2916	v (C-H)
1445 - 1210	δ (C-H)
1023	δ (C-O-C)

Tabela 3.2 - Relação de alguns modos vibracionais da molécula Pentoxifilina atribuídos através do seu espectro de absorção na região do infravermelho.

Região (cm^{-1})	Possível atribuição
2957	v assimétrico (C-H)
2945	v simétrico (C-H)
1718	v (C=O) carbonila alifática
1695	v (C=O) assimétrico, carbonilas do anel
1652	v (C=O) simétrico, carbonilas do anel
1432	δ (-CH ₃)
761 e 763	Vibração do esqueleto (-CH ₂ -)

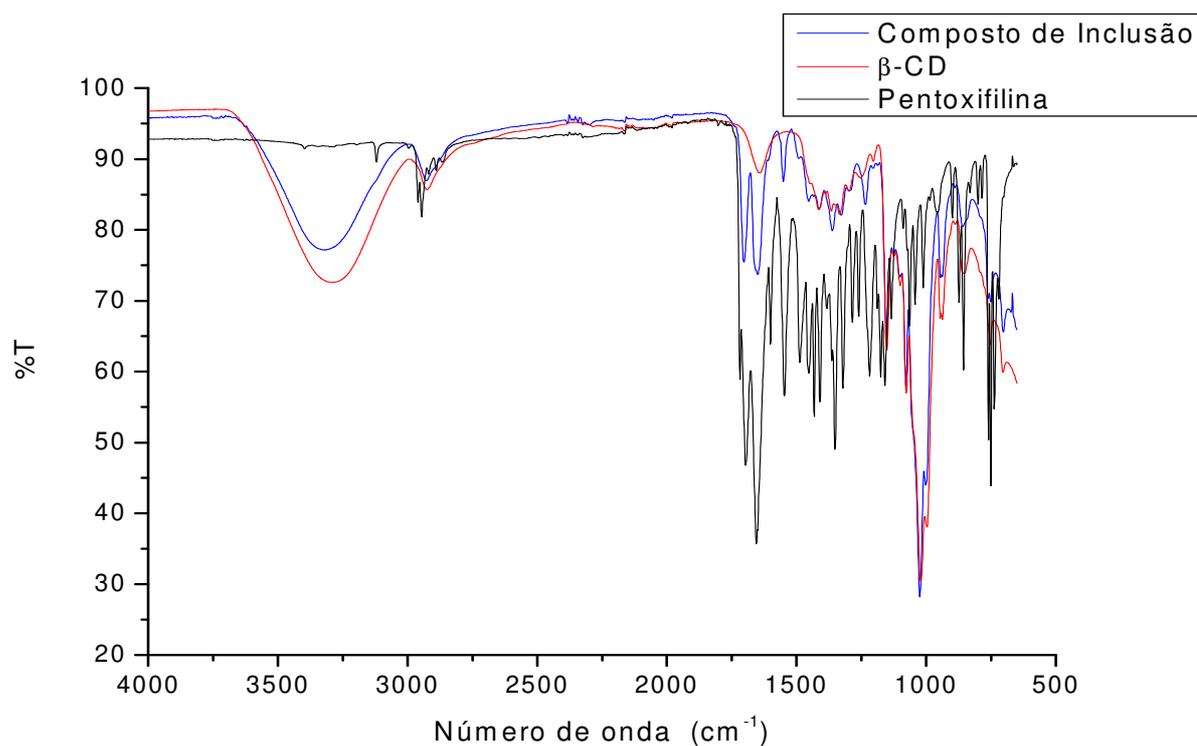


Figura 3.2 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina e composto de inclusão obtidos pelo módulo HATR, região entre 4000 e 650 cm^{-1} .

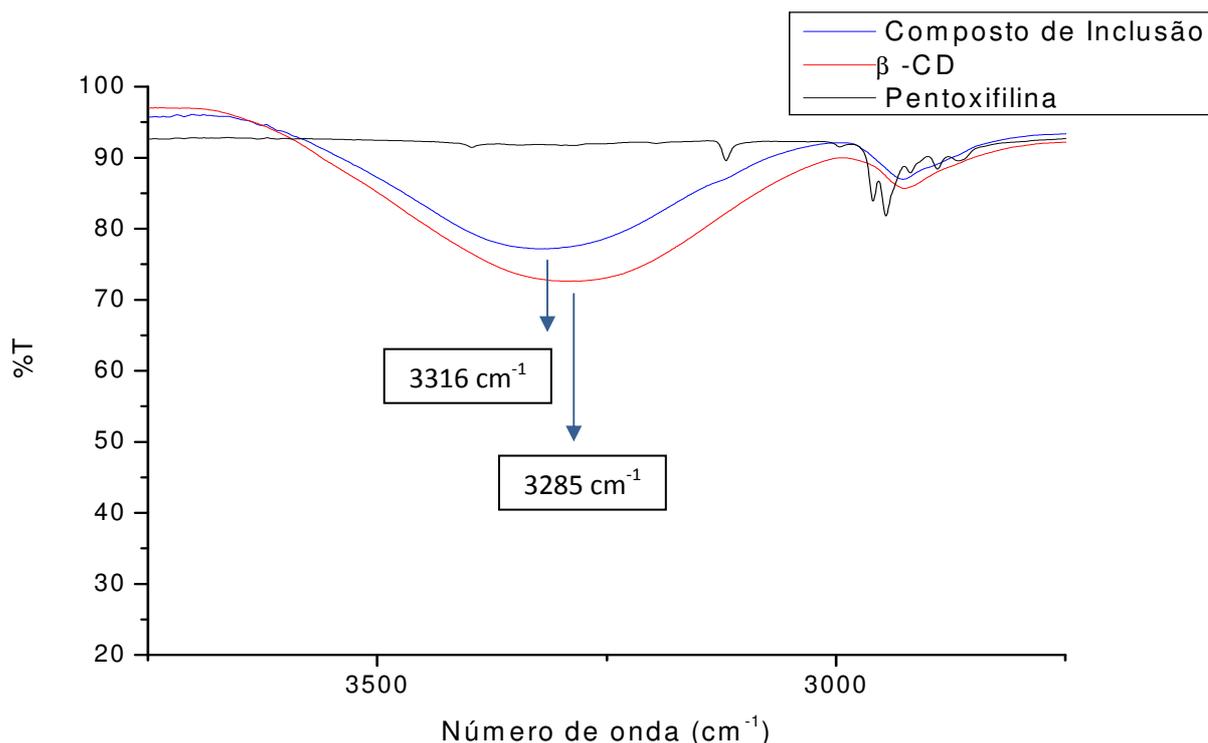


Figura 3.3 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina e composto de inclusão obtidos pelo módulo HATR, região entre 3750 e 2750 cm^{-1} .

Há três bandas importantes no espectro da Pentoxifilina: 1718 cm^{-1} , referente ao estiramento C=O da carbonila na cadeia alifática (carbono 14, conforme Figura 3.1b), 1696 e 1654 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O assimétrico e simétrico, respectivamente, das duas carbonilas presentes na estrutura do anel de seis membros (carbono 2 e 6, conforme Figura 3.1b). Optou-se por monitorar as referidas bandas por serem bem características, com bandas agudas e fortes, apresentando-se mesmo em soluções aquosas, conforme será visto em análises posteriores. Além disso, elas permitem que a molécula seja verificada em suas duas extremidades (no final da cadeia alifática e na estrutura dos anéis), possibilitando inferir sobre a estequiometria e geometria na qual a Pentoxifilina interage com a β -CD.

A Figura 3.4 mostra que houve uma modificação no perfil do espectro para o composto de inclusão comparado com o espectro de infravermelho da Pentoxifilina. Esse resultado indica uma interação envolvendo os três grupos carbonílicos. O estiramento assimétrico e simétrico, percebido na molécula livre, possivelmente coalesceu em um única banda no espectro do composto, observado em 1654 cm^{-1} , levando a crer que o processo de inclusão restringiu a vibração das carbonilas do anel e que essa parte esteja interagindo com a ciclodextrina, ou por meio da cavidade interna ou por ligação de hidrogênio com as hidroxilas

do exterior dessa molécula. Quanto à banda do composto em 1704 cm^{-1} , espera-se que seja da carbonila distante dos anéis, pois, dificilmente, haveria o desaparecimento de um modo vibracional tão intenso como um estiramento $\text{C}=\text{O}$ de carbonila, levando a uma possível interação nessa extremidade, mesmo que de forma menos efetiva.

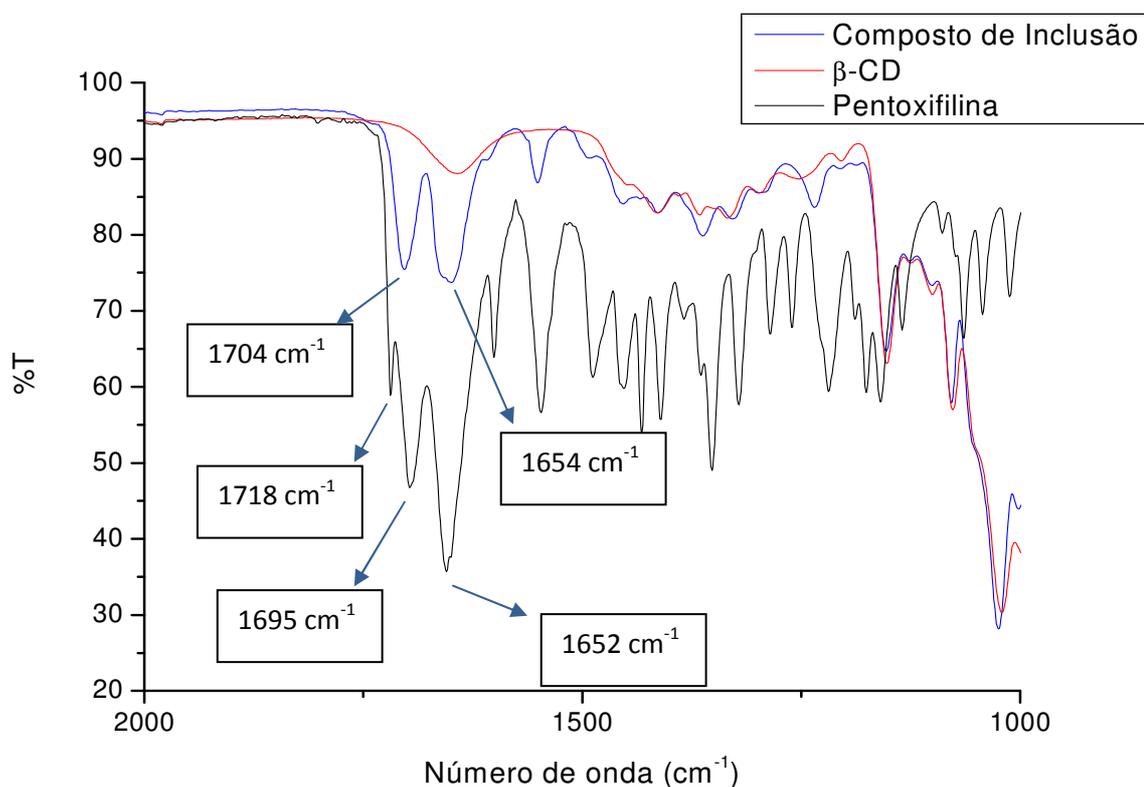


Figura 3.4 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina e composto de inclusão obtidos pelo módulo HATR, região entre 2000 e 1000 cm^{-1} .

A mistura mecânica é geralmente utilizada como padrão de não-complexação, entretanto há casos descritos na literatura onde esse procedimento também promove a interação entre as espécies estudadas (LIRA, 2007). A comparação entre os espectros da mistura mecânica com os do complexo de inclusão e das moléculas puras permitiu confirmar a interação nos grupos carbonílicos da Pentoxifilina pelo composto obtido na liofilização. Na Figura 3.5 tem-se esses espectros para a mistura mecânica e o complexo de inclusão preparados na estequiometria 1:1, onde o tracejado chama a atenção para a região de estiramento das carbonilas. Alterações na intensidade de algumas bandas podem indicar a região da molécula incluída (PERIASAMY, KOTHAINAYAKI *et al.*, 2015), porém, nesse estudo, a diminuição da intensidade das bandas carbonílicas da Pentoxifilina ocorreu tanto para o composto de inclusão como para a mistura mecânica, e de forma proporcional, o que

pode ser atribuído à presença da β -CD, não sendo a intensidade relativa, portanto, um parâmetro indicador de que haja a inclusão.

Por outro lado, o perfil do espectro nessa região para a mistura mecânica é semelhante ao registrado para a Pentoxifilina pura, onde as três absorções das carbonilas (1718 , 1695 e 1652 cm^{-1}) se apresentam de forma suficientemente clara para inferir que há pouca interação entre as espécies por esse tipo de preparo, confirmando que a liofilização é um bom método para a obtenção dos compostos de inclusão para esse tipo de sistema. Outra banda que corrobora para isso é 3285 cm^{-1} , da ciclodextrina, que também não teve alteração na mistura mecânica.

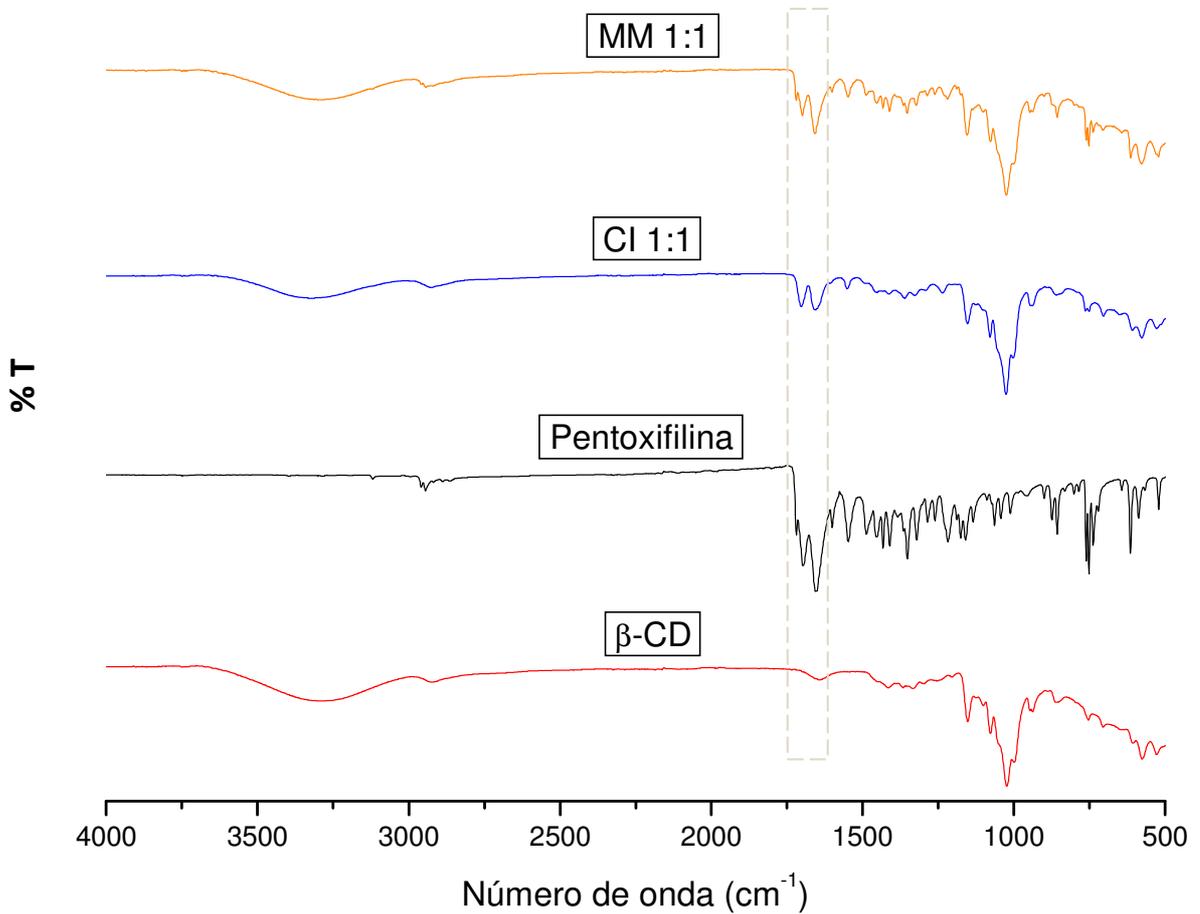


Figura 3.5 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina, composto de inclusão 1:1 e mistura mecânica 1:1.

Também foram preparados compostos de inclusão e mistura mecânica na estequiometria 2:1 (β -CD:Pentoxifilina) para verificar se os aspectos vistos no sistema 1:1 seriam acentuados e/ou modificados, gerando dados sobre a existência de equilíbrios múltiplos. A Figura 3.6 apresenta os espectros 2:1, além da Pentoxifilina e β -CD puros. Não houve maiores deslocamentos no composto de inclusão além daqueles já verificados para o sistema 1:1, tanto para os sinais das carbonilas da Pentoxifilina como do estiramento do grupo éter da β -CD. A mistura mecânica, novamente, apresentou bandas com valores de número de onda iguais aos registrados nas moléculas puras.

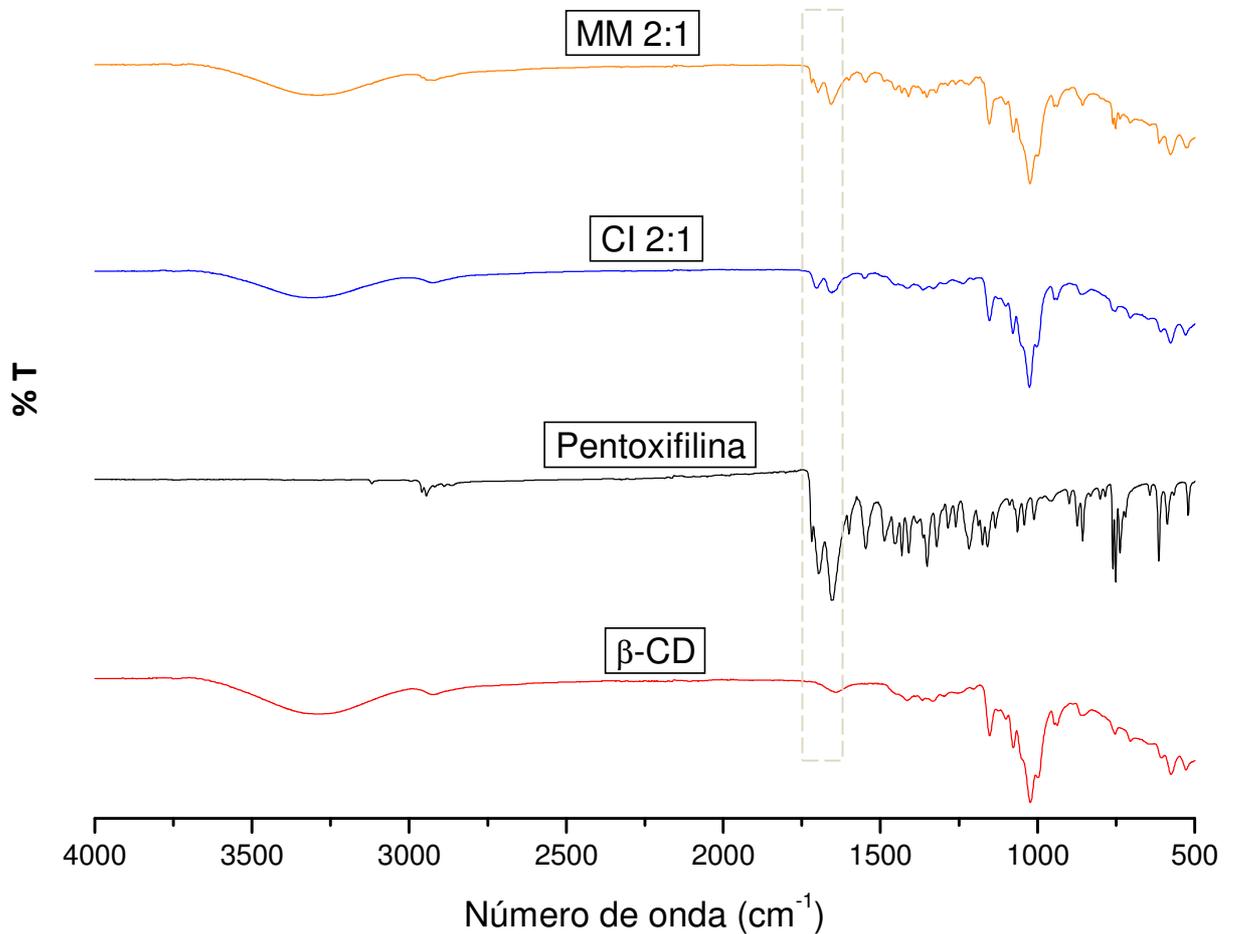


Figura 3.6 - Espectro de absorção na região do infravermelho da β -CD, Pentoxifilina, composto de inclusão 2:1 e mistura mecânica 2:1.

3.2. Análises em solução aquosa

Moléculas bioativas, como os fármacos, são transportadas e tem sua ação intrínseca em um ambiente rodeado de moléculas de água, haja vista o caminho e o seu local de atuação que é o organismo humano (FOTI, TYNDALE *et al.*, 2015). Analisar o complexo de inclusão em solução aquosa torna-se, então, imprescindível, pois as interações ocorrentes no estado sólido podem sofrer alterações de força ou mesmo diferenciar quando em contato com água. No propósito de verificar possíveis interações da Pentoxifilina com a β -ciclodextrina nesse meio, foram realizados experimentos de titulação no FTIR-HATR e no UV-Vis variando a razão molar entre as duas espécies estudadas, como descrito detalhadamente no capítulo 2, Materiais e Métodos. Alterações na absorção de grupamentos químicos em solução aquosa podem ser observados no FTIR-HATR, sendo fonte de informação acerca da região da molécula que está sendo incluída, bem como da intensidade dessa interação. Com objetivo semelhante, o UV-Vis foi utilizado para avaliar interferências nas transições eletrônicas apenas na molécula hóspede, visto que a molécula hospedeira, a ciclodextrina, não possui absorções nessa região do espectro.

3.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho por Reflectância Total Horizontal Atenuada (FTIR-HATR)

Na análise por FTIR-HATR foram considerados duas bandas da Pentoxifilina por se mostrarem proeminentes mesmo após a subtração do espectro da água: uma em 1699 cm^{-1} que, possivelmente, corresponde ao estiramento C=O da carbonila presente no final da cadeia alifática da molécula, e outra em 1638 cm^{-1} , que seria relativa aos estiramentos C=O simétrico e assimétrico das duas carbonilas do anel, as quais se sobrepõem no ambiente aquoso. Também foram monitoradas alterações no modo vibracional da molécula de ciclodextrina em 1032 cm^{-1} , referente ao estiramento C-O-C. O objetivo foi verificar alterações na intensidade da absorção desses grupos funcionais causados por interações entre a molécula hóspede e hospedeira, fato frequentemente observado na formação desse tipo de complexo no estado sólido, e já verificado nesse trabalho, mas pouco estudado em soluções (DE SOUSA, OLIVEIRA *et al.*, 2008; PADURARU, BOSINCEANU *et al.*, 2013; MAITY, CHATTERJEE *et al.*, 2014).

O Figura 3.7 apresenta o perfil da absorção em 1032 cm^{-1} do estiramento C-O-C da β -ciclodextrina.

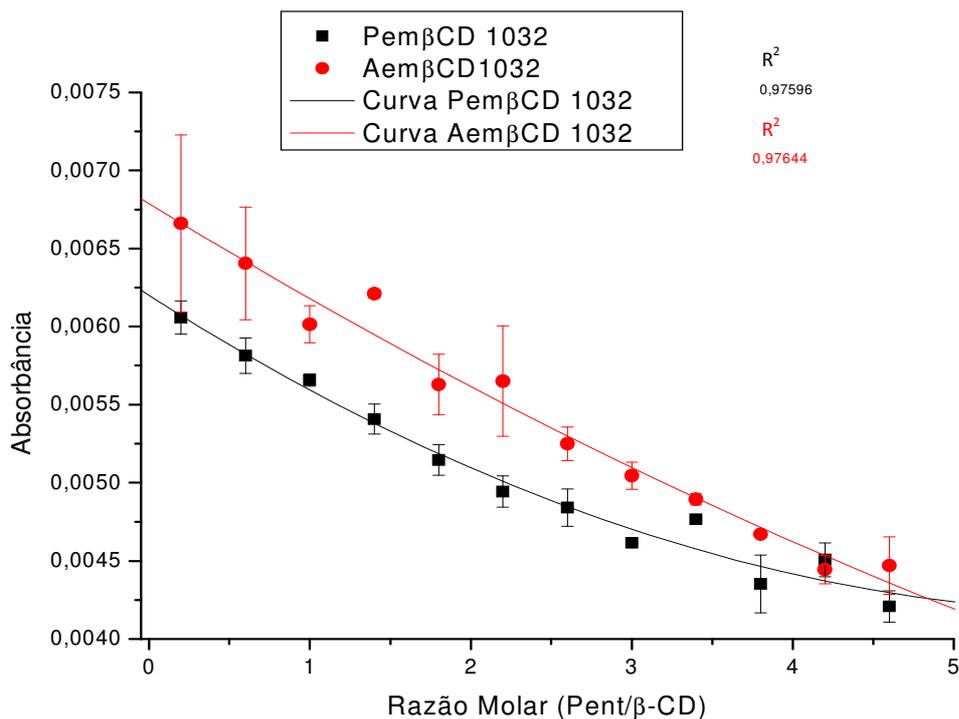


Figura 3.7 - Perfil da absorção em 1032 cm^{-1} da β -CD. Pem β CD = Titulação de solução de Pentoxifilina em solução de β -CD . Aem β CD= Titulação de água em solução de β -CD.

Todos os pontos da titulação de água em solução de β -CD (Aem β CD) divergiram daqueles de solução de Pentoxifilina em solução de β -CD (Pem β CD), com o primeiro e os dois últimos apresentando sobreposição dos desvios-padrão. A curva de ajuste polinomial para as duas populações revela que há uma tendência na diminuição da absorção desse modo vibracional quando na presença de Pentoxifilina, indícios de uma interação desta molécula na cavidade da β -CD que altera a liberdade do estiramento C-O-C, o que sugere a inclusão. Ressalva-se que um experimento de titulação configura uma diluição dos sistemas por se adicionar água ou solução, mesmo assim, os perfis diferenciados demonstram a perturbação na molécula de β -CD frente à Pentoxifilina. Os pontos finais são mais próximos e as duas curvas tendem a convergir, resultado de uma saturação do sistema.

Verificou-se, também, sinais referentes à Pentoxifilina. As Figuras 3.8 e 3.9 mostram a titulação monitoradas em 1699 e 1638 cm^{-1} , respectivamente.

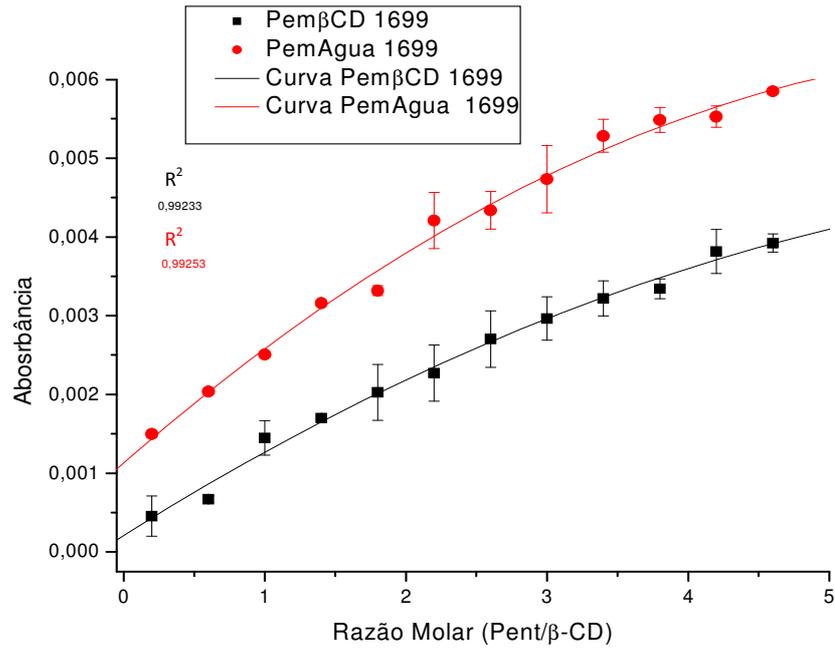


Figura 3.8 - Perfil da absorção em 1699 cm⁻¹ da Pentoxifilina. PemÁgua = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. PemβCD = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de β-CD.

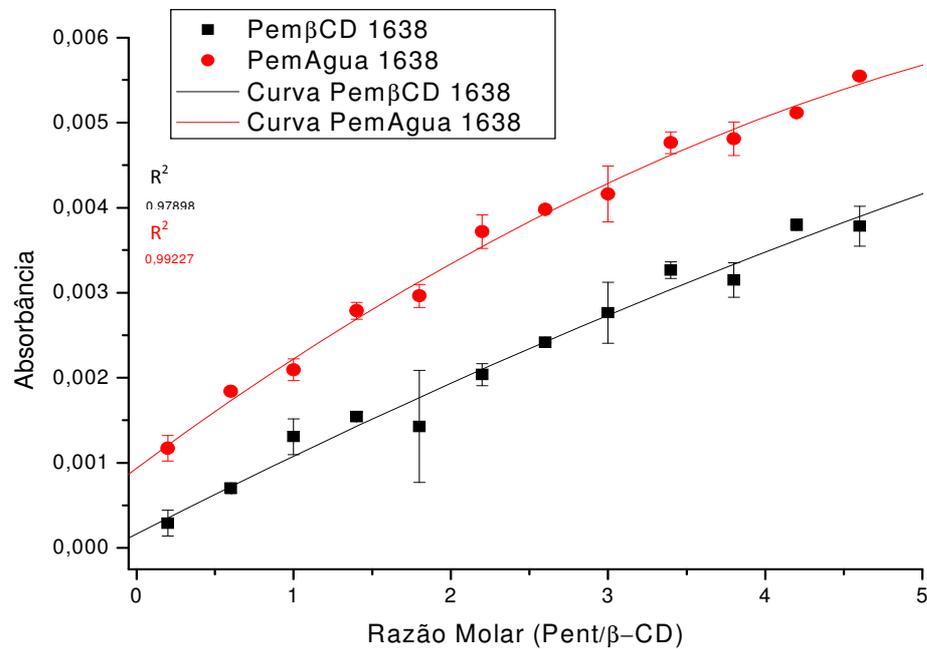


Figura 3.9 - Perfil da absorção em 1638 cm⁻¹ da Pentoxifilina. PemÁgua = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. PemβCD = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de β-CD.

A molécula hóspede também sofreu alteração em suas duas bandas, com diferenças escalares superiores às registradas na hospedeira e sem sobreposição dos desvios-padrão. Em 1699 cm^{-1} , tem-se uma diminuição na absorção em todos os pontos nos quais a Pentoxifilina se encontra na presença da β -CD (Figura 3.8). Estando, provavelmente, relacionada ao estiramento C=O da carbonila distante do anel, a mudança nessa banda indica que esse grupo faz interações com a cavidade interna ou a superfície externa da β -CD. As curvas de tendência ajustadas às duas populações de pontos (Pem β CD e PemÁgua) deixam evidente as diferenças nesses dois perfis.

Conforme apresentado na Figura 3.9, foi verificado comportamento semelhante em 1638 cm^{-1} , possível banda dos estiramentos C=O das carbonilas presentes no anel de seis membros. Os valores diferenciados em cada ponto do gráfico sugerem que há interações entre as moléculas estudadas. As curvas de ajuste, além de evidenciarem essa divergência, revela ainda um perfil com tendência linear para os pontos PemBCD, evidenciando uma maior interferência nessa absorção.

Pelos parâmetros observados, é possível estabelecer que a Pentoxifilina interage com a β -CD em suas duas extremidades, no que podem haver equilíbrios múltiplos envolvidos, com alterações evidentes na parte dos anéis em razão de um possível encaixe dessa estrutura na cavidade, maximizando o número de interações intermoleculares.

Para confrontar essa associação entre a Pentoxifilina e a β -CD e se ter um estudo mais completo para o sistema envolvendo a Pentoxifilina, escolheu-se outra ciclodextrina. Assim, foi realizada a titulação no FTIR-HATR com a α -CD, que possui um resíduo de glicose à menos e, conseqüentemente, um menor diâmetro na cavidade. Buscou-se verificar a intensidade das absorções das mesmas três bandas. As Figuras 3.10, 3.11 e 3.12, que serão mostrados a seguir, apresentam gráficos das absorções em 1032 cm^{-1} da α -CD, em 1699 cm^{-1} da Pentoxifilina e em 1638 cm^{-1} dessa mesma molécula, respectivamente.

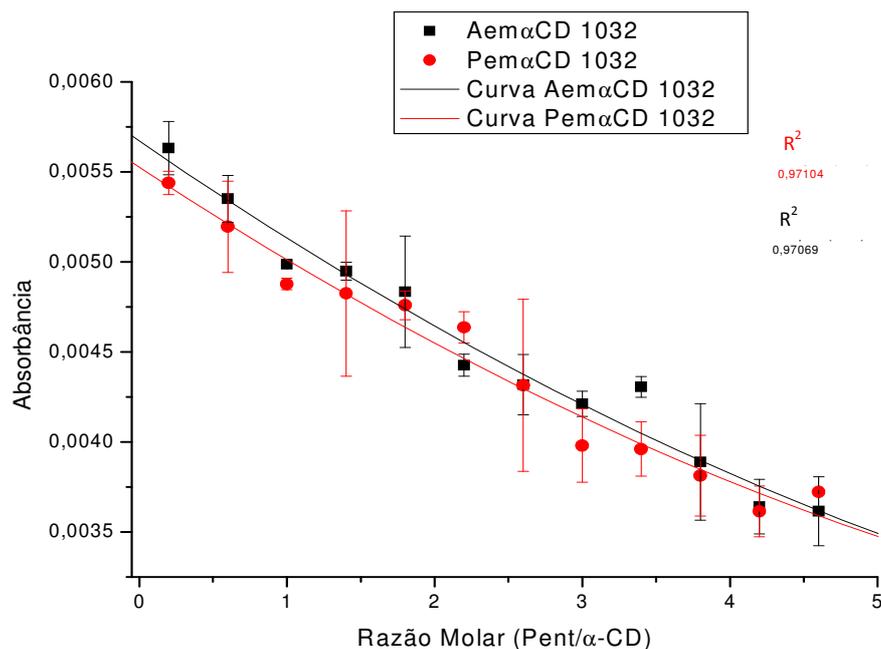


Figura 3.10 - Perfil da absorção em 1032 cm^{-1} da α -CD. Pem α CD = Titulação de solução de Pentoxifilina em solução de α -CD . Aem α CD = Titulação de água em solução de α -CD.

Para os valores de absorbância em 1032 cm^{-1} , os pontos relativos à titulação de água em solução de α -CD (Aem α CD) e solução de Pentoxifilina em solução de α -CD (Pem α CD) tiveram valores próximos, fato também observado pelas curvas de ajuste polinomial para as duas populações (Figura 3.10), que estão quase justapostas. Tais resultados indicam que há pouca influência da Pentoxifilina no estiramento C-O-C dessa ciclodextrina, com ausência de interações ocorrendo na cavidade interna, diferentemente do que ocorreu na β -CD. Isso poderia ser atribuído ao menor tamanho da cavidade da α -CD que não permite um bom acoplamento em nenhuma região da molécula hóspede.

Com relação às duas bandas da Pentoxifilina, verificou-se que o perfil da titulação de sua solução em água (PemÁgua) e em solução de α -CD (Pem α CD) apresentou pouca divergência, como pode ser percebido nas Figuras 3.11 e 3.12. Isso fortalece a ideia de um menor envolvimento das duas extremidades da molécula com a α -CD em relação à β -CD, que, por sua vez, apresentou diferenças escalares maiores entre os pontos, além de curvas mais espaçadas umas das outras.

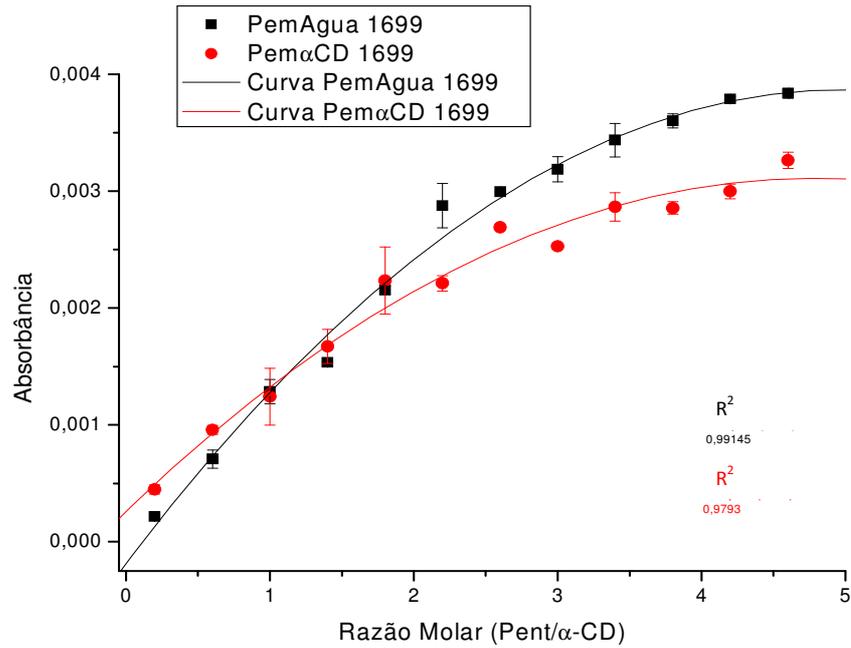


Figura 3.11 - Perfil da absorção em 1699 cm^{-1} da Pentoxifilina. PemAgua = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. Pem α CD = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de α -CD.

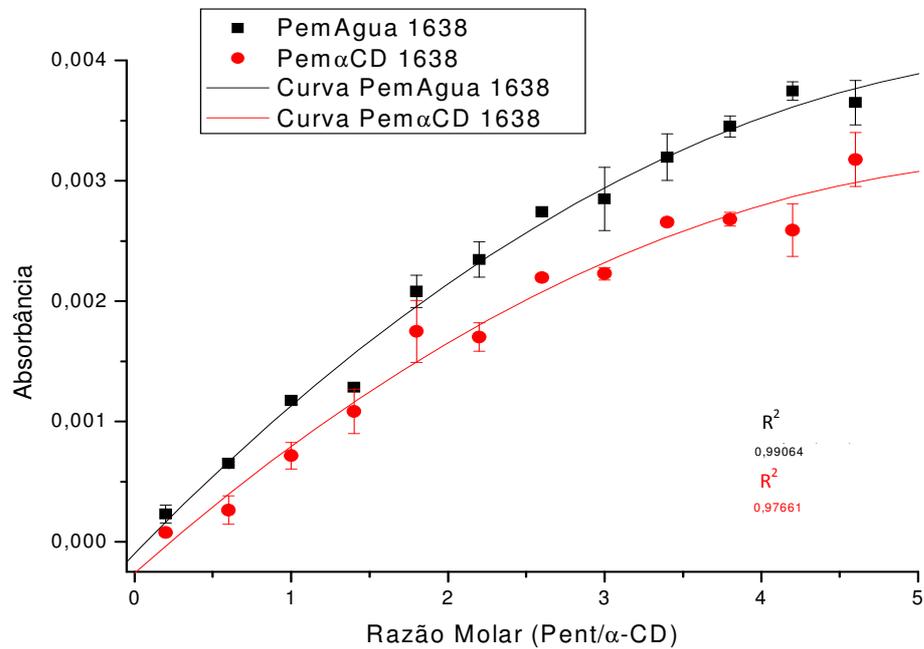


Figura 3.12 - Perfil da absorção em 1638 cm^{-1} da Pentoxifilina. PemAgua = Titulação de solução de Pentoxifilina em água. Pem α CD = Titulação de solução Pentoxifilina em solução de α -CD.

3.2.2. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Na região do ultravioleta-visível, a Pentoxifilina apresentou duas absorções (Figura 3.13), uma mais larga em 275 nm e outra mais intensa e estreita em 208 nm, coincidindo com dados da literatura (INDRAYANTO, SYAHRANI *et al.*, 1998). Aproveitando-se dessas absorções características e bem definidas, foi realizado uma titulação na qual o titulado foi a Pentoxifilina e o titulante a β -CD, contrário ao realizado no FTIR-HATR, com a intenção de manter a concentração de Pentoxifilina relativamente constante, pois pequenas variações de sua concentração poderia ocasionar diferenças significativas nas absorções, inviabilizando a linearidade da lei de Lambert-Beer. Desse modo, foi possível monitorar se houve perturbação desse espectro quando a β -CD estava presente na solução, já que essa não apresenta nenhuma absorção nessa faixa de energia.

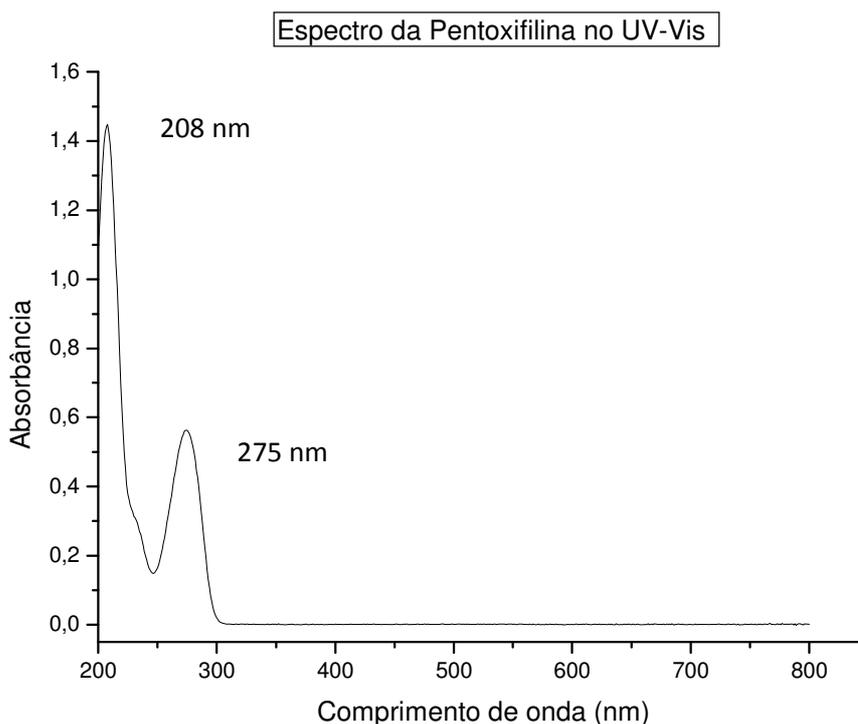


Figura 3.13 - Espectro no Ultravioleta-Visível da Pentoxifilina obtido numa concentração $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Com base nos espectros de absorção na região do ultravioleta-visível para a molécula de Pentoxifilina, não foi verificado deslocamento batocrômico e hipsocrômico por influência da β -CD no decorrer dos pontos da titulação, tanto em 275 nm, como em 208 nm. Entretanto, houve alteração no valor das absorções entre os conjuntos de pontos da titulação de água em solução de Pentoxifilina (AemPent) e solução de β -CD em solução de Pentoxifilina

(β CDemPent), como pode ser verificado nas Figuras 3.14 e 3.15, que são para as absorções em 275 e 208 nm, respectivamente.

O primeiro ponto da titulação corresponde à razão molar 0, ou seja, solução de Pentoxifilina ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Os valores nessa razão, tanto para AemPent quanto para β DCemPent, ficaram próximos, mostrando que houve reprodutibilidade nas leituras do aparelho. Na Figura 3.14 é possível verificar uma diferença entre as duas populações a partir do terceiro ponto, mostrando que a β -CD interfere nas transições eletrônicas da molécula Pentoxifilina de forma a aumentar essa absorção, provavelmente por incorporar em sua cavidade as estruturas que originam esse sinal, diminuindo as interações dessas com as moléculas de água e tornando os elétrons dos átomos da Pentoxifilina mais susceptíveis a absorver a radiação. O segundo ponto dessa titulação, de fração molar 0,2, apresenta valores próximos para as duas populações, sugerindo que o pequeno percentual de moléculas β -CD não foi suficiente para provocar uma variação. No terceiro ponto, de razão molar 0,6, têm-se o primeiro incremento e, no quarto, de razão molar 1, é observado uma maior diferença escalar nas absorções entre os pontos. Do quarto ponto adiante as absorções da β CDemPent começam a cair e adquirem comportamento semelhante à população AemPent, que corresponde ao branco e se compara a uma diluição da Pentoxifilina. Por esse dados, fica evidente a interação entre a β -CD e a região da Pentoxifilina responsável pela absorção em 275 nm, além disso dá indícios de uma estequiometria 1:1 pela maior diferença encontrada na razão molar 1.

De forma semelhante, as absorções em 208 nm (Figura 3.15) também mostraram diferenças entre AemPent e β CDemPent que culminam na razão molar 1, com posterior decaimento devido à diluição. A Figura 3.16 revela a diferença nos valores das absorções para as soluções de Pentoxifilina com ciclodextrina e Pentoxifilina (dados referentes às Figuras 3.14 e 3.15) para as duas absorções da molécula, onde fica claro a saturação do sistema nas proximidades da razão molar 1.

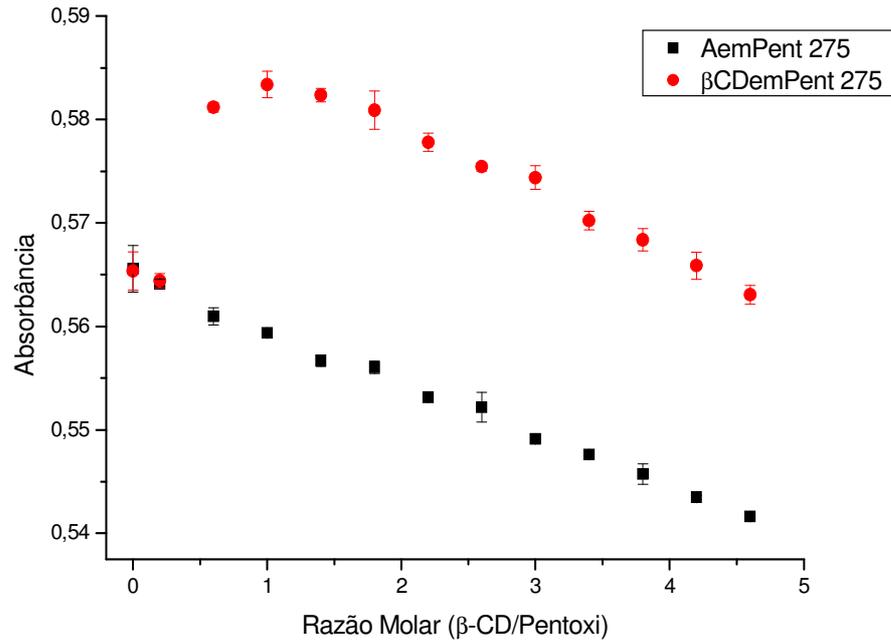


Figura 3.14 - Perfil da absorção da Pentoxifilina em 275 nm. AemPent = Titulação de água em solução de Pentoxifilina. βCDemPent = Titulação de solução de β-CD em solução de Pentoxifilina.

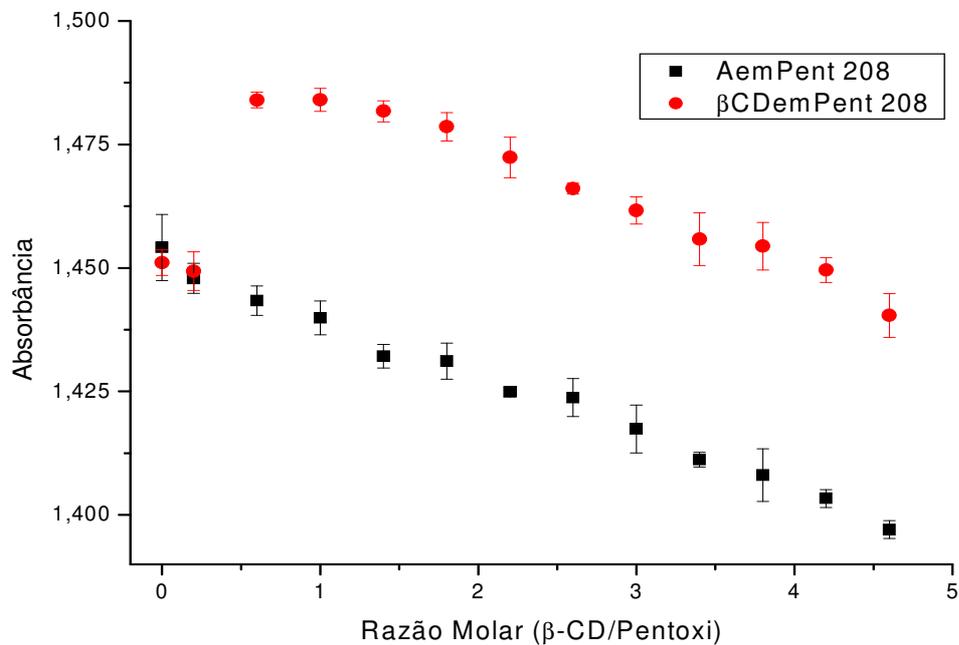


Figura 3.15 - Perfil da absorção da Pentoxifilina em 208 nm. AemPent = Titulação de água em solução de Pentoxifilina. βCDemPent = Titulação de solução de β-CD em solução de Pentoxifilina.

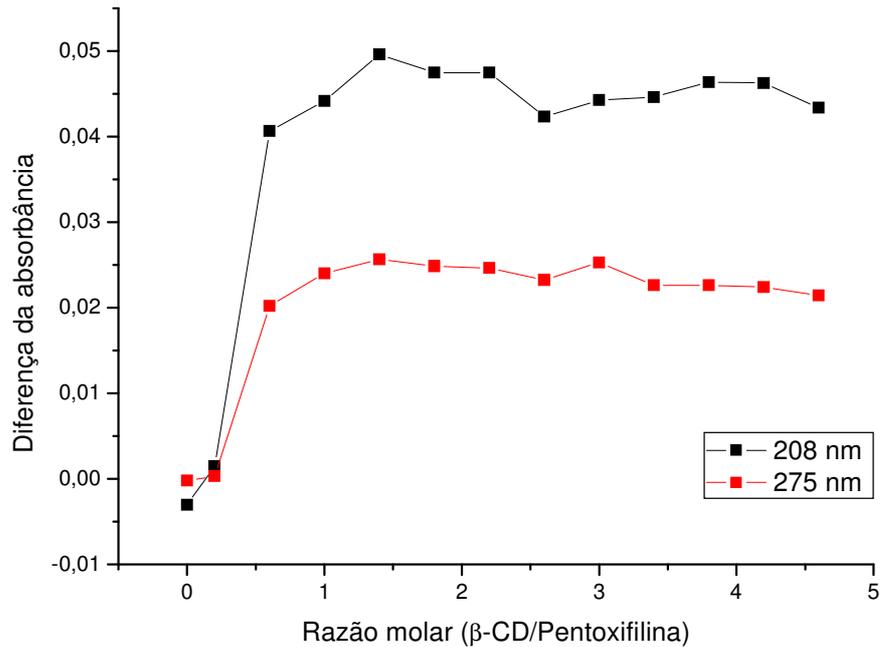


Figura 3.16 - Diferença nos valores de absorção da molécula Pentoxifilina [(Absorbância da solução Pentoxifilina + β-ciclodextrina) – (Absorbância da solução Pentoxifilina)] para 208 e 275 nm.

As ciclodextrinas, entre outras funcionalidades e aplicações, podem proteger a molécula hóspede quando incluída em seu interior, reduzindo os riscos de degradação molecular, seja por oxidação ou qualquer outro tipo de reação química (CRINI, 2014). Todo medicamento de uso oral leva um longo caminho até chegar ao local de atuação, passando, primeiramente, pelo trato gastrointestinal, em ambientes que possuem valores de pH variando de aproximadamente 1,7 (estômago) até maiores que 8,0 (duodeno) (CHARMAN, PORTER *et al.*, 1997). Foram realizadas leituras no UV-Vis de solução Pentoxifilina $6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs a fim de verificar possíveis alterações resultantes de degradação. A Figura 3.17 mostra os espectros sobrepostos e a Figura 3.18 é uma expansão da anterior enfatizando a região onde ocorreu os desvios, permitindo uma melhor visualização.

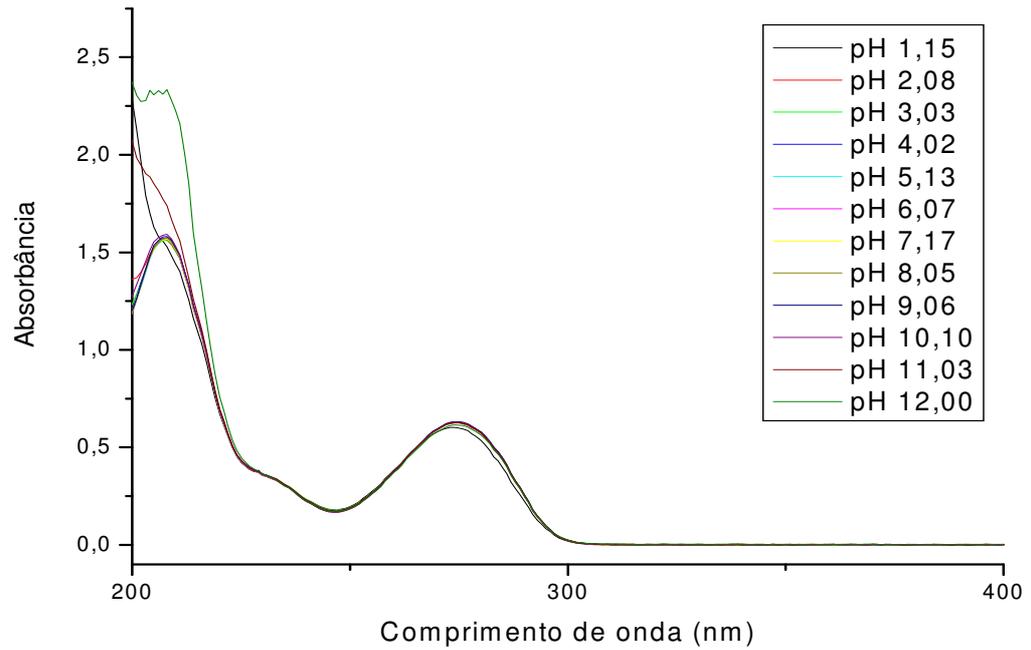


Figura 3.17 - Espectros de soluções Pentoxifilina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs.

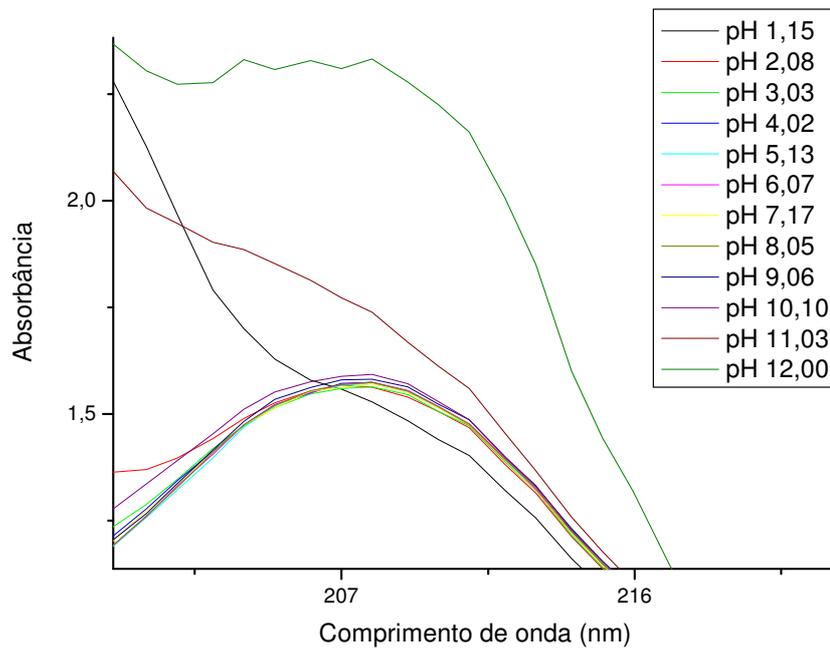


Figura 3.18 - Expansão dos espectros de soluções Pentoxifilina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs.

Houve modificações no perfil de absorção em 208 nm para os valores de pHs mais extremos, com grandes desvios em 1,15 , 11,03 e 12,00. Também em 2,08 foi possível perceber uma pequena alteração. Tal resultado permitiu investigar se esse comportamento se repete quando a molécula de Pentoxifilina se encontra em meio com β -CD ou se esta teria a

propriedade de proteger aquela de uma possível degradação em um meio ácido, como o estômago. Na Figura 3.19 têm-se os espectros das soluções que foram novamente verificadas, desta vez na presença de β -CD e com estequiometria 1:1. O resultado foi um perfil semelhante ao observado sem a ciclodextrina para todos os valores de pHs, mesmo aqueles que se mostraram alterados. A Figura 3.20 é uma ampliação da Figura 3.19.

Tal resultado indica que não há uma proteção da Pentoxifilina pela ciclodextrina quando o pH do meio é alterado, o que não necessariamente remete uma fraca interação entre as partes, tendo em vista que as alterações foram observadas em pHs extremos, onde o intenso processo de protonação/desprotonação em ambiente aquoso afeta sobremaneira as interações intermoleculares, e isso é observado mesmo em sistemas muito mais estáveis, como exemplo, nas inúmeras interações existentes em uma proteína globular, onde a desnaturação ocorre com mudanças de pH bruscas. Entretanto, esses dados dão indício de que o comprometimento entre as moléculas não é tão eficaz e isso será confirmado pela técnica de ITC.

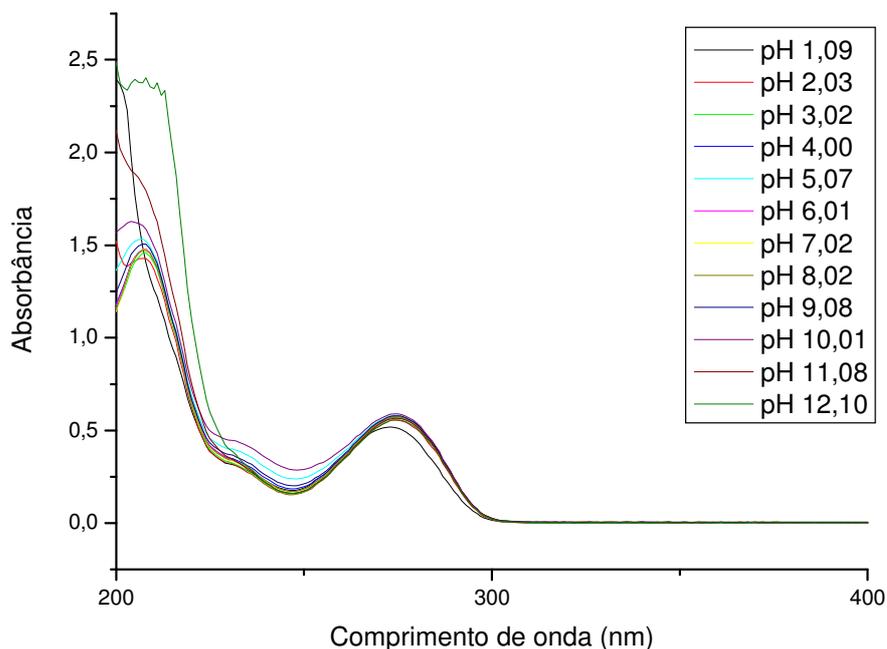


Figura 3.19 - Espectros de soluções Pentoxifilina e β -CD, ambas $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes pHs.

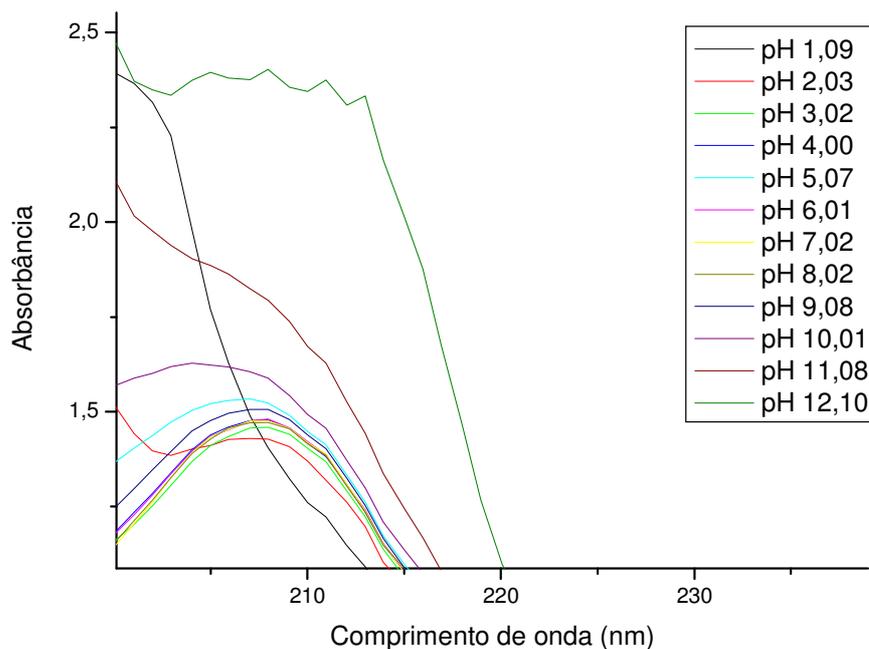


Figura 3.20 - Expansão dos espectros de soluções Pentoxifilina e β -CD, ambas $6,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, em diferentes pHs.

3.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Na análise de RMN foram utilizadas técnicas uni e bidimensionais com o intuito de caracterizar a molécula hóspede, hospedeira e o composto de inclusão. Os três foram relativamente solúveis em D₂O, sendo este utilizado como solvente em todos os experimentos.

A Figura 3.21 é o espectro de RMN de ¹H da β -ciclodextrina obtido a 600 MHz. As atribuições e os valores dos deslocamentos estão de acordo com a literatura (SCHNEIDER, HACKET *et al.*, 1998) e constam listados na Tabela 3.3. Os hidrogênios das hidroxilas não aparecem no espectro por serem lábeis, trocados pelo deutério do solvente.

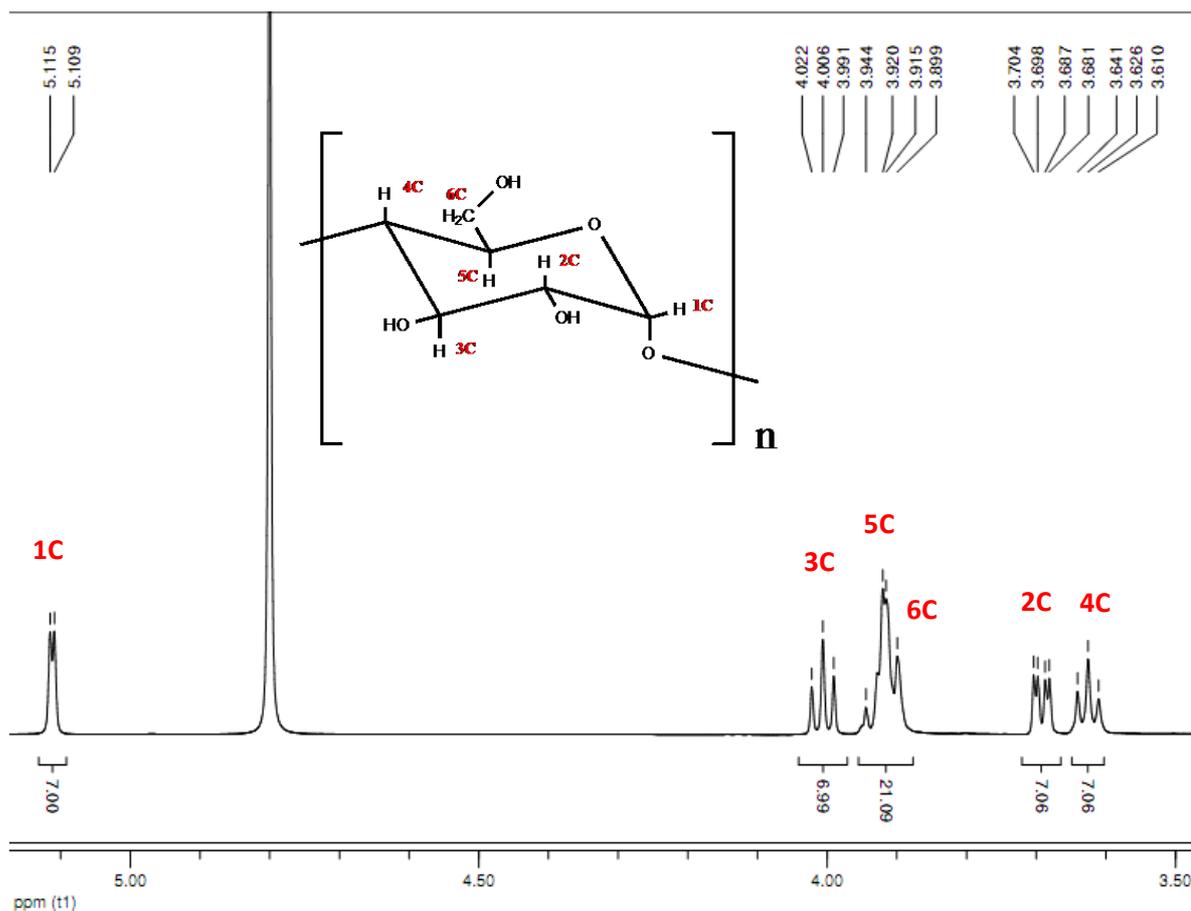


Figura 3.21 - Espectro de RMN de ^1H da β -ciclodextrina a 600 MHz.

Tabela 3.3 - Deslocamento químico (δ) e multiplicidade dos hidrogênios da β -ciclodextrina a 600 MHz.

Hidrogênio	1C	2C	3C	4C	5C	6C
Multiplicidade	Dupleto	Duplo-dupleto	Tripleto	Tripleto	Multipleteo	Multipleteo
Deslocamento químico /ppm	5,11	3,70	4,01	3,63	3,92	3,90

Também foi realizado o RMN de ^1H da Pentoxifilina utilizada nos experimentos a fim de caracterizá-la estruturalmente e verificar a sua pureza. A molécula apresenta 18 hidrogênios, nenhum lábil. O espectro está representado na Figura 3.22 com as devidas

atribuições, sinais integrados e o pico da água residual suprimido. Com exceção de 11 e 12, foi possível observar os picos muito bem espaçados, caracterizando o ambiente químico diversificado entre os hidrogênios, não apresentando nenhum sinal além dos que são inerentes à molécula, o que expressa a pureza da amostra. Mesmo devidamente ajustada, a integração superestimou ou subestimou o número de hidrogênios em alguns sinais, entretanto isso não afeta sobremaneira o número total quando se arredonda os valores. A Tabela 3.4 apresenta as atribuições e valores de deslocamento químico dos hidrogênios da molécula e está de acordo com dados da literatura (INDRAYANTO, SYAHRANI *et al.*, 1998; MONE e CHANDRASEKHAR, 2010).

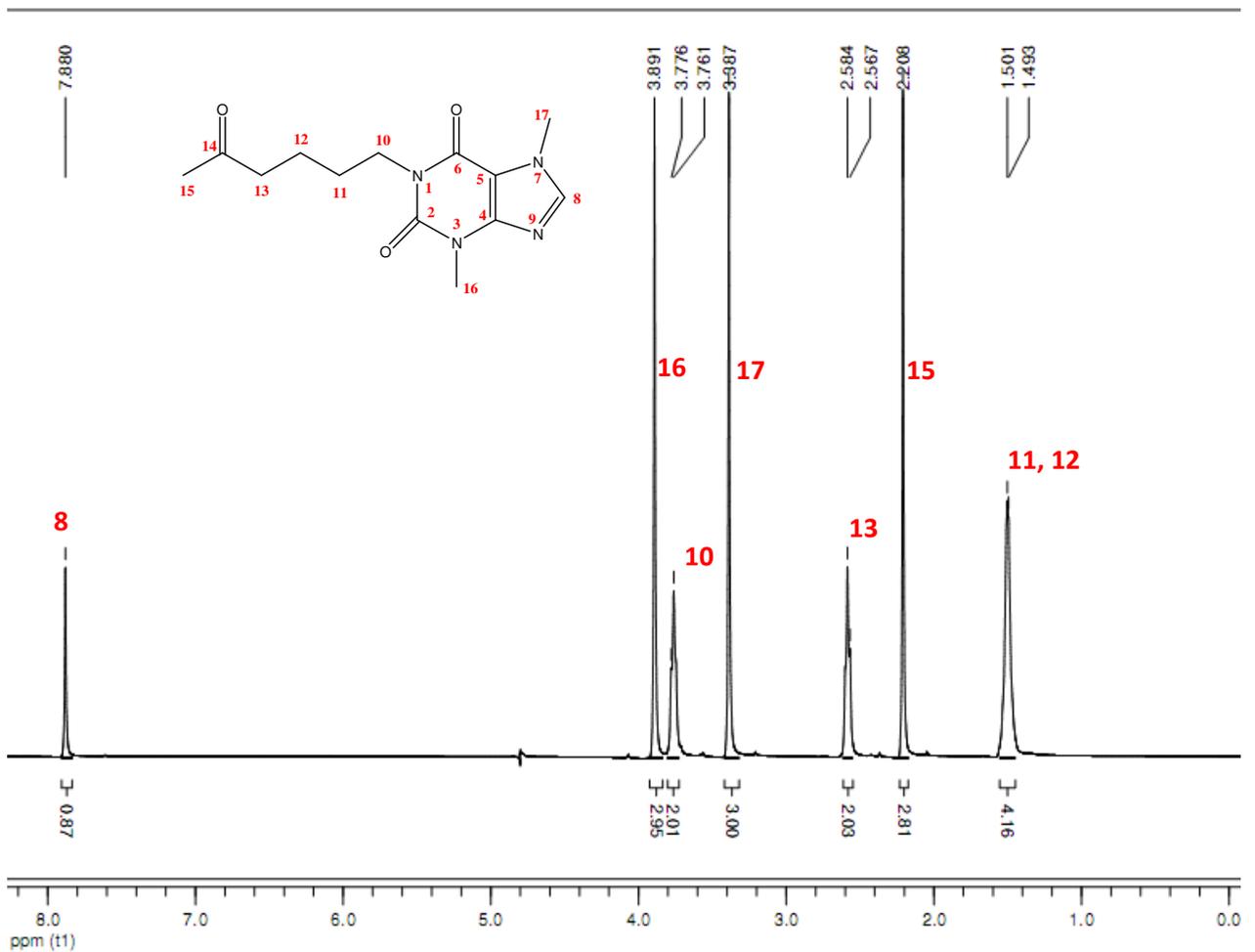


Figura 3.22 - Espectro de RMN de ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz.

Tabela 3.4 - Multiplicidade e deslocamento químico (δ) dos hidrogênios da Pentoxifilina a 400 MHz.

Hidrogênios	11,12	15	13	17	10	16	8
Multiplicidade	Multiplero	Singlo	Triplero	Singlo	Triplero	Singlo	Singlo
Deslocamento químico /ppm	1,50	2,21	2,58	3,39	3,76	3,89	7,88

O espectro da Figura 3.22 foi expandido nas regiões entre 1,40 e 2,65 ppm e entre 3,30 a 4,94 ppm para uma melhor visualização da multiplicidade e estão representados pelas Figuras 3.23 e 3.24, respectivamente.

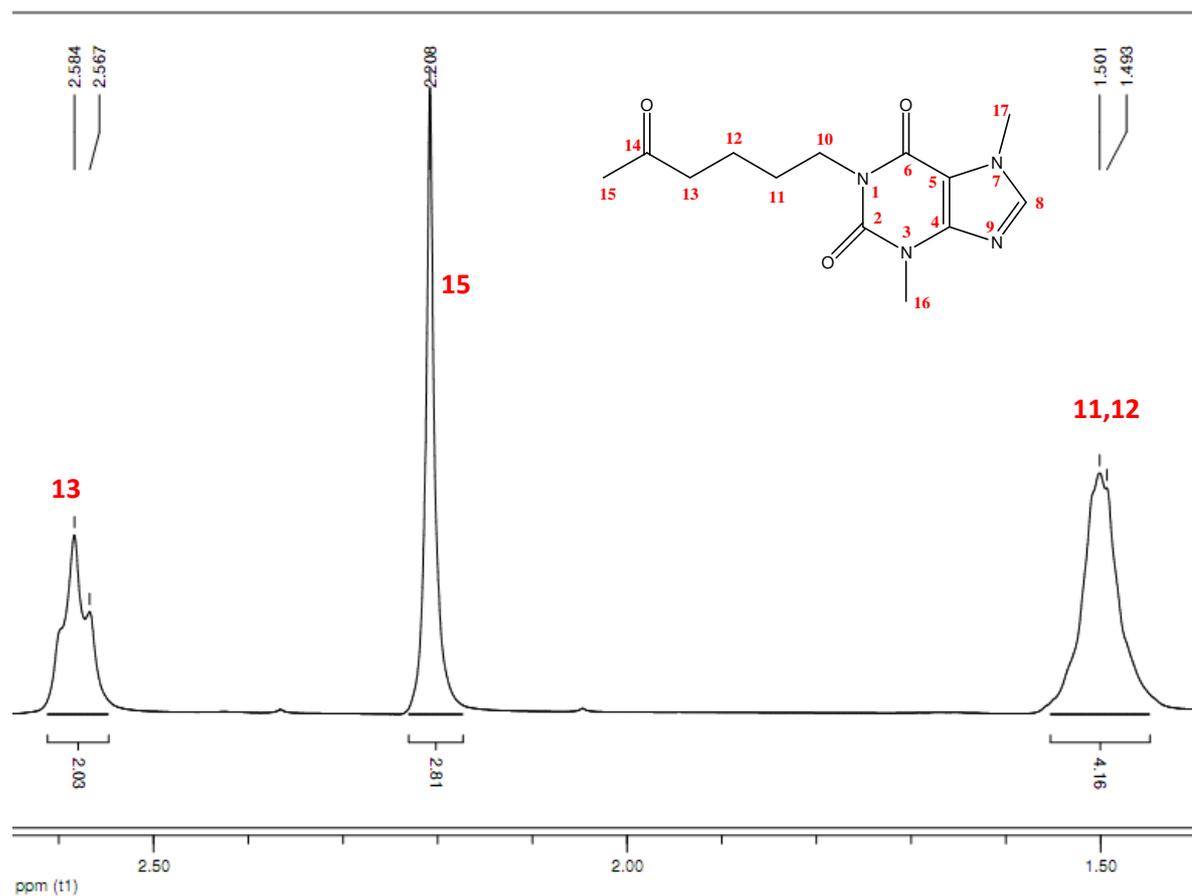


Figura 3.23 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz, entre 1,40 e 2,65 ppm.

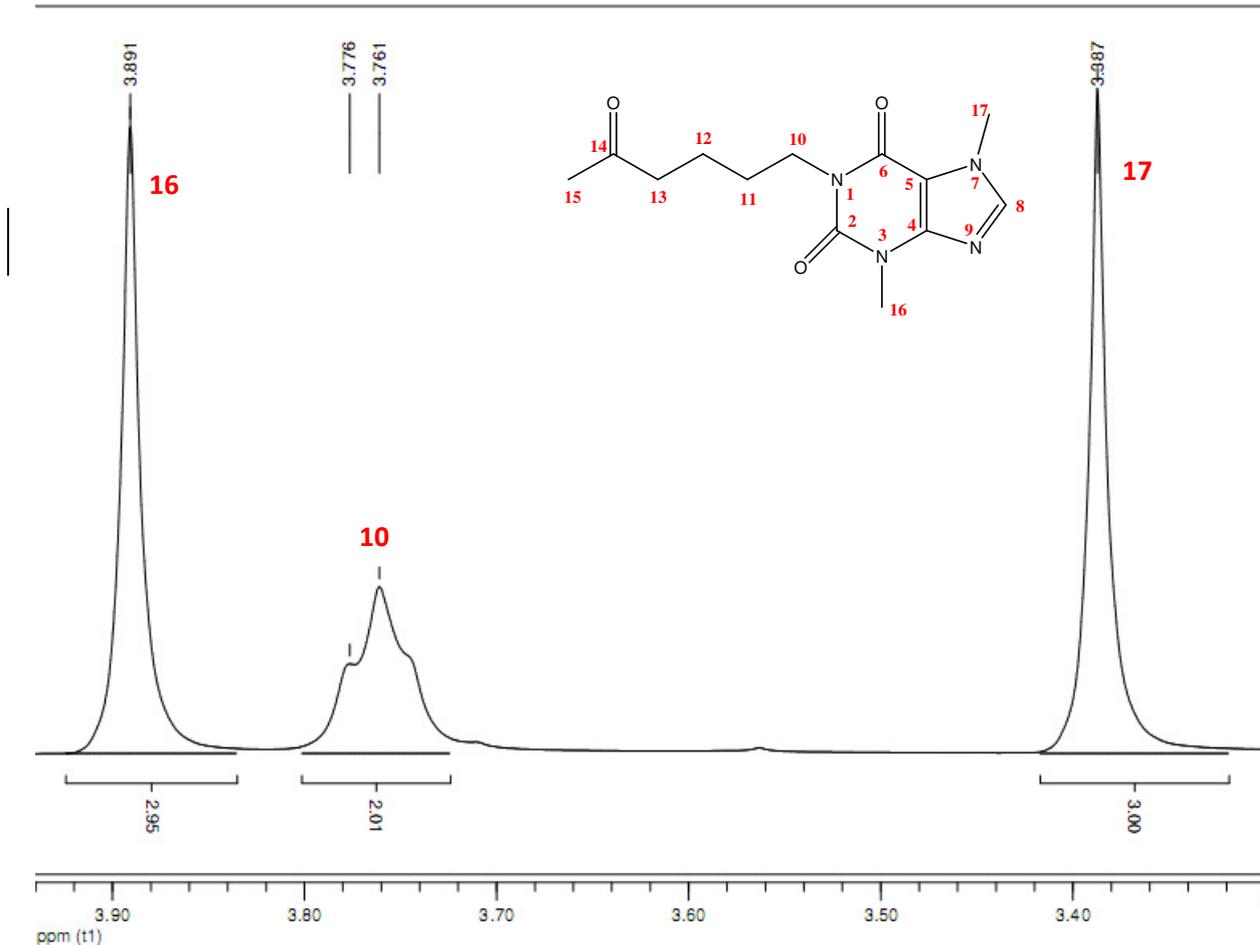


Figura 3.24 - Expansão do espectro de RMN de ¹H da Pentoxifilina a 400 MHz, entre 3,30 a 4,94 ppm.

O espectro de RMN de COSY ¹H-¹H mostra que os picos fora da diagonal, ou picos cruzados, tem origem na interação entre todos os hidrogênios que tem spin-spin significativos (PAVIA, LAMPMAN *et al.*, 2010) e serviu para corroborar na determinação estrutural da Pentoxifilina obtida no RMN de ¹H. Houve correlação significativa dos hidrogênios do multipletto 11,12 - não sendo possível distinguir os sinais isolados no RMN ¹H - com o hidrogênio 10. Como a técnica geralmente revela acoplamentos ²⁻³J_{H-H} (geminais ou vicinais), pode-se estabelecer que a correlação do hidrogênio 10 é com o hidrogênio vicinal 11. De forma semelhante, foi verificado correlação entre os hidrogênios 12 com o 13. O mapa COSY ¹H-¹H é visto na Figura 3.25.

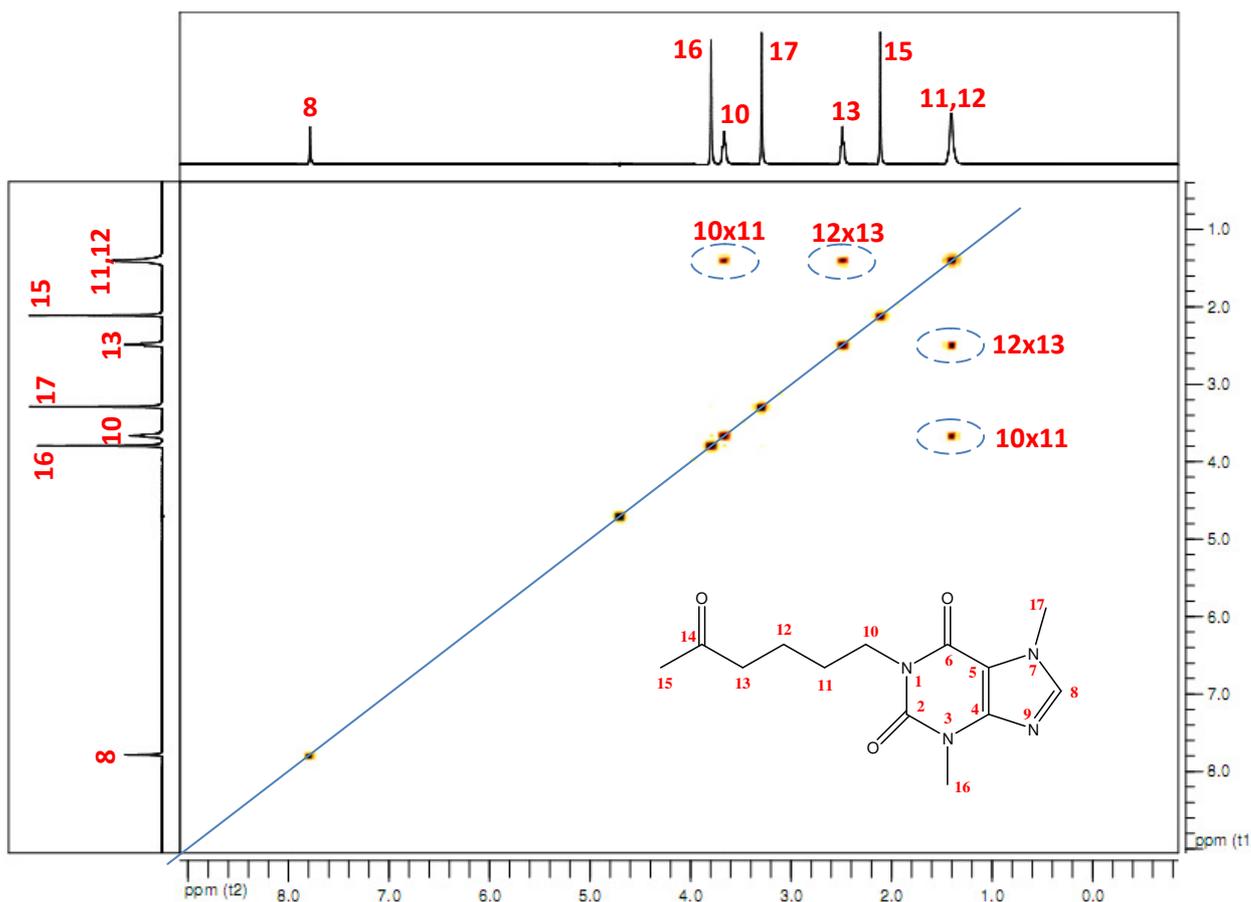


Figura 3.25 - Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H da Pentoxifilina a 400 MHz.

Tendo sido caracterizados os hidrogênios da molécula hóspede e hospedeira isoladamente, para avaliar a geometria, estequiometria e possíveis interações no composto de inclusão, foram realizados RMN de ^1H e ROESY ^1H - ^1H . A Figura 3.26 mostra o espectro de ^1H do composto. Alguns sinais, compatíveis com o perfil registrado nas moléculas isoladas, foram facilmente identificados, outros se sobrepuseram na região entre 3 e 4 ppm, mas também foram identificados, conforme expansão na Figura 3.27.

Um registro da inclusão pode ser observado através da variação dos deslocamentos químicos das moléculas isoladas e inclusas, onde são utilizados tanto os sinais da molécula hóspede, como dos hidrogênios internos (3C e 5C) da ciclodextrina (CHATTERJEE, MAITY *et al.*, 2014; RAJENDIRAN e SANKARANARAYANAN, 2015). Entretanto, os sinais da ciclodextrina apresentam-se sobrepostos mesmo em espectros de maior resolução, tornando de difícil análise. Acompanhar os deslocamentos dos hidrogênios da molécula hóspede possibilita melhores conclusões, pois, além das variações, é possível estabelecer a parte da molécula que está incluída. No caso da Pentoxifilina, houve ainda maiores vantagens porque

os picos referentes aos seus hidrogênios apresentaram-se bem espaçados pela diversidade do ambiente químico de cada um, como pode ser verificado na Figura 3.22.

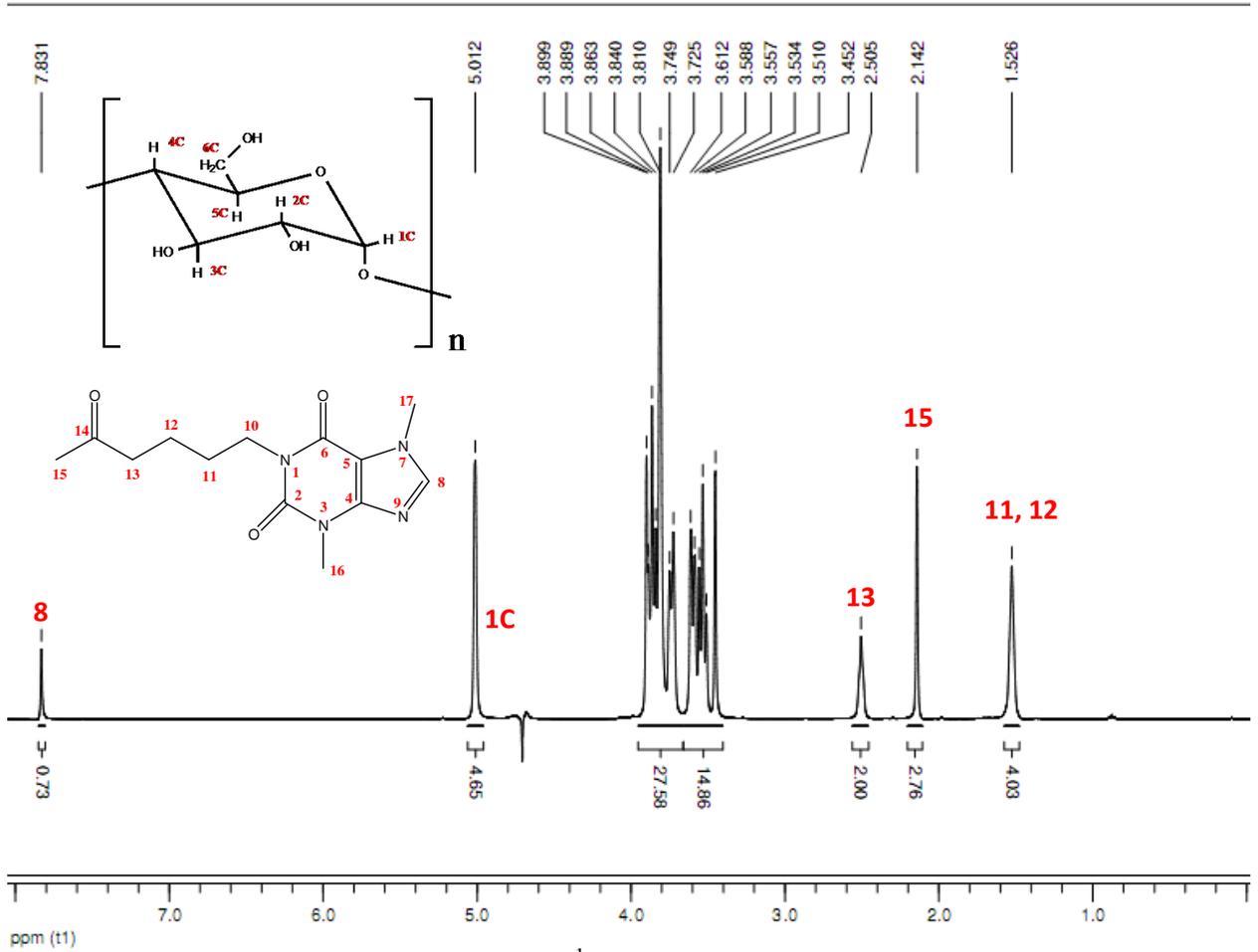


Figura 3.26 - Espectro de RMN de ^1H do composto de inclusão a 400 MHz.

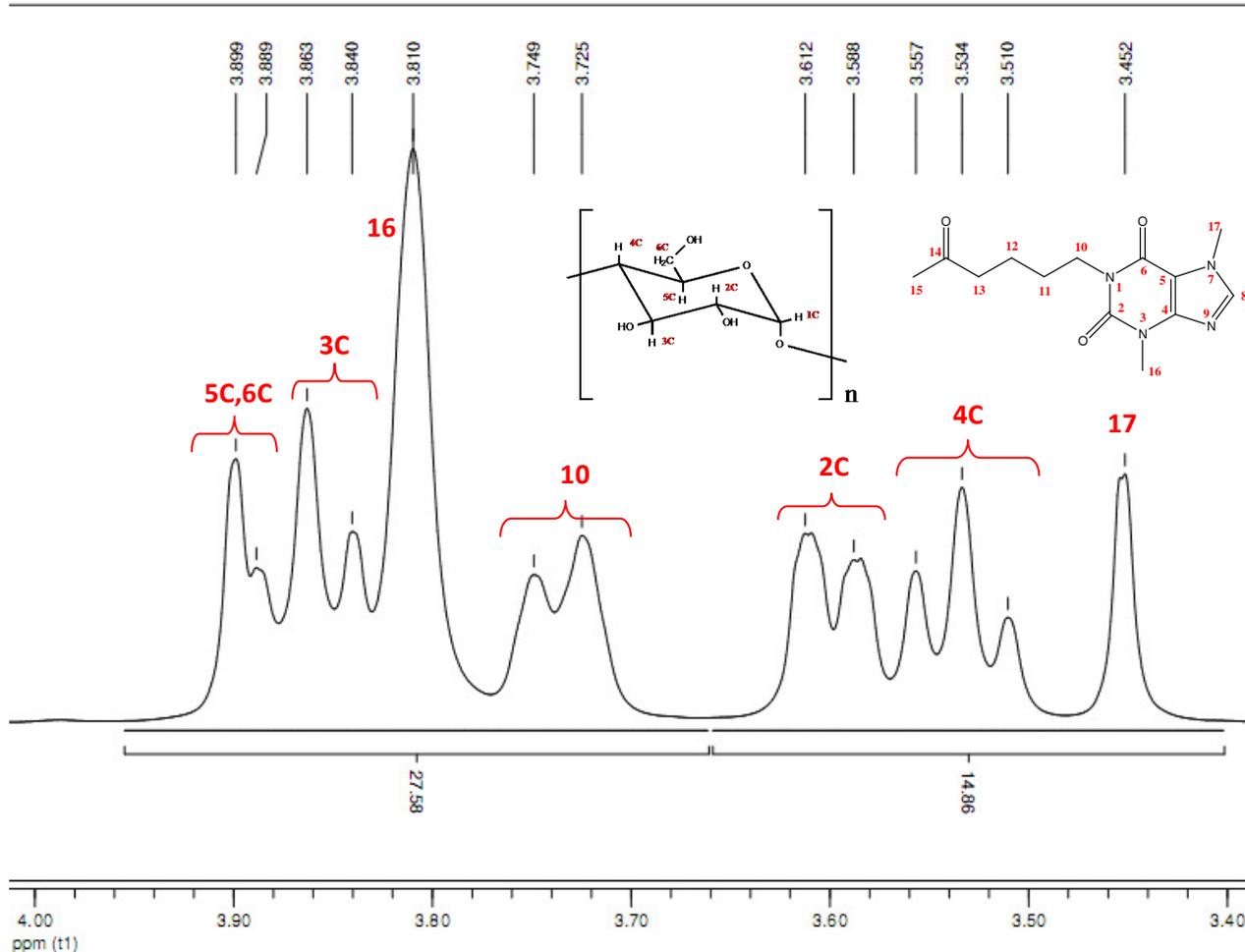


Figura 3.27 - Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto de inclusão a 400 MHz, região entre 3,4 e 4,0 ppm.

A Tabela 3.5 mostra os valores do deslocamento químico para os hidrogênios da Pentoxifilina e composto de inclusão 1:1 β -CD/Pentoxi.

Tabela 3.5 - Valores do deslocamento químico para hidrogênios da Pentoxifilina e composto de inclusão.

Hidrogênios	11,12	15	13	17	10	16	8
δ Pentoxifilina	1,50	2,21	2,58	3,39	3,76	3,89	7,88
δ Composto de inclusão 1:1	1,62	2,24	2,60	3,55	3,82	3,90	7,93
$\Delta\delta$ (Composto 1:1 – Pentoxifilina)	0,12	0,03	0,02	0,16	0,06	0,01	0,05

Foi possível verificar que todos os deslocamentos químicos da Pentoxifilina tiveram um incremento após a inclusão. Alguns hidrogênios, entretanto, tiveram maiores alterações, com destaque para 11, 12 (que não puderam ser diferenciados no RMN ^1H) e 17. Uma alteração pequena ocorreu nos hidrogênios 10 e 8. Para todos os demais a variação foi ainda menor.

Os hidrogênios 17, que sofreram a maior alteração em seu deslocamento químico, estão presentes no substituinte metil do anel de cinco membros. Tais alterações são resultado da mudança do ambiente químico em que esses hidrogênios se encontraram antes e após a inclusão, dando evidências de que podem estar protegidos na cavidade da ciclodextrina de forma mais intensa e sugerindo uma inclusão na estrutura do anel que abrange até a parte alifática intermediária da molécula. Isso explica os sinais dos hidrogênios 11,12, que também foram fortemente modificados. Corroborando com essa ideia, as alterações menos intensas nos hidrogênios 10, situados logo no início da cadeia, e no hidrogênio 8, ligado diretamente ao anel de cinco membros. Os hidrogênios 15, 13 e 16 tiveram uma pequena modificação no deslocamento após a inclusão, mas isso não pode ser desconsiderado já que no sistema pode haver equilíbrios múltiplos, não descartando a possibilidade de uma inclusão na extremidade oposta ao anel.

Foi realizado o experimento ROESY ^1H - ^1H para correlacionar os hidrogênios que estão espacialmente próximos no composto de inclusão, o resultado é apresentado na Figura 3.28, onde as correlações intermoleculares consideráveis foram destacadas com linhas tracejadas em azul. Outros sinais se referem a correlações de hidrogênios da mesma molécula e, portanto, não foram destacados por não serem dados relativos à inclusão.

Houve interação entre o hidrogênio 8 da Pentoxifilina com os hidrogênios 6C, 5C e 3C da β -CD. O hidrogênio 8 está localizado no anel de cinco membros, o experimento revela que ele se encontra próximo à hidrogênios internos (5C e 3C) da β -CD, indicando uma inclusão por essa extremidade da molécula e confirmando o resultado da variação de deslocamento químico observada no RMN ^1H . Os hidrogênios 11 e 12, presentes na porção intermediária da cadeia alifática, também apresentaram correlação com os hidrogênios 6C, 5C e 3C da β -CD. Além destes, 11 e 12 também tiveram correlação de menor intensidade com os hidrogênios 2C e 4C, o que remete a uma comprovação da proximidade entre as duas moléculas estudadas. A correlação de 11 e 12, tanto com hidrogênios internos como externos da β -CD, é mais uma evidência de equilíbrios múltiplos: dado que estes se localizam na parte intermediária da Pentoxifilina, inclusões pelo lado do anel e pelo lado da carbonila geram pelo

menos dois arranjos diferentes. A grande interatividade desses hidrogênios explicariam o motivo deles apresentarem uma das maiores variações de deslocamento químico, conforme Tabela 3.5.

Um sinal bastante intenso foi verificado entre 10 e 1C. O hidrogênio 10 da Pentoxifilina está localizado na cadeia alifática e próximo ao conjunto de anéis, de modo que poderia ser afetado por inclusão de ambas as extremidades. Outro sinal intenso ocorre entre 16 e 1C, o que estabelece uma grande aproximação dos hidrogênios metílicos desse grupo ligado a anel de seis membros com a β -CD. Com sinais menos intensos, correlações entre os hidrogênios 15 e 13 da Pentoxifilina e 3C da β -CD também foram observados, sendo aqueles localizados na extremidade oposta aos anéis e 3C um hidrogênio interno, a inclusão pela extremidade da carbonila é novamente algo creditado.

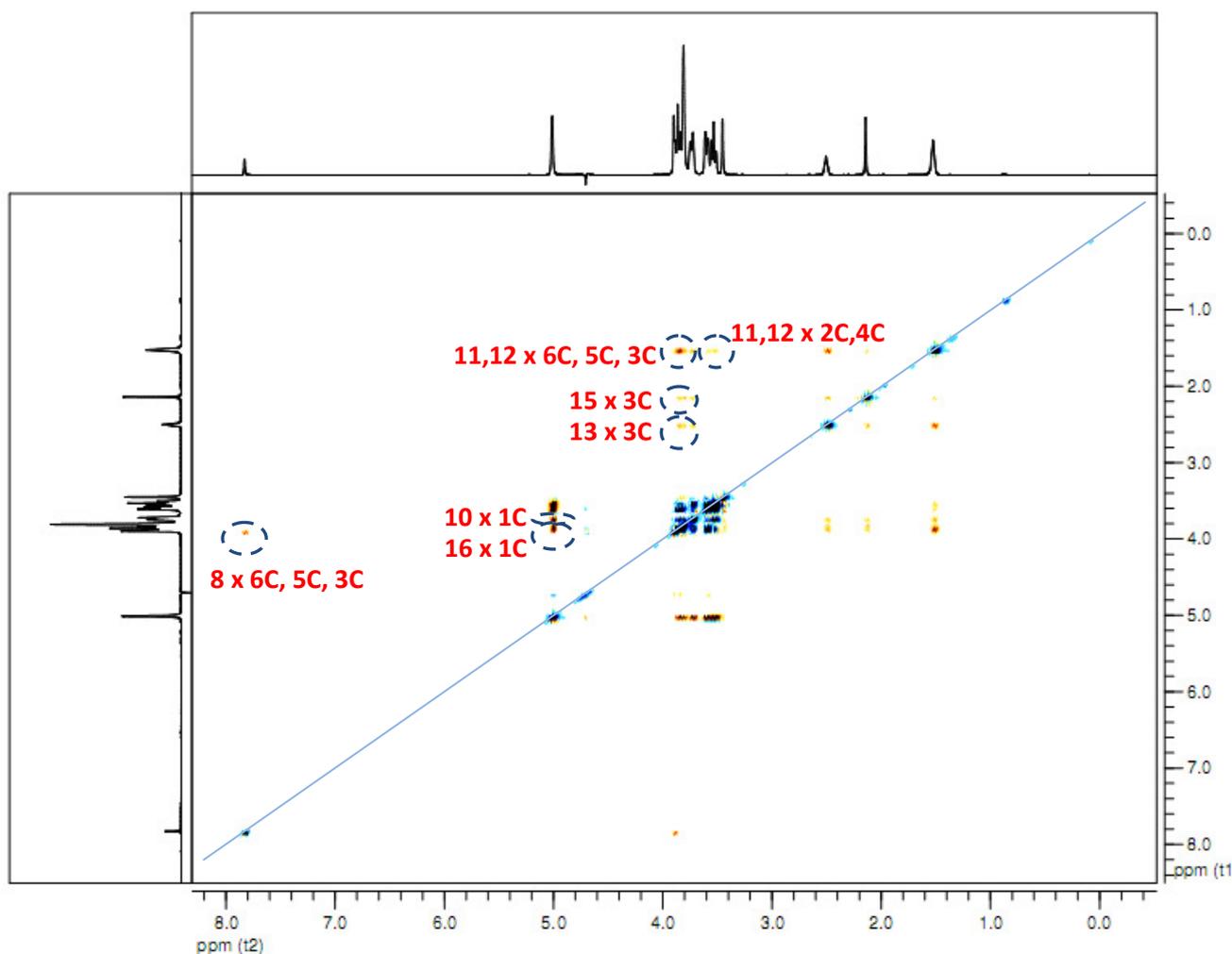


Figura 3.28 - Mapa de contorno 2D ROESY ^1H - ^1H a 400 MHz para o sistema β -CD/Pentoxifilina 1:1.

De modo geral, o experimento ROESY ^1H - ^1H reitera uma inclusão proeminente localizada nos anéis da Pentoxifilina e uma relação com os hidrogênios da parte alifática intermediária e daqueles próximos da carbonila, novamente dando evidências de equilíbrios múltiplos envolvidos nesse sistema. A Figuras 3.29 mostra uma ampliação do espectro da Figura 3.28 e possibilita uma melhor visualização de algumas correlações.

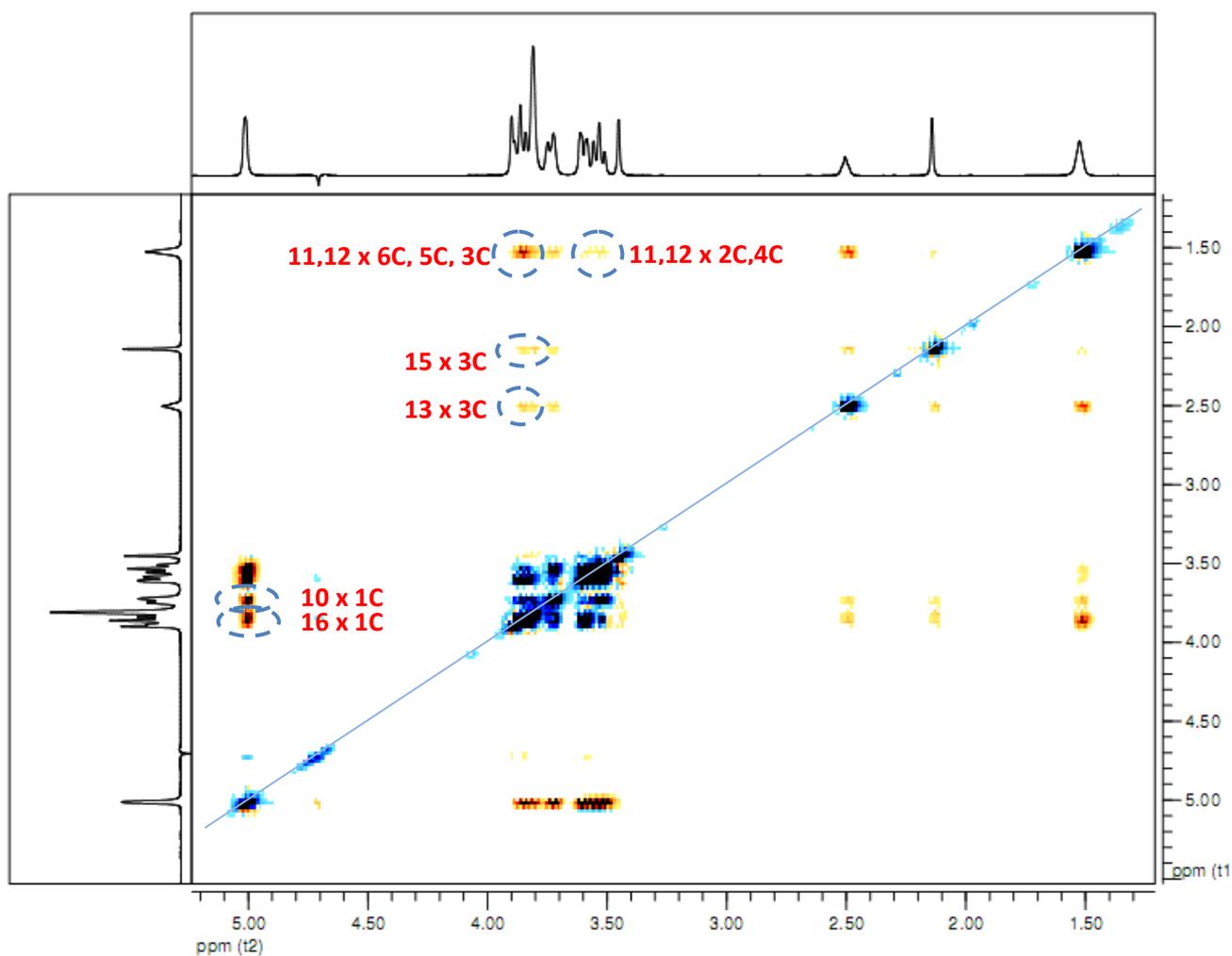


Figura 3.29 - Expansão do mapa de contorno 2D ROESY ^1H - ^1H a 400 MHz para o sistema β -CD/Pentoxifilina 1:1.

3.2.4. Calorimetria Isotérmica da Titulação (ITC)

Para caracterizar esse tipo de sistema termodinamicamente, a calorimetria isotérmica de titulação possibilita uma das melhores análises. No quadrante de baixo da Figura 3.30 está representada a curva final obtida pela titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em β -CD (4 mmol.L^{-1}), onde foram subtraídas as composições da titulação da Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em água e da titulação de água em β -CD (4 mmol.L^{-1}) para excluir os efeitos de diluição e revelar apenas as interações entre titulante e titulado. O ajuste para essa sigmóide permitiu obter um coeficiente estequiométrico de 1,04, corroborando para um sistema com estequiometria 1:1, como visto pelos sinais proeminentes de RMN da estrutura do anel na cavidade da β -CD e pela segunda possibilidade de inclusão pela extremidade da carbonila, além dos resultados da titulação no UV-Vis com inflexão na razão molar 1. Isso significa que o sistema 1:1 tende a ser mais estável em relação aos outros, pois não houve outras inflexões na curva que demonstrassem o contrário.

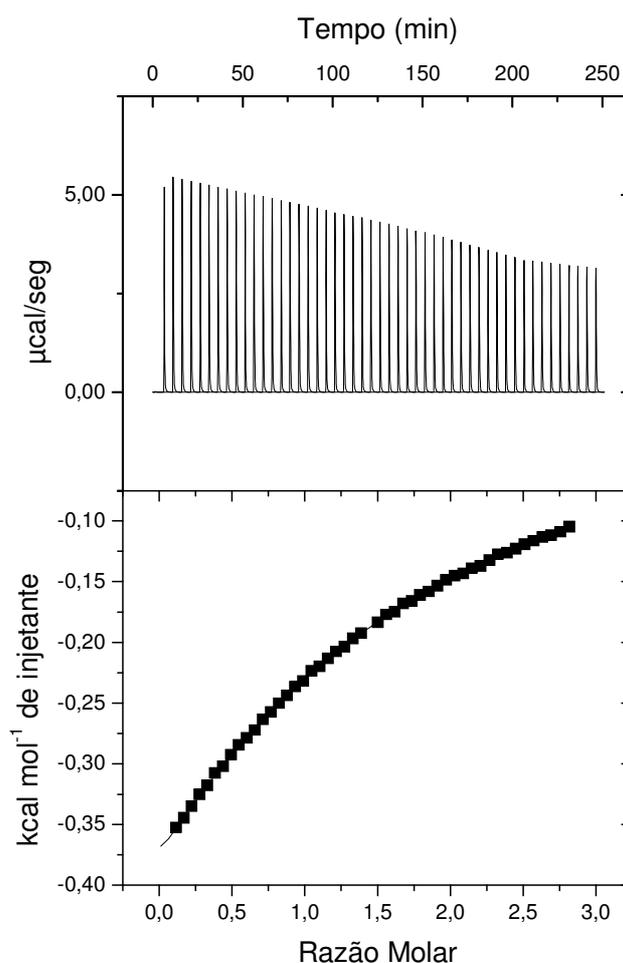


Figura 3.30 - Variação da entalpia e curva final após ajuste não-linear para a titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em β -CD (4 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A Tabela 3.6 apresenta todos os parâmetros termodinâmicos obtidos pelo ajuste não-linear utilizando o programa Origin 7.0.

Tabela 3.6 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema Pentoxifilina/ β -CD a 25 °C.

n	K	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
$1,04 \pm 0,03$	$99,90 \pm 2,23$	-11,41	$-5,23 \pm 0,19$	6,18

O valor da constante de equilíbrio estimada, $99,90 \pm 2,23$, foi pequeno para esse tipo de interação quando comparado a outros sistemas com ciclodextrinas descritos na literatura (REKHARSKY e INOUE, 1998), o que demonstra uma interação fraca entre as entidades, também verificada pelo perfil da curva, que não apresenta uma inflexão proeminente, característico de sistemas com fortes interações e constantes de associação alta (TURNBULL e DARANAS, 2003; HERRERA e WINNIK, 2013). A molécula de Pentoxifilina é relativamente solúvel, explicando, em parte, fracas associações que possam ocorrer no interior da cavidade hidrofóbica de uma ciclodextrina.

Com os valores da variação de entalpia e entropia obtidos pelo programa, foi possível estabelecer ΔG e $T\Delta S$ utilizando as equações da termodinâmica clássica descritas no item 2.3.4. Mesmo com uma constante de associação baixa, o processo de formação do composto de inclusão se mostrou espontâneo, dado o valor $-11,41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ encontrado para o ΔG . O componente entálpico está relacionado com a quebra e formação de interações, mais ou menos estáveis, que descrevem os processo de complexação hóspede/hospedeiro, com saída das moléculas de água da cavidade da β -CD. Nesse caso, tal componente mostrou um valor negativo, $-5,23 \pm 0,19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, um processo exotérmico no qual a liberação dessa energia tende a estabilizar o sistema pelas interações cooperativas entre partes hidrofóbicas e por interações eletrostáticas. Entretanto, esse componente teve um baixo valor, constatando a pequena interação.

A contribuição entrópica, $6,18 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, é relacionada ao arranjo e organização molecular do sistema como um todo e apresentou-se maior que o componente entálpico. Isso pode ser atribuído à dessolvatação da molécula hóspede durante o processo de complexação que, por ser razoavelmente solúvel, perde o arcabouço organizado de moléculas de água ao

seu redor quando entra na cavidade. A saída das moléculas de água do interior da β -CD e a existência de outros tipos de complexo, aumentando o número de espécies existentes em solução, também podem ter contribuído para tal. Todos esses dados anteriores foram obtidos com o experimento realizado a 25 °C.

Também foram feitas titulações calorimétricas em duas outras temperaturas, 15 e 37 °C. Naquela para verificar o comportamento do sistema em uma temperatura mais baixa e com menor disponibilidade de calor, e nesta que corresponde à temperatura corpórea, ambas no intuito de avaliar as mudanças na intensidade de associação entre as moléculas. Na Figura 3.31 tem-se a variação da entalpia e curva final após ajuste não-linear para a titulação nessas duas temperaturas e a Tabela 3.7 apresenta os dados termodinâmicos.

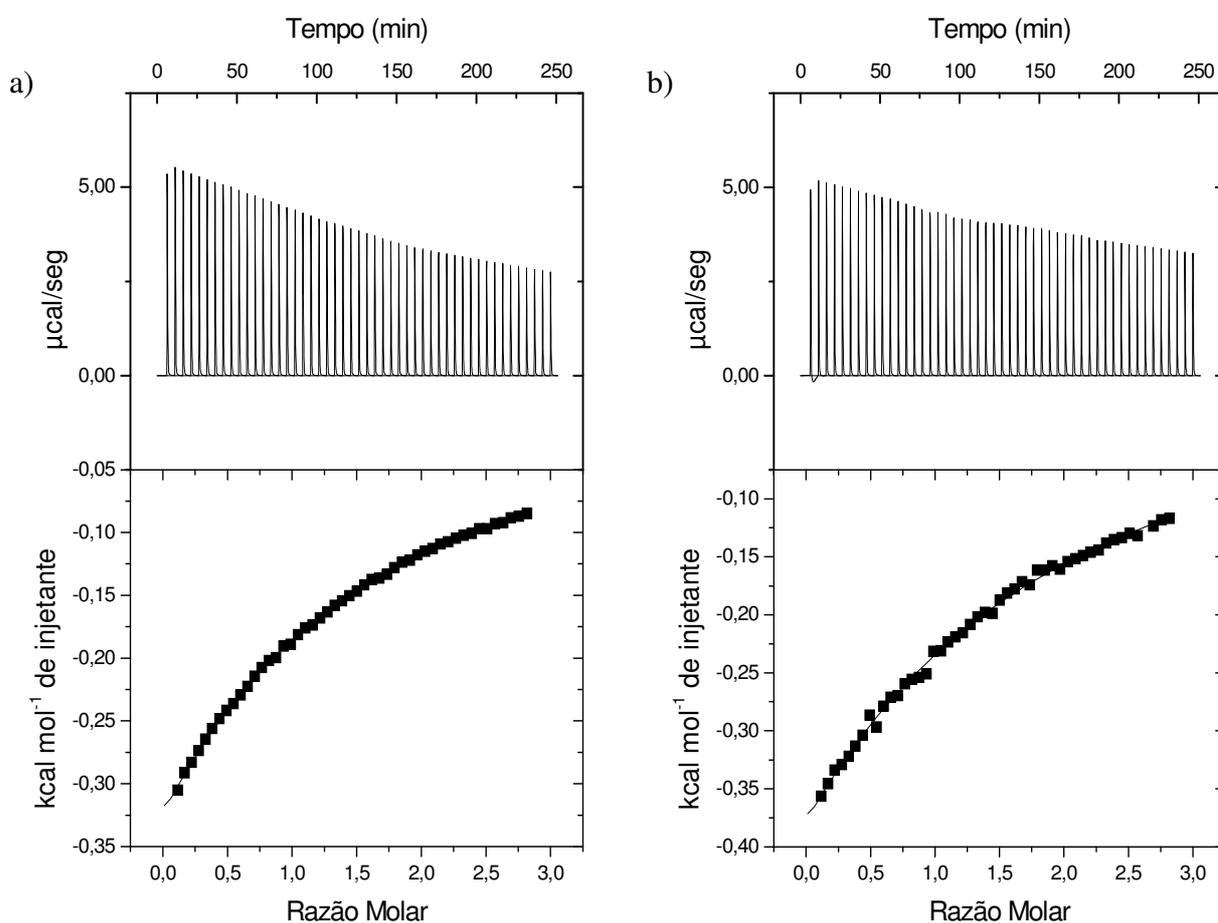


Figura 3.31 - Variação da entalpia e curva final após ajuste não-linear para a titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em β -CD (4 mmol.L^{-1}): a) Titulação a 15 °C; b) Titulação a 37 °C.

Tabela 3.7 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema Pentoxifilina/ β -CD a 15 e 37 °C.

	n	K	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
15 °C	0,50 ± 0,09	77,60 ± 3,86	-9,36	-10,33 ± 2,07	-0,97
37 °C	1,10 ± 0,17	85,10 ± 10,10	-11,46	-5,56 ± 1,14	5,90

Foi visto que na temperatura de 15 °C a estequiometria obtida é de aproximadamente 0,5, o que corresponde a duas ciclodextrinas por molécula de Pentoxifilina. Como os outros experimentos têm revelado, as duas extremidades da molécula podem ser alocadas na cavidade. O abaixamento da temperatura faz com a energia cinética das moléculas diminua e as interações sejam mais efetivas, dando maior propensão às hidrofóbicas e de dispersão, que são fracas. Esse maior número de interações explica o motivo pelo qual a entalpia teve seu valor quase o dobro ($-10,33 \pm 2,07 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) do visto a 25 °C, pois se duas ciclodextrinas tendem a interagir, a liberação de energia do processo exotérmico é favorecido. Por esse mesmo motivo, o valor da componente entrópica ligeiramente negativo ($-0,97 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) é visto pela maior organização desse sistema, pelo qual são envolvidas duas ciclodextrinas e uma Pentoxifilina, em detrimento do sistema 1:1.

Com relação ao experimento na temperatura de 37 °C novamente há uma estequiometria 1:1 ($n \approx 1,0$), com constante de associação ($85,10 \pm 10,10$) mais próxima da encontrada em 25 °C ($99,90 \pm 2,23$) quando comparada com a de 15 °C ($77,60 \pm 3,86$). Todos os outros parâmetros também se mostraram bem próximos dos obtidos à 25 °C, pelo que se pode concluir que esse aumento na temperatura não influenciou sobremaneira no sistema. Isso pode ser associado à característica exotérmica promovida pelas interações hóspede/hospedeiro, verificado pelo valor negativo da entalpia nas três temperaturas estudadas, onde uma maior disponibilidade de calor não favorece as condições de interação.

A fim de comparar esses dados e verificar a intensidade dessas interações em uma ciclodextrina diferente, foi realizado titulação da Pentoxifilina com a α -CD na temperatura de 25 °C, com os outros mesmos parâmetros das titulações da β -CD. Esperava-se duas possibilidades de diferenciação, ambas relacionadas ao tamanho reduzido da cavidade dessa ciclodextrina: ou interações mais efetivas por um melhor encaixe da molécula na cavidade ou uma dificuldade de acomodação de partes da molécula dado o volume reduzido desse interior

hidrofóbico. A Figura 3.32 mostra a curva de ajuste obtida e a Tabela 3.8 os dados termodinâmicos.

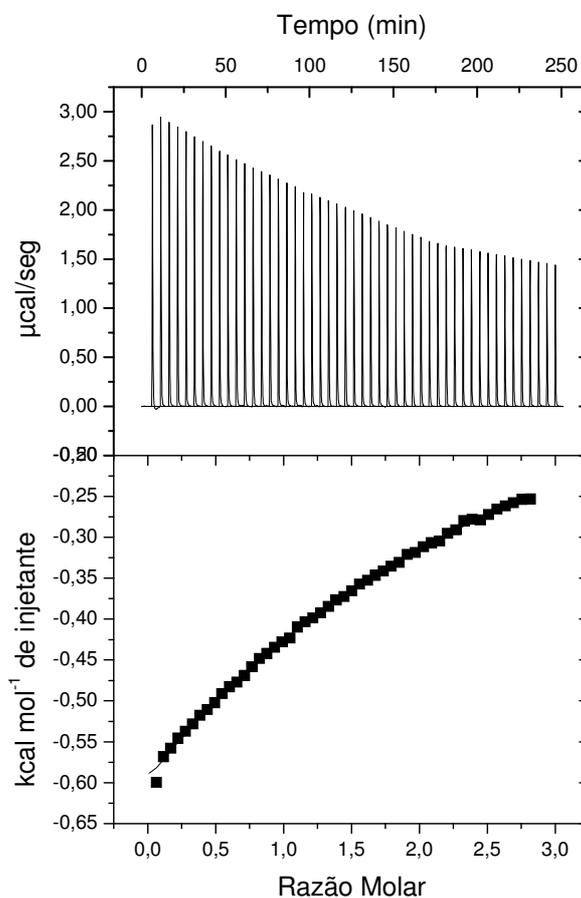


Figura 3.32 - Variação da entalpia e curva final após ajuste não linear para a titulação de Pentoxifilina (60 mmol.L^{-1}) em α -CD (4 mmol.L^{-1}) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 3.8 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema Pentoxifilina/ α -CD à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

n	K	$\Delta G/\text{kJ.mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ.mol}^{-1}$	$T\Delta S/\text{kJ.mol}^{-1}$
$1,07 \pm 0,31$	$41,30 \pm 5,01$	-9,22	$-16,48 \pm 5,80$	-7,26

Termodinamicamente, a interação entre a Pentoxifilina e a α -CD demonstrou-se mais fraca. Um menor valor para a constante de associação ($41,30 \pm 5,01$) foi encontrada em relação ao sistema com a β -CD nessa mesma temperatura ($99,90 \pm 2,23$), repercutindo em um ΔG escalar também menor. Tendo um valor negativo, o fator entrópico pesou sobremaneira

na espontaneidade, apesar da contribuição entálpica favorável. Desse modo, pode-se inferir sobre um impedimento estérico na formação do complexo α -CD/Pentoxifilina.

Os dados da calorimetria isotérmica de titulação levam a crer que a interação da α -CD com a molécula Pentoxifilina é mais baixa quando comparada com a β -CD, atribuindo-se esse fato à diferença de tamanho entre as ciclodextrinas. Essa baixa interação também foi verificada na titulação por análise no FTIR-HATR, que não apresentou alterações significativas que demonstrassem interação entre as espécies α -CD e Pentoxifilina.

Capítulo 4

Conclusão

Foi verificada interação entre a molécula de Pentoxifilina e β -ciclodextrina envolvendo, principalmente, a estrutura dos anéis, mas não descartando outros equilíbrios com a parte alifática já que há manchas de correlação no ROESY H^1-H^1 que mostram isso. Quando comparado a outros sistemas envolvendo β -ciclodextrina, percebe-se que a interação é fraca, resultado da característica hidrofílica da Pentoxifilina que interage com as moléculas de água e desfavorece uma interação mais efetiva com a cavidade hidrofóbica, sendo comprovado pelo baixo valor da componente entálpica registrada no ITC. A componente entrópica, que está associada à saída das moléculas de água e entrada da molécula hóspede na cavidade, foi preponderante na constituição da energia de Gibbs, resultando em um valor negativo que mostra o favorecimento da inclusão.

Quanto à estequiometria, os resultados do ITC e da titulação no UV-Vis, na qual a concentração de β -ciclodextrina gerou fortes alterações nas absorções da Pentoxifilina em razão molar específica, mostraram uma relação 1:1 de hóspede/hospedeiro. Isso não descarta a existência de equilíbrios múltiplos, mas corrobora para a existência de um arranjo que seja mais favorável em relação aos outros, levando a crer que esse ajuste seja na estrutura dos anéis. Os resultados da titulação no FTIR-HATR e do ITC envolvendo a α -ciclodextrina mostraram uma menor interação em relação à β -ciclodextrina. Nesse caso, a associação entre a hidrofiliabilidade da molécula hóspede e a menor cavidade da α -ciclodextrina constituem um grande empecilho para a inclusão, sendo verificado pela pequena constante de associação obtida pelo experimento ITC.

As alterações da absorção da Pentoxifilina no UV-Vis devido a mudanças no pH da solução foram investigados afim de se conhecer se há proteção dessa molécula pelas ciclodextrinas, mas não foram verificados dados que comprovassem essa propriedade.

Referências

AHMADI, M.; KHALILI, H. Potential benefits of pentoxifylline on wound healing. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.9, n.1, p.129-142, Jan 2016.

AHMED, A. F.; EL-MARAGHY, N. N.; GHANEY, R. H. A.; ELSHAZLY, S. M. Therapeutic Effect of Captopril, Pentoxifylline, and Cordyceps Sinensis in Pre-Hepatic Portal Hypertensive Rats. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v.18, n.3, p.182-187, May-Jun 2012.

ALBERSEN, M.; FANDEL, T. M.; ZHANG, H. Y.; BANIE, L.; LIN, G. T.; DE RIDDER, D.; LIN, C. S.; LUE, T. F. Pentoxifylline Promotes Recovery of Erectile Function in a Rat Model of Postprostatectomy Erectile Dysfunction. **European Urology**, v.59, n.2, p.286-296, Feb 2011.

AMBRUS, J. L.; STADLER, S.; KULAYLAT, M. HEMORRHEOLOGIC EFFECTS OF METABOLITES OF PENTOXIFYLLINE (TRENTAL(R)). **Journal of Medicine**, v.26, n.1-2, p.65-75 1995.

AZHAR, A.; EL-BASSOSSY, H. M. Pentoxifylline alleviates hypertension in metabolic syndrome: effect on low-grade inflammation and angiotensin system. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.38, n.4, p.437-445, Apr 2015.

BOLAND, N. E.; STONE, A. T. Capillary electrophoresis facilitates determination of metal complex stoichiometry by Job's method of continuous variation. **Environmental Chemistry**, v.10, n.5, p.409-416 2013.

BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, v.17, n.11-12, p.623-629, Jun 2012.

BRANDARIZ, I.; IGLESIAS, E. Local Anesthetics: Acid-base Behaviour and Inclusion with Cyclodextrins. **Current Organic Chemistry**, v.17, n.24, p.3050-3063, Dec 2013.

BRAVO-CUELLAR, A.; ORTIZ-LAZARENO, P. C.; LERMA-DIAZ, J. M.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J. R.; JAVE-SUAREZ, L. F.; AGUILAR-LEMARROY, A.; DEL TORO-ARREOLA, S.; DE CELIS-CARRILLO, R.; SAHAGUN-FLORES, J. E.; DE ALBA-GARCIA, J. E. G.; HERNANDEZ-FLORES, G. Sensitization of cervix cancer cells to Adriamycin by Pentoxifylline induces an increase in apoptosis and decrease senescence. **Molecular Cancer**, v.9, p.14, May 2010.

BREWSTER, M. E. L. T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.7, p.645-666 2007.

BUDAL, R. M. **Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas [Dissertação]**. Faculdade de Química, UFSC, Florianópolis, 2003.

BUDRYN, G.; PALE CZ, B.; RACHWAL-ROSI AK, D.; ORACZ, J.; ZACZYNSKA, D.; BELICA, S.; NAVARRO-GONZALEZ, I.; MESEGUER, J. M. V.; PEREZ-SANCHEZ, H. Effect of inclusion of hydroxycinnamic and chlorogenic acids from green coffee bean in beta-cyclodextrin on their interactions with whey, egg white and soy protein isolates. **Food Chemistry**, v.168, p.276-287, Feb 2015.

CHARMAN, W.; PORTER, C.; MITHANI, S.; DRESSMAN, J. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, n.3, p.269-282 1997.

CHATTERJEE, A.; MAITY, B.; SETH, D. Supramolecular Interaction between a Hydrophilic Coumarin Dye and Macrocyclic Hosts: Spectroscopic and Calorimetric Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v.118, n.32, p.9768-9781, Aug 2014.

CHEN, F. F.; WANG, Y. J.; XIE, X. M.; CHEN, M.; LI, W. TDDFT study of UV-vis spectra of permethrin, cypermethrin and their beta-cyclodextrin inclusion complexes: A comparison of dispersion correction DFT (DFT-D3) and DFT. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.128, p.461-467, Jul 2014.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, v.27. 2009

CORCIOVA, A.; LAZAR, D.; LAZAR, M. Spectral (UV-Vis, IR, NMR) and Thermal (Tg, DTG, ATD) Characterization of Some Synthesis Brom-isoflavanone and the Inclusion Compounds with beta-Cyclodextrin. **Revista De Chimie**, v.61, n.4, p.377-379, Apr 2010.

COSELMAN, K. E.; NAVAS-ACIEN, A.; KAUFMAN, J. D. Environmental factors in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v.12, n.11, p.627-642, Nov 2015.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.114, n.21, p.10940-10975, Nov 2014.

CRUPI, V.; FICARRA, R.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with beta-cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, n.1, p.110-117, May 2007.

DE SOUSA, F. B. **Estudo e caracterização estrutural e termodinâmica de compostos de inclusão formados entre antidepressivos e ciclodextrinas**. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. 160 p.

DE SOUSA, F. B.; DENADAI, A. M. L.; LULA, I. S.; IANZER, D.; MALASPINA, E. R.; DE CAMARGO, A. C. M.; DOS SANTOS, R. A. S.; SINISTERRA, R. D. Structural and physical-chemical evaluation of Bradykinin Potentiating Peptide and its high soluble supramolecular complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.67, n.3-4, p.407-422, Aug 2010.

DE SOUSA, F. B.; OLIVEIRA, M. F.; LULA, I. S.; SANSIVIERO, M. T. C.; CORTES, M. E.; SINISTERRA, R. D. Study of inclusion compound in solution involving tetracycline and beta-cyclodextrin by FTIR-ATR. **Vibrational Spectroscopy**, v.46, n.1, p.57-62, Jan 2008.

DEMIREL, Y. Thermodynamic Analysis. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v.38, n.2, p.221-249, Feb 2013.

DENADAI, A. M. L.; SANTORO, M. M.; LOPES, M. T. P.; CHENNA, A.; DE SOUSA, F. B.; AVELAR, G. M.; GOMES, M. R. T.; GUZMAN, F.; SALAS, C. E.; SINISTERRA, R. D. A supramolecular complex between proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity - Physicochemical characterization. **Biodrugs**, v.20, n.5, p.283-291 2006.

EGYED, O. SPECTROSCOPIC STUDIES ON BETA-CYCLODEXTRIN. **Vibrational Spectroscopy**, v.1, n.2, p.225-227, Dec 1990.

EL-BASSOSSY, H. M.; EL-MOSELHY, M. A.; MAHMOUD, M. F. Pentoxifylline alleviates vascular impairment in insulin resistance via TNF-alpha inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.384, n.3, p.277-285, Sep 2011.

ESPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; BERTOLAMI, M. C.; AFIUNE NETO, A.; SOUZA, A. D. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88 (supl 1), p.1-18 2007.

FLOARE, C. G.; PIRNAU, A.; BOGDAN, M. H-1 NMR spectroscopic characterization of inclusion complexes of tolfenamic and flufenamic acids with beta-cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v.1044, p.72-78, Jul 2013.

FOTI, R. S.; TYNDALE, R. F.; GARCIA, K. L. P.; SWEET, D. H.; NAGAR, S.; SHARAN, S.; ROCK, D. A. "Target-Site" Drug Metabolism and Transport. **Drug Metabolism and Disposition**, v.43, n.8, p.1156-1168, Aug 2015.

FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M. ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY. **Analytical Chemistry**, v.62, n.18, p.A950-A959, Sep 1990.

GABRIENKO, A. A.; MOROZOV, E. V.; SUBRAMANI, V.; MARTYANOV, O. N.; KAZARIAN, S. G. Chemical Visualization of Asphaltene Aggregation Processes Studied in Situ with ATR-FTIR Spectroscopic Imaging and NMR Imaging. **Journal of Physical Chemistry C**, v.119, n.5, p.2646-2660, Feb 2015.

GOEL, P. N.; GUDE, R. P. Unravelling the antimetastatic potential of pentoxifylline, a methylxanthine derivative in human MDA-MB-231 breast cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.358, n.1-2, p.141-151, Dec 2011.

GOEL, P. N.; GUDE, R. P. Delineating the anti-metastatic potential of pentoxifylline in combination with liposomal doxorubicin against breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.68, n.2, p.191-200, Mar 2014.

GOUREVICH, D.; DOGADKIN, O.; VOLOVICK, A.; WANG, L. J.; GNAIM, J.; COCHRAN, S.; MELZER, A. Ultrasound-mediated targeted drug delivery with a novel cyclodextrin-based drug carrier by mechanical and thermal mechanisms. **Journal of Controlled Release**, v.170, n.3, p.316-324, Sep 2013.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.2035-2044, Jul-Aug 1998.

HERRERA, I.; WINNIK, M. A. Differential Binding Models for Isothermal Titration Calorimetry: Moving beyond the Wiseman Isotherm. **Journal of Physical Chemistry B**, v.117, n.29, p.8659-8672, Jul 2013.

INDRAYANTO, G.; SYAHRANI, A.; MOEGIHARDJO; SOEHARYONO; LIANAWATI, T.; WAHYUNINGSIH, I.; ADITAMA, L.; BRITTAIN, H. G. **Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients.**, v.25. 1998

IUPAC. <<http://goldbook.iupac.org/I02998.html>>. 2015.

KAMPHUIS, J.; SMITS, P.; THIEN, T. VASCULAR EFFECTS OF PENTOXIFYLLINE IN HUMANS. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.24, n.4, p.648-654, Oct 1994.

KRABBENBORG, S. O. **Surface Gradients Under Electrochemical Control**. University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2014.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; AGRAWAL, S.; JAYANT, K.; PARMAR, K.; SRIHARSHA, A.; MAVUDURU, R.; SINGH, S. COMBINATION THERAPY OF TADALAFIL AND PENTOXIFYLLINE IN SEVERE ERECTILE DYSFUNCTION: A PROSPECTIVE RANDOMIZED TRIAL. **Journal of Sexual Medicine**, v.12, p.150-150, May 2015.

LEHN, J. M. CRYPTATES - INCLUSION COMPLEXES OF MACROPOLYCYCLIC RECEPTOR MOLECULES. **Pure and Applied Chemistry**, v.50, n.9-10, p.871-892 1978.

LEHN, J. M. SUPRAMOLECULAR CHEMISTRY - RECEPTORS, CATALYSTS, AND CARRIERS. **Science**, v.227, n.4689, p.849-856 1985.

LEHN, J. M. Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.8, p.4763-4768, Apr 2002.

LI, Z.; CHEN, S.; GU, Z.; CHEN, J.; WU, J. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.35, n.2, p.151-160, Feb 2014.

LIRA, M. C. B. **Complexo de inclusão ácido úsnico:β-ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007. 90 p.

LIU, L.; GUO, Q. X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.42, n.1-2, p.1-14, Feb 2002.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, n.11, p.1607-1621, Nov 2010.

LONG, B. M.; PFEFFER, F. M. On the use of 'shortcuts' in the method of continuous variation (Job's method). **Supramolecular Chemistry**, v.27, n.1-2, p.136-140, Feb 2015.

LOPEZ, C. A.; DE VRIES, A. H.; MARRINK, S. J. Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction. **Plos Computational Biology**, v.7, n.3, p.14, Mar 2011.

LULA, I.; DE SOUSA, F. B.; DENADAI, A. M. L.; DE LIMA, G. F.; DUARTE, H. A.; GUIA, T. R. D.; FALJONI-ALARIO, A.; SANTORO, M. M.; DE CAMARGO, A. C. M.; DOS SANTOS, R. A. S.; SINISTERRA, R. D. Interaction between bradykinin potentiating nonapeptide (BPP9a) and beta-cyclodextrin: A structural and thermodynamic study. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v.32, n.2, p.244-253, Mar 2012.

MAITY, B.; CHATTERJEE, A.; AHMED, S. A.; SETH, D. Supramolecular Interactions of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug in Nanochannels of Molecular Containers: A Spectroscopic, Thermogravimetric and Microscopic Investigation. **Chemphyschem**, v.15, n.16, p.3502-3514, Nov 2014.

MARCOLINO, V. A.; ZANIN, G. M.; DURRANT, L. R.; BENASSI, M. D.; MATIOLI, G. Interaction of Curcumin and Bixin with beta-Cyclodextrin: Complexation Methods, Stability, and Applications in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.7, p.3348-3357, Apr 2011.

MARTIN, G. E. Using 1,1-and 1,n-ADEQUATE 2D NMR Data in Structure Elucidation Protocols. **Annual Reports on Nmr Spectroscopy, Vol 74**, v.74, p.215-291 2011.

MATTIA, E.; OTTO, S. Supramolecular systems chemistry. **Nature Nanotechnology**, v.10, n.2, p.111-119, Feb 2015.

MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the 'nanomole-scale'. **Natural Product Reports**, v.27, n.3, p.321-329 2010.

MONE, M. K.; CHANDRASEKHAR, K. B. Degradation studies of pentoxifylline: Isolation and characterization of a novel gem-dihydroperoxide derivative as major oxidative degradation product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, n.3, p.335-342, Nov 2010.

NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C.; DE FUENTES, M. M.; CHAHIN, J.; MENDEZ, M. L.; GALLEGO, E.; MACIA, M.; DEL CASTILLO, N.; RIVERO, A.; GETINO, M. A.; GARCIA, P.; JARQUE, A.; GARCIA, J. Effect of Pentoxifylline on Renal Function and Urinary Albumin Excretion in Patients with Diabetic Kidney Disease: The PREDIAN Trial. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.26, n.1, p.220-229, Jan 2015.

OGAWA, N.; TAKAHASHI, C.; YAMAMOTO, H. Physicochemical Characterization of Cyclodextrin-Drug Interactions in the Solid State and the Effect of Water on These Interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.104, n.3, p.942-954, Mar 2015.

OKWUOSA, I. S.; LEWSEY, S. C.; ADESIYUN, T.; BLUMENTHAL, R. S.; YANCY, C. W. Worldwide disparities in cardiovascular disease: Challenges and solutions. **International Journal of Cardiology**, v.202, p.433-440, Jan 2016.

OLIVEIRA, M. F.; SUAREZ, D.; ROCHA, J. C. B.; TEIXEIRA, A.; CORTES, M. E.; DE SOUSA, F. B.; SINISTERRA, R. D. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v.54, p.252-261, Sep 2015.

PADURARU, O. M.; BOSINCEANU, A.; TANTARU, G.; VASILE, C. Effect of Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin on the Solubility of an Antiarrhythmic Agent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.52, n.5, p.2174-2181, Feb 2013.

PARK, S. H.; KIM, D. J.; KIM, Y. S.; YIM, H. J.; TAK, W. Y.; LEE, H. J.; SOHN, J. H.; YOON, K. T.; KIM, I. H.; KIM, H. S.; UM, S. H.; BAIK, S. K.; LEE, J. S.; SUK, K. T.; KIM, S. G.; SUH, S. J.; PARK, S. Y.; KIM, T. Y.; JANG, J. Y.; KOREAN ASSOC STUDY LIVER, K. Pentoxifylline vs. corticosteroid to treat severe alcoholic hepatitis: A randomised, non-inferiority, open trial. **Journal of Hepatology**, v.61, n.4, p.792-798, Oct 2014.

PASSOS, J. J.; DE SOUSA, F. B.; LULA, I. S.; BARRETO, E. A.; LOPES, J. F.; DE ALMEIDA, W. B.; SINISTERRA, R. D. Multi-equilibrium system based on sertraline and beta-cyclodextrin supramolecular complex in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, n.1, p.24-33, Dec 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introduction to Espectroscopy, 4 edition. 2010.

PERIASAMY, R.; KOTHAINAYAKI, S.; SIVAKUMAR, K. Preparation, physicochemical analysis and molecular modeling investigation of 2,2'-Bipyridine: beta-Cyclodextrin inclusion complex in solution and solid state. **Journal of Molecular Structure**, v.1100, p.59-69, Nov 2015.

PUBCHEM. (Open Chemistry Database).
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4740#section=Top>. 2015a.

PUBCHEM. (Open Chemistry Database).
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444913#section=Top>. 2015b.

PUBCHEM. Pentoxifylline 2015c.

PURKAYASTHA, P.; JAFFER, S. S.; GHOSH, P. Physicochemical perspective of cyclodextrin nano and microaggregates. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.14, n.16, p.5339-5348 2012.

RAJENDIRAN, N.; SANKARANARAYANAN, R. K. Nanoscale self assembly of cyclodextrin capped 4-aminobenzophenone via non-covalent interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v.206, p.218-227, Jun 2015.

REILLY, D. T.; QUINTON, D. N.; BARRIE, W. W. A CONTROLLED TRIAL OF PENTOXIFYLLINE (TRENAL 400) IN INTERMITTENT CLAUDICATION - CLINICAL, HEMOSTATIC AND RHEOLOGICAL EFFECTS. **New Zealand Medical Journal**, v.100, n.828, p.445-447, Jul 1987.

REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1875-1917, Jul-Aug 1998.

SAENGER, W. CYCLODEXTRIN INCLUSION-COMPOUNDS IN RESEARCH AND INDUSTRY. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v.19, n.5, p.344-362 1980.

SCHNEIDER, H. J.; HACKET, F.; RUDIGER, V.; IKEDA, H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1755-1785, Jul-Aug 1998.

SERVICE, R. F. How far can we push chemical self-assembly. **Science**, v.309, n.5731, p.95-95, Jul 2005.

SHARMA, N.; BALDI, A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. **Drug Delivery**, v.23, n.3, p.739-757, Mar 2016.

SLATER, A. G.; PERDIGAO, L. M. A.; BETON, P. H.; CHAMPNESS, N. R. Surface-Based Supramolecular Chemistry Using Hydrogen Bonds. **Accounts of Chemical Research**, v.47, n.12, p.3417-3427, Dec 2014.

STEED, J. W. Supramolecular chemistry as an underpinning concept. **Supramolecular Chemistry**, v.27, n.11-12, p.731-733, Dec 2015.

SUAREZ, D. F.; CONSUEGRA, J.; TRAJANO, V. C.; GONTIJO, S. M. L.; GUIMARAES, P. P. G.; CORTES, M. E.; DENADAI, A. L.; SINISTERRA, R. D. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/beta-cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.118, p.194-201, Jun 2014.

SUAREZ, L.; GARCIA, R.; RIERA, F. A.; DIEZ, M. A. ATR-FTIR spectroscopy for the determination of Na(4)EDTA in detergent aqueous solutions. **Talanta**, v.115, p.652-656, Oct 2013.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1743-1753, Jul-Aug 1998.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v.76, n.10, p.1825-1845, Oct 2004.

THURSZ, M. R.; RICHARDSON, P.; ALLISON, M. E.; AUSTIN, A.; BOWERS, M.; DAY, C. P.; DOWNS, N.; GLEESON, D.; MACGILCHRIST, A. J.; GRANT, A.; HOOD, S.; MASSON, S.; MCCUNE, A.; MELLOR, J. M.; O'GRADY, J. G.; PATCH, D. W.; RATCLIFFE, I.; RODERICK, P.; STANTON, L.; VERGIS, N.; WRIGHT, M.; RYDER, S. D.; FORREST, E. Steroids or Pentoxifylline for Alcoholic Hepatitis: Results of the STOPAH Trial. **Hepatology**, v.60, n.6, p.1267A-1267A, Dec 2014.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v.125, n.48, p.14859-14866, Dec 2003.

UHLLENHEUER, D. A.; PETKAU, K.; BRUNSVELD, L. Combining supramolecular chemistry with biology. **Chemical Society Reviews**, v.39, n.8, p.2817-2826 2010.

WEI, H.; YU, C. Y. Cyclodextrin-functionalized polymers as drug carriers for cancer therapy. **Biomaterials Science**, v.3, n.7, p.1050-1060 2015.

WHITESIDES, G. M.; BONCHEVA, M. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.8, p.4769-4774, Apr 2002.

WHO. Cardiovascular Diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> 2015.

WISEMAN, T.; WILLISTON, S.; BRANDTS, J. F.; LIN, L. N. RAPID MEASUREMENT OF BINDING CONSTANTS AND HEATS OF BINDING USING A NEW TITRATION CALORIMETER. **Analytical Biochemistry**, v.179, n.1, p.131-137, May 1989.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C.; FONSECA, F. A.; DOS SANTOS, J. E.; SANTOS, R. D.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; MARTINEZ, T. L. R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N. A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A. C. P.; COELHO, O. R.; RAMIRES, J. A. F. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101 (supl. 1), n.4, Outubro 2013.

XIAO, Y.; NG, S. C.; TAN, T. T. Y.; WANG, Y. Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1269, p.52-68, Dec 2012.

YAO, Q.; YOU, B.; ZHOU, S. L.; CHEN, M.; WANG, Y. J.; LI, W. Inclusion complexes of cypermethrin and permethrin with monochlorotriazinyl-beta-cyclodextrin: A combined spectroscopy, TG/DSC and DFT study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.117, p.576-586, Jan 2014.

YOUWIE, Y.; YINZHE, R. Grape Preservation Using Chitosan Combined with β -Cyclodextrin. **International Journal of Agronomy**, v.2013 2013.

ZANGGER, K. Pure shift NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.86-87, p.1-20, Apr 2015.

ZHOU, J. W.; RITTER, H. Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. **Polymer Chemistry**, v.1, n.10, p.1552-1559 2010.

ZIA, V.; RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: Comparison of (SBE)(7M)-beta-CD to HP-beta-CD. **Pharmaceutical Research**, v.18, n.5, p.667-673, May 2001.