
UFMG-ICEx/DQ. 00675^a

D. 0409^a

Frederico Barros de Sousa

Estudo e Caracterização Estrutural e Termodinâmica de Compostos de
Inclusão Formados entre Antidepressivos e Ciclodextrinas

Dissertação apresentada ao Departamento de Química
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Química – Química Inorgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

S729e Sousa, Frederico Barros de
2007 Estudo e caracterização estrutural e termodinâmica
D de compostos de inclusão formados entre
antidepressivos e ciclodextrinas./ Frederico Barros de
Sousa. 2007.

xvi, 147 p.: il.

Orientador: Rubén Dario Sinisterra.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

1.Química Inorgânica- Teses 2.Ciclodextrinas- Teses
3.Compostos de inclusão - Teses I.Sinisterra, Rubén
Dario, Orientador II.Título.

CDU:043

Agradecimentos:

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus.

Ao meu pai, Luciano, que sempre me apoiou, à minha mãe Cida, que mesmo não estando mais entre nós com certeza sempre me deu força para continuar seguindo em frente, aos meus irmãos queridos, Leandro e Luciana. À Lenise.

Aos meus avós, Geraldo, Epopéia e Antônio Lourenço, tios e primos.

À minha querida esposa, Juliana, que me incentivou e apoiou desde o início, a buscar o melhor para minha formação, com muito amor.

Aos meus sogros, Lopes e Jô, que sempre me receberam de braços abertos em sua casa.

À minha cunhada Daniele e ao meu cunhado Arnaldo.

Ao Professor Rubén, pela orientação.

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde de o colégio, Igor (Cabeção), Gustavo (Simão, porque ele é um só), Fabrício (Jerry), Fábio (Feijão), Rafael (Freitas) e Eudes.

Aos meus amigos do mais recentemente inaugurado, laboratório 175, Ana Celeste, Ângelo, Ivana, Michele, Alinne, Pedro, Izabela, Washington (Juninho), Marina, Luãn, Eduardo, Eliete, Maria Fernanda, Joel, Jonas, Angélica e Daniela. E meus amigos do laboratório 290, Jeferson, Anayive, Juliana, Lucas, Ana Mena, Karina, Angel, Débora, Isolda e Ana Cerúlia.

Aos amigos da ciclodextrina (teórica) Cléber e Clebio e em resposta ao El Matador: “Eu já criei e tô na praça!”.

Agradeço ainda a todos aqueles que me ajudaram nesse período: Daniele EVASIN, Cynthia, João Paulo (Jão-Jão), Hernane (Barud), Mara Rúbia, Inácio, Régis, Thiago (Napa), Luciano (Luchio), Cogumelo, Rodrigo (Rodrigaço), Fabiano (Mantegão), Luis Antônio, Regina, Fred (Chipangão), Karina, Henrique, Otávio e Juliene.

Aos Professores: Robson A. S. Santos, Heloísa Beraldo, Cláudio Luis Donnici, Vito M. de Bellis, Maria Terezinha, Maria Esperanza, Wagner B. de Almeida, Hélio F. dos Santos, Maria Yrene e Geraldo Magela.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Sumário:

| | |
|--|------|
| <i>Índice de Figuras</i> | vii |
| <i>Índice de Tabelas</i> | xii |
| <i>Resumo</i> | xiii |
| <i>Abstract</i> | xv |
| | |
| <i>Capítulo 1: Introdução</i> | 01 |
| 1 Introdução..... | 02 |
| 1.1 Química Supramolecular..... | 02 |
| 1.2 Histórico e Propriedades das Ciclodextrinas..... | 06 |
| 1.3 Moléculas Hóspede..... | 15 |
| 1.3.1 Transtornos depressivos..... | 16 |
| 1.3.2 Antidepressivos Tricíclicos..... | 19 |
| 1.3.3 Antidepressivos Bicíclicos..... | 21 |
| 1.3.4 Objetivos do trabalho..... | 22 |
| 1.4 Algumas Técnicas de Caracterização Utilizadas..... | 24 |
| 1.4.1 Reflectância Total Atenuada Horizontal..... | 24 |
| 1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear..... | 26 |
| 1.4.3 Calorimetria Isotérmica de Titulação..... | 28 |
| 1.5 Referências..... | 31 |
| | |
| <i>Capítulo 2: Materiais e Métodos</i> | 40 |
| 2 Materiais e Métodos..... | 41 |
| 2.1 Reagentes Utilizados..... | 41 |
| 2.2 Equipamentos..... | 44 |
| 2.3 Descrição dos Experimentos..... | 45 |
| 2.3.1 Preparo dos Compostos de Inclusão..... | 45 |
| 2.3.2 Análise Térmica..... | 46 |
| 2.3.3 Espectroscopia de Absorção (FT-IR) e Reflectância Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) na Região do Infravermelho..... | 46 |
| 2.3.4 Ressonância Magnética Nuclear..... | 49 |
| 2.3.5 Calorimetria Isotérmica de Titulação..... | 49 |
| 2.4 Referências..... | 51 |

| | |
|--|-----|
| <i>Capítulo 3: Resultados e Discussão: Sistema β-ciclodextrina/fluoxetina...</i> | 53 |
| 3 Caracterização do Sistema β -ciclodextrina/fluoxetina..... | 54 |
| 3.1 Análise térmica..... | 54 |
| 3.2 Espectroscopia de Absorção (FT-IR) e Reflectância Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) na Região do Infravermelho..... | 62 |
| 3.3 Ressonância Magnética Nuclear..... | 75 |
| 3.4 Calorimetria Isotérmica de Titulação..... | 90 |
| 3.5 Referências:..... | 94 |
| | |
| <i>Capítulo 4: Resultados e Discussão: Sistema β-ciclodextrina/imipramina..</i> | 97 |
| 4 Caracterização do Sistema β -ciclodextrina/imipramina..... | 98 |
| 4.1 Análise térmica..... | 98 |
| 4.2 Espectroscopia de Absorção (FT-IR) e Reflectância Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) na Região do Infravermelho..... | 105 |
| 4.3 Ressonância Magnética Nuclear..... | 118 |
| 4.4 Calorimetria Isotérmica de Titulação..... | 136 |
| 4.5 Referências..... | 140 |
| | |
| <i>Capítulo 5: Conclusões.....</i> | 142 |

Índice de Figuras:

| | |
|---|----|
| <i>Capítulo 1: Introdução</i> | 1 |
| Figura 1.1: Exemplos de sistemas supramoleculares..... | 05 |
| Figura 1.2: Fórmula estrutural da β -ciclodextrina..... | 07 |
| Figura 1.3: Fórmula estrutural de uma unidade glicosídica em conformação de cadeira..... | 07 |
| Figura 1.4: Formula estrutural de alguns de substituintes em ciclodextrinas modificadas..... | 09 |
| Figura 1.5: Representação esquemática das estruturas da α -, β -, e γ -ciclodextrina e suas dimensões..... | 10 |
| Figura 1.6: Representação da Teoria das monoaminas | 17 |
| Figura 1.7: Fórmula estrutural do Cloridrato de Imipramina..... | 20 |
| Figura 1.8: Fórmula estrutural do Cloridrato de Fluoxetina..... | 21 |
| Figura 1.9: Representação esquemática do processo de reflectância obtido no experimento de FTIR-HATR..... | 25 |
| Figura 1.10: Representação de uma titulação calorimétrica de variação de entalpia (ΔH^0) por razão molar (n)..... | 30 |
| <i>Capítulo 2: Materiais e Métodos</i> | 40 |
| Figura 2.1: Fórmula estrutural da β -ciclodextrina..... | 42 |
| Figura 2.2: Fórmula estrutural do Cloridrato de Fluoxetina..... | 43 |
| Figura 2.3: Fórmula estrutural do Cloridrato de Imipramina..... | 44 |
| Figura 2.4: Representação esquemática das soluções utilizadas no experimento de Job..... | 48 |
| <i>Capítulo 3: Resultados e Discussão: Sistema β-ciclodextrina/fluoxetina</i> | 53 |
| Figura 3.1: Curvas TG/DTG para a β -ciclodextrina, em atmosfera de N_2 .. | 55 |
| Figura 3.2: Curva DSC para a β -ciclodextrina, em atmosfera de N_2 | 55 |
| Figura 3.3: Curvas TG/DTG para a Fluoxetina, em atmosfera de N_2 | 56 |
| Figura 3.4: Curva DSC para a Fluoxetina, em atmosfera de N_2 | 57 |
| Figura 3.5: Curvas TG para β CD, FLU, mistura mecânica 1:1 β CD/FLU e composto de inclusão 1:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.6: Curvas DSC para β CD, FLU, mistura mecânica 1:1 β CD/FLU e composto de inclusão 1:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 | 59 |
| Figura 3.7: Curvas TG para β CD, FLU, mistura mecânica 2:1 β CD/FLU e composto de inclusão 2:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 | 60 |
| Figura 3.8: Curvas DSC para β CD, FLU, mistura mecânica 2:1 β CD/FLU e composto de inclusão 2:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 | 61 |
| Figura 3.9: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β -ciclodextrina, em KBr na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ | 62 |
| Figura 3.10: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Fluoxetina, em KBr na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ | 63 |
| Figura 3.11: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β CD, FLU, mistura mecânica 1:1 β CD/FLU e composto de inclusão 1:1 β CD/FLU, em KBr na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ | 66 |
| Figura 3.12: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β CD, FLU, mistura mecânica 2:1 β CD/FLU e composto de inclusão 2:1 β CD/FLU, em KBr na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ | 68 |
| Figura 3.13: Espectro de FTIR-HATR para a β CD em solução aquosa na região entre $1600 \text{ a } 800 \text{ cm}^{-1}$, após subtração do espectro da água..... | 70 |
| Figura 3.14: Espectro de FTIR-HATR para a FLU em solução aquosa na região entre $1600 \text{ a } 800 \text{ cm}^{-1}$, após subtração do espectro da água..... | 70 |
| Figura 3.15: Espectro de FTIR-HATR para o composto de inclusão entre a β CD e a FLU em solução aquosa na região entre $1600 \text{ a } 800 \text{ cm}^{-1}$, após subtração do espectro da água..... | 71 |
| Figura 3.16: Espectro de FTIR-HATR para a β CD (8,0 mM), FLU (11,6 mM) e o respectivo composto de inclusão em solução aquosa na região entre $1600 \text{ a } 800 \text{ cm}^{-1}$, após subtração do espectro da água..... | 73 |
| Figura 3.17: Curva de Job correspondente à variação de intensidade referente ao $\nu_{(C-O-C)}$ da β CD por FTIR-HATR para o sistema β CD/FLU..... | 74 |
| Figura 3.18: Espectro de RMN de ^1H da β CD a 400 MHz em D_2O | 76 |
| Figura 3.19: Espectro de RMN de ^1H da Fluoxetina a 400 MHz em D_2O .. | 77 |
| Figura 3.20: Expansão do espectro de RMN de ^1H da Fluoxetina para a região de δ entre 2,10 a 3,40..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3.21: Expansão do espectro de RMN de ^1H da Fluoxetina para a região de δ entre 5,50 a 7,50..... | 79 |
| Figura 3.22: Mapa de contorno COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz, em D_2O | 80 |
| Figura 3.23: Espectro de RMN de ^{13}C para a Fluoxetina a 400 MHz em D_2O | 81 |
| Figura 3.24: Mapa de contorno HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a Fluoxetina a 400 MHz em D_2O | 81 |
| Figura 3.25: Expansão do espectro de RMN de ^1H , a 400 MHz em D_2O a) FLU e os CIs para as razões molares de 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.25:1, 1.5:1 e 2:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ em $\delta = 6.80 - 7.50$ e b) βCD e os CIs para as razões molares de 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.25:1, 1.5:1 e 2:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ em $\delta = 3.10 - 3.90$ | 85 |
| Figura 3.26: Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo de inclusão 1:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ a 400 MHz em D_2O | 86 |
| Figuras 3.27: a) mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 1:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ e b) mapa de contorno 2D NOESY a 400 MHz em D_2O para o sistema 2:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ | 90 |
| Figura 3.28: Curvas de titulação calorimétrica: a) Fluoxetina (17,5 mM) em água e da Fluoxetina (17,5 mM) em βCD (1,0 mM) b) curva final após subtração e seu ajuste não linear..... | 91 |
| <i>Capítulo 4: Resultados e Discussão: Sistema β-ciclodextrina/imipramina..</i> | 97 |
| Figura 4.1: Curvas TG/DTG para a Imipramina, em atmosfera de N_2 | 99 |
| Figura 4.2: Curva DSC para a Imipramina, em atmosfera de N_2 | 100 |
| Figura 4.3: Curvas TG para βCD , IMI, mistura mecânica 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e composto de inclusão 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, em atmosfera de N_2 | 101 |
| Figura 4.4: Curvas DSC para βCD , IMI, mistura mecânica 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e composto de inclusão 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, em atmosfera de N_2 | 102 |
| Figura 4.5: Curvas TG para βCD , IMI, mistura mecânica 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e composto de inclusão 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, em atmosfera de N_2 | 104 |
| Figura 4.6: Curvas DSC para βCD , IMI, mistura mecânica 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e composto de inclusão 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, em atmosfera de N_2 | 105 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.7: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Imipramina, em KBr na região entre 4000 – 400 cm ⁻¹ | 106 |
| Figura 4.8: Espectro de absorção na região do infravermelho para a βCD, IMI, mistura mecânica 1:1 βCD/IMI e composto de inclusão 1:1 βCD/IMI, em KBr na região entre 4000 – 400 cm ⁻¹ | 109 |
| Figura 4.9: Espectro de absorção na região do infravermelho para a βCD, IMI, mistura mecânica 2:1 βCD/IMI e composto de inclusão 2:1 βCD/IMI, em KBr na região entre 4000 – 400 cm ⁻¹ | 110 |
| Figura 4.10: Espectro de FTIR-HATR para a IMI em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm ⁻¹ , após subtração do espectro da água..... | 113 |
| Figura 4.11: Espectro de FTIR-HATR para o composto de inclusão entre a βCD e a IMI em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm ⁻¹ , após subtração do espectro da água..... | 114 |
| Figura 4.12: Espectro de FTIR-HATR para a βCD (6,5 mM), IMI (16,5 mM) e o respectivo composto de inclusão em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm ⁻¹ , após subtração do espectro da água..... | 115 |
| Figura 4.13: Curva de Job correspondente à variação de intensidade referente ao ν _(C-O-C) da βCD por FTIR-HATR para o sistema βCD/IMI..... | 117 |
| Figura 4.14: Representação esquemática dos possíveis sistemas que coexistem em solução formados entre a βCD e a IMI..... | 118 |
| Figura 4.15: Espectro de RMN de ¹ H da Imipramina a 400 MHz em D ₂ O. | 119 |
| Figura 4.16: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da Imipramina para a região de δ entre 1,70 a 3,80..... | 120 |
| Figura 4.17: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da Imipramina para a região de δ entre 6,60 a 7,20..... | 121 |
| Figura 4.18: Expansão do mapa de contorno COSY ¹ H/ ¹ H para a Imipramina a 400 MHz, em D ₂ O..... | 122 |
| Figura 4.19: Expansão do mapa de contorno NOESY ¹ H/ ¹ H para a Imipramina a 400 MHz, em D ₂ O..... | 123 |
| Figura 4.20: RMN de ¹³ C-DEPT 135 para a Imipramina a 400 MHz em D ₂ O..... | 124 |
| Figura 4.21: Expansão do mapa de contorno HSQC ¹ H/ ¹³ C-DEPT 135 para a Imipramina a 400 MHz em D ₂ O..... | 124 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.22: Expansão do mapa de contorno HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a Imipramina a 400 MHz em D_2O | 125 |
| Figura 4.23: Expansão do mapa de contorno HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a Imipramina a 400 MHz em D_2O | 126 |
| Figura 4.24: Espectro de RMN de ^{13}C para a Imipramina a 400 MHz em D_2O | 127 |
| Figura 4.25: Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em D_2O : a) CI 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e b) CI 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ | 128 |
| Figura 4.26: Expansão do espectro de RMN de ^1H , a 400 MHz em D_2O para a IMI, CI 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e CI 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ na região de $\delta = 6,60 - 7,50$. | 130 |
| Figura 4.27: Expansão do mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ | 134 |
| Figura 4.28: Expansão do mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ | 135 |
| Figura 4.29: Curvas de titulação calorimétrica: a) Imipramina (10,0 mM) em água e da Imipramina (10,0 mM) em βCD (0,5 mM) b) curva final após subtração e seu ajuste não linear..... | 137 |

Índice de Tabelas:

| | |
|---|-----|
| <i>Capítulo 1: Introdução.....</i> | 01 |
| Tabela 1.1: Características de algumas ciclodextrinas..... | 11 |
| | |
| <i>Capítulo 3: Resultados e Discussão: Sistema β-ciclodextrina/fluoxetina....</i> | 53 |
| Tabela 3.1: Relação de alguns modos vibracionais referentes à molécula de Fluoxetina, atribuídos através de seu espectro de absorção na região do infravermelho..... | 64 |
| Tabela 3.2: Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios da β CD, a 400 MHz em D_2O | 76 |
| Tabela 3.3: Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios da Fluoxetina, a 400 MHz em D_2O | 78 |
| Tabela 3.4: Valores de deslocamento químico para os hidrogênios da FLU, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/FLU, a 400 MHz em D_2O | 83 |
| Tabela 3.5: Valores de T_1 para a FLU, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/FLU e a variação de T_1 (ΔT_1) para cada sistema..... | 88 |
| Tabela 3.6: Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema β CD/FLU..... | 93 |
| | |
| <i>Capítulo 4: Resultados e Discussão: Sistema β-ciclodextrina/imipramina...</i> | 97 |
| Tabela 4.1: Relação de alguns modos vibracionais referentes à molécula de Imipramina, atribuídos através de seu espectro de absorção na região do infravermelho..... | 107 |
| Tabela 4.2: Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios da Imipramina, a 400 MHz em D_2O | 120 |
| Tabela 4.3: Valores de deslocamento químico para os hidrogênios da IMI, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/IMI, a 400 MHz em D_2O | 131 |
| Tabela 4.4: Valores de T_1 para a IMI, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/IMI e a variação de T_1 (ΔT_1) para cada sistema..... | 132 |
| Tabela 4.5: Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema β CD/IMI..... | 138 |

Resumo:

No presente trabalho os sistemas supramoleculares estabilizados por interações não-covalentes, formados pela associação da β -ciclodextrina com um antidepressivo bicíclico e outro tricíclico, a Fluoxetina (FLU) e a Imipramina (IMI) respectivamente, foram investigados por técnicas espectroscópicas (FT-IR, FTIR-HATR e RMN), análise térmica (TG/DTG e DSC) e ainda por calorimetria (ITC). A utilização dessas diferentes técnicas de análise físico-química permitiu propor não só a topologia dos complexos de inclusão, mas também definir a estequiometria desses complexos e os parâmetros termodinâmicos relativos ao processo de inclusão.

Os resultados obtidos pelas técnicas espectroscópicas (FT-IR, FTIR-HATR e RMN), para o sistema supramolecular formado pela interação entre a β CD e a Fluoxetina, indicaram a existência simultânea em solução de três formas do complexo de inclusão. A primeira e a mais estável seria aquela em que o anel aromático da FLU, o qual contém o grupo CF_3 substituído, interage com a cavidade da β CD. A outra possibilidade de inclusão ocorre quando o anel aromático monosubstituído da molécula da FLU está incluído na cavidade da β CD. Além disso, o resultado obtido pelo experimento de Job sugeriu a existência de um sistema supramolecular de razão molar 2:1 β CD/FLU, possivelmente, quando ambos anéis aromáticos da FLU estão incluídos na cavidade da β CD. Entretanto, os resultados de ITC indicaram o sistema 1:1 β CD/FLU como a espécie mais estável em solução, fornecendo ainda os parâmetros termodinâmicos ($\Delta G^0 = -21,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -17,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $T\Delta S^0 = 4,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Essa diferença entre as duas estequiometrias encontradas pelo

experimento de Job e a titulação por ITC, provavelmente ocorreu porque as propriedades físico-químicas utilizadas para investigar a interação entre as espécies são diferentes.

Para o composto de inclusão β CD/IMI os resultados obtidos pelos métodos espectroscópicos (FT-IR, FTIR-HATR e RMN) indicaram a interação entre os anéis aromáticos da IMI com a parte interna e externa da β CD. Além disso, quando a concentração de β CD aumenta na solução, a interação entre as espécies se torna mais evidente. A curva de Job indicou a existência de duas espécies em solução, uma quando a concentração de β CD é menor (1:2 β CD/IMI) e outra quando a β CD está mais concentrada (2:1 β CD/IMI); entretanto o complexo mais estável em solução é o 2:1 β CD/IMI. Os experimentos de ITC possibilitaram definir os parâmetros termodinâmicos da reação de inclusão ($\Delta G^0 = -21,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -30,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $T\Delta S^0 = -8,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$), a constante de equilíbrio e também a estequiometria do complexo, a qual está de acordo com os dados observados pelo experimento de Job.

Abstract:

In this work the supramolecular systems stabilized by the non-covalent interactions, formed by association of the β -cyclodextrin with a bicyclic and a tricyclic antidepressant, Fluoxetine and Imipramine respectively, were investigated by spectroscopies techniques (FT-IR, FTIR-HATR and NMR), thermal analysis (TGA and DSC) and also by calorimetric technique (ITC). The utilization of these physical-chemistry methods of analysis allowed to propose not only the supramolecular structure of the inclusion complexes, but also to define their thermodynamic parameters.

The results obtained by the spectroscopies techniques (FT-IR, FTIR-HATR and NMR), to the β CD/FLU supramolecular complex, indicated three possibilities of complex in solution simultaneously. The first possibility, and also the most stable the inclusion compound, is that when the Fluoxetine aromatic ring, in which the CF_3 group is presented, interacts with the β CD cavity. The other inclusion compound occurs when the Fluoxetine monosubstituted aromatic ring is included into the β CD cavity. In addition, the Job's plot suggests, also the existence of a supramolecular complex in 2:1 β CD/FLU molar ratio, possibly when probably; both aromatic rings of FLU are included in the β CD cavity. However, the ITC results indicated the 1:1 β CD/FLU as the most stable complex in solution, also providing the thermodynamic parameters ($\Delta G^\circ = -21.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = -17.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ = 4.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$). The difference between these two stoichiometries found might be explained by the different physical-chemistry probes used to investigate the interactions between β CD and FLU.

To the β CD/Imipramine inclusion compound, the spectroscopies methods (FT-IR, FTIR-HATR and NMR) indicated the interaction between the both Imipramine aromatic rings with all β CD hydrogens. In addition, when β CD concentration increases in solution the interactions between the host and guest molecules became more evident. The Job's plot demonstrated the existence of two possibilities of supramolecular complex; first when the β CD concentration is lower than Imipramine (1:2 β CD/IMI), and other when the β CD concentration is higher in solution (2:1 β CD/IMI). However, the 2:1 β CD/IMI complex is the most stable. The ITC experiments make possible to determinate the thermodynamic parameters ($\Delta G^{\circ} = -21.9 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^{\circ} = -30.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $T\Delta S^{\circ} = -8.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$) to the inclusion reaction, the equilibrium constant and also the complex stoichiometry, which this last is in accordance with the results obtained by Job's experiments.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1 – Introdução:

1.1 – Química Supramolecular:

Embora por muito tempo a *Química* tenha sido empírica e descritiva como uma ciência que trata das substâncias da natureza, dos elementos que a constituem, suas características, propriedades e processos de obtenção. Esta atualmente tem tido um importante papel no estudo da matéria. Através de uma análise mais refinada, a *Química* se tornou o estudo da composição das substâncias pela associação de átomos com o intuito de formar estruturas maiores, denominada moléculas, bem como a energia envolvida durante suas transformações. Esta associação entre átomos através de ligações covalentes descreve de forma bem clara o conceito de *Química Molecular*, que está interessada não somente em descobrir, mas também em controlar a estrutura, propriedade e ainda a transformação de sistemas moleculares [1].

Com o objetivo de buscar um entendimento mais amplo e profundo dessas reações químicas que ocorrem principalmente nos processos biológicos, uma nova visão, mais completa e profunda, da química é fundamental. Desta forma a química deve ser vista não somente como uma ciência de moléculas individuais formadas pela associação de átomos através de ligações covalentes, como é definida de forma clássica pela *Química Molecular*, mas também como uma investigação de como estas moléculas se agrupam e interagem, em pequenos agregados ou ainda formado por vastas populações de alta massa molecular [2-4]. Esta é a definição dada à *Química Supramolecular*, que tem como meta compreender e deter o controle das interações não-covalentes que ocorrem nestes sistemas supramoleculares. Do

mesmo modo em que há na *Química Molecular* um campo para o estudo das ligações covalentes, há um campo da *Química Supramolecular* para o estudo da química dos agregados moleculares e para a compreensão das forças intermoleculares que estabilizam esses sistemas. Esta é a química que vai “além da molécula” [5], cujo objetivo é definir as entidades supramoleculares, determinar as propriedades e características das supermoléculas, assim como são bem definidas para as próprias moléculas na *Química Molecular*. A *Química Supramolecular* é uma nova linha de pesquisa da química, mas que está se difundindo de forma rápida, devido à sua grande contribuição para diversas áreas do conhecimento como: química, física, biologia, materiais e ainda bioquímica [1, 5, 6].

O termo *Química Supramolecular* foi proposto por Jean-Marie Lehn, pesquisador agraciado com o Prêmio Nobel em 1987 juntamente com Donald J. Cram e Charles. J. Pedersen, em reconhecimento ao seu trabalho na área, há aproximadamente 50 anos atrás. Outro termo que surgiu com a definição da *Química Supramolecular* foi o das supermoléculas, que são entidades complexas e organizadas criadas a partir da interação de duas ou mais espécies químicas unidas através de forças intermoleculares [2]. Estas estruturas supermoleculares ou supramoleculares são resultado não somente de forças aditivas, mas também de interações cooperativas que podem incluir: ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações dipolares e ainda interações eletrostáticas [2, 3, 7, 8].

A química supramolecular pode ser dividida em três partes:

1- **a química associada ao reconhecimento molecular:** na qual uma molécula tem a capacidade de reconhecer outra molécula, para interagir de

forma específica através de interações do tipo não-covalente citadas anteriormente.

2- a química dos sistemas hóspede-hospedeiro: o estudo de complexos que são formados por duas ou mais moléculas unidas por forças não-covalentes, formando uma só estrutura, de modo geral estas moléculas hóspedes possuem um caráter anfifílico.

3- a química dos agregados moleculares ou auto-agregados: onde ocorre a associação de diversos sistemas supramoleculares independentes e estes interagem entre si formando um novo complexo supramolecular de alta massa molecular com propriedades específicas e diferentes dos sistemas isolados.

Embora a *Química Supramolecular* tenha sido reconhecida como ciência há pouco tempo, o critério do reconhecimento molecular já é definido e conhecido há mais tempo, desde 1894 [2, 3]. Este princípio foi proposto por Emil Fisher e foi baseado no mecanismo pelo qual uma enzima reconhece e interage de forma particular com um substrato específico, o que é comumente chamado de princípio *chave-fechadura*, caracterizado principalmente, pelas enzimas e receptores. A existência de produtos naturais que são capazes de reconhecer moléculas específicas já é conhecida desde a década de 50, como podem ser citados oligopeptídeos como a valinomicina e as ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos [2, 4].

Desta forma, o número de sistemas supramoleculares, naturais ou sintéticos, existentes hoje é imenso, devido não somente à existência de uma intensa pesquisa relacionada a estes materiais, mas também ao apelo tecnológico que estes sistemas possuem, principalmente pelo destaque atual

da nanotecnologia e ainda pela procura por matérias inteligentes. Dentre os sistemas supramoleculares conhecidos, ou ainda moléculas capazes de formar este tipo de complexos, alguns são apresentados na Figura 1.1:

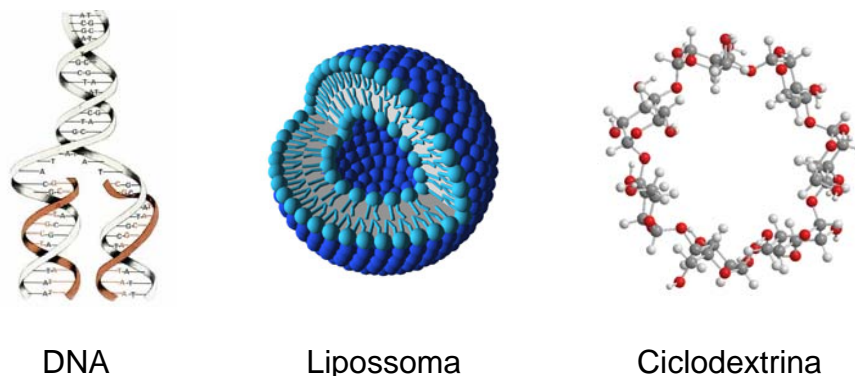


Figura 1.1: Exemplos de sistemas supramoleculares.

Devido ao fato desses sistemas supramoleculares serem estabilizados por forças intermoleculares relativamente fracas, quando comparadas com ligações do tipo covalente presentes nos sistemas moleculares, a utilização de diversas técnicas físico-químicas de análise é de grande importância para sua caracterização. Além da sutileza das interações entre as moléculas hóspede-hospedeira que formam um sistema supramolecular, estes sistemas geralmente possuem tamanho nanométrico, tornando um desafio ainda maior sua elucidação estrutural, tanto através de técnicas de análise no estado sólido quanto para as técnicas em solução [9, 10].

Neste trabalho foram caracterizados os sistemas supramoleculares formados pela β -ciclodextrina e dois antidepressivos, através de técnicas físico-químicas de caracterização no estado sólido e em solução. Esta caracterização teve como objetivo principal a elucidação da estrutura supramolecular formada

por estes complexos de inclusão e ainda avaliar os parâmetros termodinâmicos relacionados às reações de inclusão.

1.2 – Histórico e Propriedades das Ciclodextrinas:

Em 1891 através da digestão enzimática (*Bacillus amylobacter*) do amido as ciclodextrinas foram isoladas. As ciclodextrinas pertencem à classe de oligossacarídeos cíclicos e possuem características muito semelhantes à celulose [11]. Sua composição foi determinada $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ e o composto denominado “celulosine”. Hoje se sabe que *Villiers*, o primeiro a obter esses compostos, isolou a α - e β -ciclodextrina, em 1891. Somente em 1911, *Schardinger* isolou também dois compostos cristalinos pela digestão enzimática do amido de batata, em proporções diferentes, os quais foram identificados e nomeados de α - e β -dextrinas. Mas, em 1911, a α - e β -dextrinas de *Schardinger* foram denominadas de ciclodextrinas em sua homenagem, devido a sua grande contribuição na área [11]. Durante o período de descoberta das ciclodextrinas (1891 a meados de 1930) as três principais ciclodextrinas naturais foram obtidas através da hidrólise enzimática do amido, mas suas massas moleculares, estruturas químicas e a maioria de suas propriedades físico-químicas ainda eram desconhecidas. Somente em 1938, as estruturas das principais ciclodextrinas naturais (α -, β -, e γ -CD) foram determinadas e nos anos seguintes seus pesos moleculares foram também determinados, por *K. Freudenberg* e *M. Meyer-Delius* [8, 11, 12].

Desta forma, a estrutura das ciclodextrinas pode ser definida como sendo oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades glicosídicas, onde

cada monômero possui conformação na forma de cadeira e suas unidades são unidas por ligações do tipo α (1-4), Figuras 1.2 e 1.3 [8].

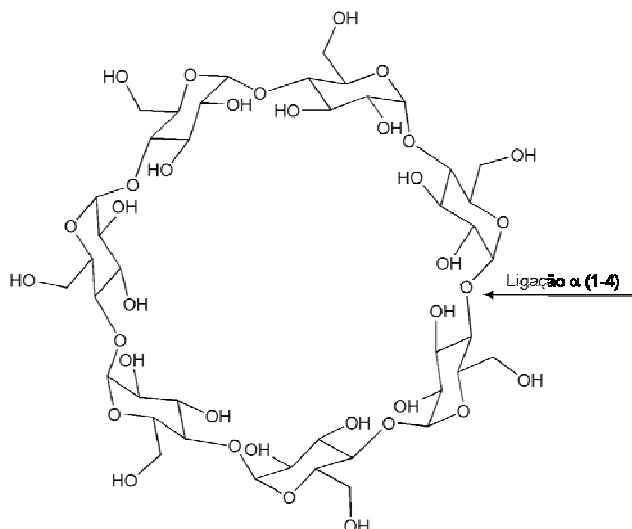


Figura 1.2: Fórmula estrutural da β -ciclodextrina.

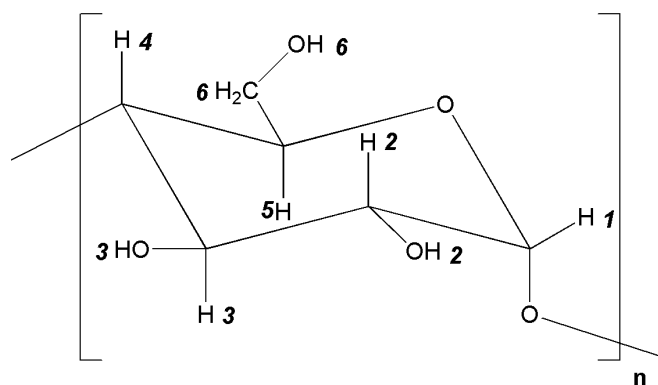


Figura 1.3: Fórmula estrutural de uma unidade glicosídica em conformação de cadeira.

Através do tratamento do amido com a amilase obtida a partir do *Bacillus macerans* pode ser obtida uma mistura bruta de α -ciclodextrina ($\approx 60\%$), β -ciclodextrina ($\approx 20\%$), γ -ciclodextrina ($\approx 20\%$) e ainda pequenas quantidades de outras ciclodextrinas com mais de oito unidades glicosídicas. Entretanto essa mistura é de difícil separação e purificação [11].

Com o avanço tecnológico que ocorreu nos anos 70, um grande aprimoramento na obtenção e purificação das ciclodextrinas foi possível. Essas agora são obtidas através da digestão enzimática do amido pela enzima *ciclodextrina glicosil transferase* (CGTase). Esta enzima possui como vantagens o fato de ser mais ativa e ainda específica na produção de α CD, β CD e γ CD do que as enzimas utilizadas anteriormente. Desta forma, essas enzimas mais seletivas possibilitaram a utilização das ciclodextrinas como excipientes farmacêuticos, aditivos na indústria alimentícia e ainda na indústria de cosméticos [8, 11, 12]. Outro fato de grande importância é que uma drástica redução no preço das ciclodextrinas foi possível. Em 1970 a β -ciclodextrina custava cerca de 2000,00 dólares o kilo e hoje custa aproximadamente 5 dólares o kilo [11].

As ciclodextrinas naturais, comumente empregadas e com maior interesse tecnológico são: α -, β - e a γ -ciclodextrina, com respectivamente 6, 7 e 8 unidades glicosídicas. No estado sólido essas ciclodextrinas encontram-se hidratadas, com uma média de 6, 11 e 17 moléculas de água, respectivamente. Estas moléculas de água por sua vez podem estar localizadas tanto na cavidade quanto estar presentes entre as moléculas de ciclodextrina [8, 12-16].

Além das ciclodextrinas obtidas naturalmente, podem ser preparadas ciclodextrinas modificadas quimicamente através de diferentes rotas sintéticas, com o objetivo de se dispor de moléculas com propriedades físico-químicas diferentes, como por exemplo, para se atingir um valor de solubilidade desejada [17]. De modo geral, as ciclodextrinas modificadas são obtidas através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas (OH₆). A estratégia de modificação depende do produto final que se almeja. Se o objetivo é uma

ciclodextrina altamente solúvel para a aplicação em formulações farmacêuticas, a substituição nos grupos (OH6) por grupos sulfato poder feita obtendo-se a solubilidade desejada. A Figura 1.4 apresenta alguns dos substituintes existentes, como: etila, hidroxipropila e sulfobutila. Entretanto, a substituição desses grupos nas ciclodextrinas pode levar a uma mistura de produtos não homogênea o que pode tornar o produto final mais caro, devido aos custos dos processos de purificação [17].

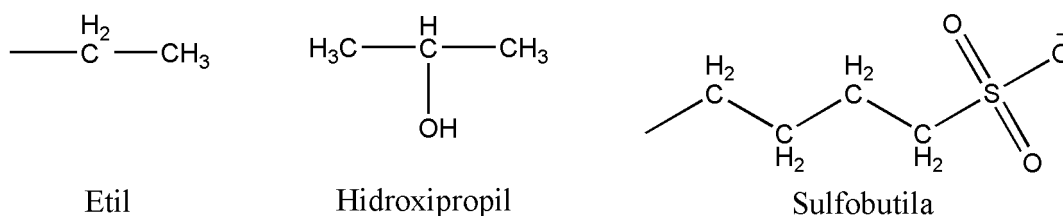


Figura 1.4: Formula estrutural de alguns de substituintes em ciclodextrinas modificadas.

As ligações glicosídicas (C₁-O₁-C₄), fazem com que as ciclodextrinas possuam uma estrutura relativamente rígida, que não é perfeitamente simétrica. A geometria das ciclodextrinas é comumente descrita como sendo a de um cone truncado. Como consequência desta conformação, as hidroxilas primárias (OH6) estão situadas na borda de menor diâmetro enquanto que as hidroxilas secundárias (OH2 e OH3) estão localizadas na borda superior, de maior diâmetro do cone, Figura 1.5. Embora estas hidroxilas localizadas na parte externa da CD estejam comprometidas efetuando ligações de hidrogênio, as CDs possuem um alto poder de solvatação, conferindo um caráter hidrofílico a região externa da molécula. Na parte interior da CD estão presentes os hidrogênios (CH3 e CH5) e ainda os grupos (C₁-O₁-C₄) [13]. No interior da

cavidade, existem moléculas de água que também podem formar ligações de hidrogênio de alta energia com o grupo (C₁-O₁-C₄). Estas ligações de hidrogênio têm um caráter energético mais alto do que as ligações de hidrogênio convencionais presentes na solução, devido à tensão sofrida no anel. Estes aspectos contrários à presença das moléculas de água no interior das ciclodextrinas proporcionam a essa região da molécula um caráter hidrofóbico [8, 12, 13].

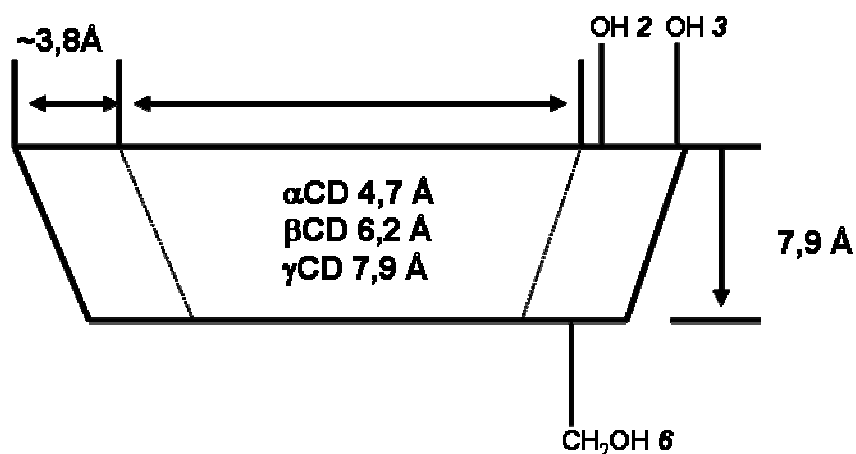


Figura 1.5: Representação esquemática das estruturas da α-, β-, e γ-ciclodextrina e suas dimensões.

A diferença de solubilidade entre as ciclodextrinas, αCD (145,0 g/L), βCD (18,5 g/L) e γCD (232,0 g/L), pode ser explicada pela formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias, (OH₂) e (OH₃). A βCD apresenta uma estrutura mais rígida devido a ligações de hidrogênio, formada entre essas hidroxilas, conferindo à βCD menor solubilidade em água quando comparada à α- e à γ-ciclodextrina. Na αCD, como uma unidade glicosídica esta distorcida, as seis possíveis ligações de hidrogênio não ocorrem, logo

somente quatro ligações de hidrogênio são observadas, favorecendo assim sua solubilidade em água. Já para a γ CD, ao fato de esta possuir uma cadeia mais flexível, atribui-se a sua maior solubilidade quando comparada com as anteriores [8, 12, 13].

O tamanho da cavidade de cada ciclodextrina varia de acordo com o número de unidades de glicosídeos que estas possuem. Na Tabela 1.1 e Figura 1.5 são apresentados às dimensões e a solubilidade das ciclodextrinas mais comuns.

Tabela 1.1: Características de algumas ciclodextrinas.

| | α CD | β CD | γ CD |
|---|----------------|----------------|----------------|
| Número de unidades glicosídicas | 6 | 7 | 8 |
| Massa molecular g mol^{-1} | 972 | 1135 | 1297 |
| Solubilidade em água, a 25 °C g L^{-1} | 145,0 | 18,5 | 232,0 |
| Diâmetro da cavidade /Å | 4,7 – 5,3 | 6,0 – 6,5 | 7,5 – 8,3 |
| Altura /Å | 7,9 \pm 0,1 | 7,9 \pm 0,1 | 7,9 \pm 0,1 |
| Diâmetro externo /Å | 14,6 \pm 0,4 | 15,4 \pm 0,4 | 17,5 \pm 0,4 |

Devido às características das ciclodextrinas citadas acima, estas possuem a capacidade de formar diferentes compostos supramoleculares (compostos de inclusão ou compostos de associação) com outras moléculas hóspedes através de interações intermoleculares [14, 18-22].

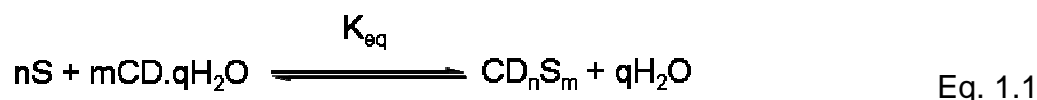
Deste modo, o sistema hóspede (molécula incluída) – hospedeiro (ciclodextrina) tem sido extensivamente pesquisado para diversas classes de moléculas, tanto nas indústrias têxtil, alimentícia e de cosméticos quanto na farmacêutica [11, 20, 21, 23-26]. Mas sem dúvida, uma das maiores áreas de interesse de pesquisa é a busca por sistemas de liberação sustentada de

fármacos [18, 19, 22, 27, 28]. Sendo assim, a pesquisa por novas estratégias de liberação modificada de fármacos é uma importante área de estudo, já que, algumas moléculas usadas em formulações farmacêuticas tradicionais não são tão eficazes, devido sua à baixa solubilidade, forma inadequada de administração e graves efeitos colaterais associados ao seu uso.

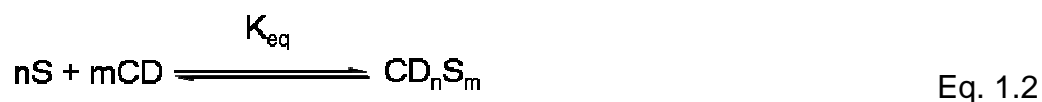
Desta forma, a utilização de sistemas supramoleculares como hidrogéis, micro e nanoesferas de polímeros biodegradáveis, lipossomas e também complexos de inclusão com ciclodextrinas (complexos hóspede-hospedeiro), são estratégias alternativas de grande relevância no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para liberação de fármacos [29-31].

As ciclodextrinas têm mostrado um importante papel como sistemas de liberação sustentada de fármacos, devido a suas habilidades de alterar as propriedades físicas, químicas e biológicas de algumas moléculas através da formação de compostos de inclusão [32]. As ciclodextrinas são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, aumentando assim sua biodisponibilidade e conseqüentemente reduzindo os seus efeitos colaterais [13, 18, 26]. São ainda capazes de aumentar a estabilidade física e química do substrato e ainda eliminar algumas propriedades indesejáveis dos fármacos após a inclusão, como por exemplo, redução nos efeitos colaterais [11].

O processo de formação de composto de inclusão em solução ocorre, de forma simplificada, primeiramente pela saída das moléculas de água do interior da cavidade e posteriormente pela inclusão da molécula ou parte desta na cavidade da ciclodextrina. Esse processo pode ser descrito pela Equação 1.1 e 1.2:



ou de forma simplificada:



sendo “S” a molécula hóspede, “CD” a ciclodextrina, “CD_nS_m” o composto de inclusão formado. Os coeficientes estequiométricos da reação são representados por “n”, “m”, “q” e K_{eq} a constante de equilíbrio, na qual pode se levar em conta ou não as moléculas de água envolvidas no processo [7].

A expressão para a constante de equilíbrio pode ser representada pela Equação 1.3 [33]:

$$K_{m:n} = \frac{[S_m CD_n]}{[S]^n [CD]^m} \quad \text{Eq. 1.3}$$

O valor da constante de equilíbrio não pode ser obtido diretamente, já que esta depende da estequiometria do sistema formado; entretanto esta última nem sempre é facilmente determinada. Esta dificuldade é devido ao fato de as técnicas de caracterização físico-químicas existentes e aplicadas a este tipo de sistema com ciclodextrinas não serem sensíveis à distinção entre as espécies livres e as espécies incluídas, tanto em solução quanto no estado sólido [33]. Outro ponto que dever ser observado, com relação aos compostos de inclusão formados, é a possibilidade de existência de mais de um tipo de equilíbrio em solução, dificultando a determinação do valor da constante de equilíbrio [33-35].

Existe ainda outro fator agravante, no que diz respeito às dificuldades de caracterização destes sistemas, que é a possibilidade de formação de auto-agregados o que também dificulta a determinação da estequiometria do sistema. Isso porque os modelos matemáticos assumem que o complexo hóspede-hospedeiro hidratado formado é uma solução ideal nas quais estes complexos são individuais e independentes uns dos outros, ou seja, não levam em conta a formação dos agregados [33, 36, 37].

Em razão dessas dificuldades inerentes à determinação da estequiometria, da constante de equilíbrio e dos parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$) do processo de formação destes sistemas, o estudo dessa classe de compostos supramoleculares formados por ciclodextrinas requer a utilização de diversas técnicas físico-químicas de análise de forma a se definir a estrutura supramolecular formada. Logo o estudo desta classe de compostos tem um apelo não só acadêmico, mas também tecnológico.

Pela ótica acadêmica, o estudo dessa classe de sistemas controlados por interações não-covalentes e que possuem interessantes propriedades físico-químicas, pode ajudar a compreender outros sistemas supramoleculares já descritos na literatura, que se baseiam em interações não-covalentes, como, micelas de surfactantes, enzima-receptor e ainda biomembranas [38-40], além da necessidade do aprimoramento e ainda o desenvolvimento de diversas técnicas físico-químicas de análise.

Dentre essas técnicas podemos citar as espectroscopias, onde se destacam a Ressonância Magnética Nuclear através dos experimentos de: hidrogênio (^1H), tempo de relaxação longitudinal (T_1), Efeito Nuclear Overhauser (NOE) e ainda experimentos de difusão (DOSY) [41-44] e

espectroscopia na região do infravermelho, tanto no estado sólido quanto em solução [45, 46]. São ainda de grande relevância as técnicas de espalhamento de luz: dinâmico e estático e as microscopias que auxiliam na determinação do tamanho dos sistemas formados [9, 43]. É ainda necessário mencionar técnicas como a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a calorimetria isotérmica de titulação (ITC). Esta última possibilita, algumas vezes, determinar tanto a constante de equilíbrio quanto os parâmetros termodinâmicos da reação (ΔG^0 , ΔH^0 e $T\Delta S^0$) [47-49].

Do ponto de vista tecnológico é de grande importância o desenvolvimento de sistemas modificados de liberação de fármacos com ciclodextrinas, os quais podem aumentar a biodisponibilidade dos princípios ativos, diminuindo a concentração do fármaco e conseqüentemente reduzindo assim o custo do produto final [11]. Outro apelo industrial é associado à redução da concentração do fármaco com uma conseqüente minimização dos efeitos colaterais que pode vir a ser observada, trazendo maior segurança e comodidade no uso do medicamento pelo paciente.

1.3 – Moléculas Hóspede:

As moléculas escolhidas para a complexação com a β -ciclodextrina foram, o Cloridrato de Imipramina e o Cloridrato de Fluoxetina, pertencentes a duas classes distintas de antidepressivos.

Essas foram escolhidas pelo fato de ambas possuem a possibilidade de formação de compostos de inclusão com razões molares de 1:1 ou superior a

esta, uma vez que possuem dois anéis aromáticos disponíveis para interagir efetivamente com a cavidade da β CD.

Estudos prévios reportados por Ali e colaboradores [35] serviram de inspiração para o trabalho, uma vez que já havia sido reportada a possibilidade da formação do composto de inclusão entre a Fluoxetina e a β -ciclodextrina, bem como a existência de um equilíbrio entre mais de um tipo de complexo. De modo a buscar um melhor entendimento sobre a topologia desses complexos e ainda definir sua estequiometria a utilização de técnicas como FTIR-HATR e ITC foram utilizadas.

Outra motivação para a escolha dessas duas moléculas foi a possibilidade do aumento da biodisponibilidade dos fármacos e com isso uma redução na concentração dos mesmos, quando formulados farmaceuticamente. Essa redução terá como consequência uma possível diminuição nos efeitos colaterais.

1.3.1 – Transtornos depressivos:

Os transtornos depressivos podem ser definidos como pequenas alterações no humor. Esse tipo de transtorno é observado de forma semelhante em adultos e crianças, embora até a década de 60 alguns psicanalistas afirmassem que a depressão na infância não ocorresse. Hoje se sabe que os transtornos depressivos podem ocorrer na infância e adolescência, e que estes são semelhantes aos transtornos observados nos indivíduos adultos [50].

Dentre os transtornos depressivos mais comuns podem se destacar os distúrbios afetivos, aqueles relacionados ao humor, como a depressão unipolar e o transtorno bipolar, este último sendo o mais grave [51].

A depressão unipolar, transtorno psiquiátrico mais comum entre os adultos, é geralmente associado aos eventos estressantes do dia-a-dia e acompanhado por sintomas de ansiedade e agitação. Este tipo de depressão engloba 75 % dos casos de depressão unipolar. Outros pacientes, cerca de 25 % dos casos, podem apresentar quadros depressivos, chamados de depressão endógena, que não estão relacionados a fatores externos. Entretanto, a depressão bipolar, que geralmente é observada em indivíduos adultos, é menos comum e resulta em estados mistos, com aspectos maníacos e depressivos, oscilando por períodos curtos de tempo [51].

A principal teoria bioquímica que explica a depressão é a hipótese das monoaminas, proposta por Joseph J. Schildkraut em 1965, que afirma que a depressão é causada por uma deficiência funcional das monoaminas transmissoras (noradrenalina e/ou 5-hidroxitriptamina) em certos sítios específicos do cérebro, enquanto que a mania é um resultado do excesso funcional destas monoaminas e pode ser ilustrada pela Figura 1.6 [51, 52].

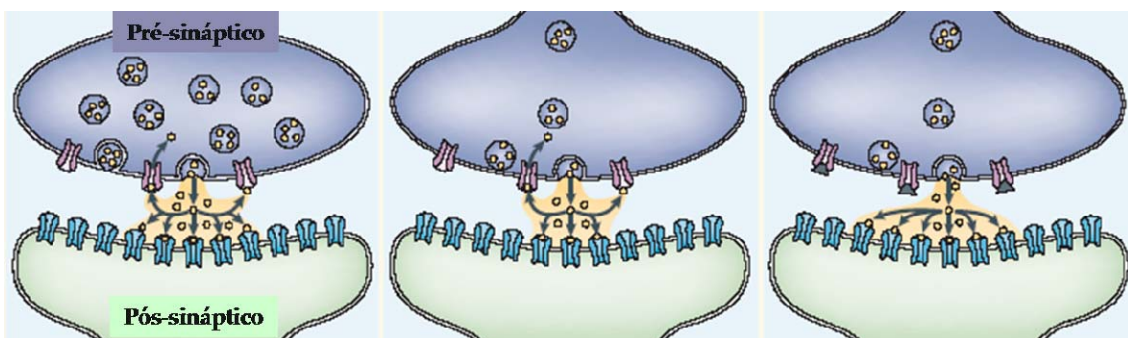


Figura 1.6: Representação da Teoria das monoaminas.

Esta teoria surgiu originalmente dos efeitos clínicos observados de fármacos, antidepressivos tricíclicos e inibidores de monoamina oxidase, que causam alívio aos sintomas da depressão. Esses fármacos possuem como característica manter por um maior período de tempo os neurotransmissores na fenda sináptica, impedindo sua recaptação [52]. Embora a teoria das monoaminas seja insuficiente como uma explicação para a causa da depressão, a manipulação farmacológica da transmissão monoaminérgica permanece como a melhor explicação para entender as ações dos fármacos antidepressivos [51].

Dentre os fármacos antidepressivos existentes atualmente podemos separá-los em algumas classes:

1. Inibidores da captação de monoaminas:

1.1 antidepressivos tricíclicos (**Imipramina** e Amitriptilina): inibidores não-seletivos da captação de monoaminas, ou em alguns casos seletivos da noradrenalina.

1.2 antidepressivos inibidores da captação de serotonina (**Fluoxetina**, Fluvoxamina, Paroxetina e Sertralina): atuam por inibir a captação de serotonina pelas terminações monoaminérgicas facilitando a transmissão.

1.3 outros inibidores que não se relacionam quimicamente aos tricíclicos, mas sim farmacologicamente (Maprotilina e Reboxetina).

2. Inibidores da monoamino oxidase (Fenelzina e Tranicipromina) não são seletivos em relação aos subtipos A e B da monoamino oxidase.

3. Antidepressivos variados: (Mianserina e Trazodona) são compostos com efeitos bloqueadores não-seletivos de receptores e suas ações antidepressivas ainda são pouco entendidas.

No presente trabalho foram selecionados dois antidepressivos de subclasses diferentes, um antidepressivo tricíclico e um bicíclico, Imipramina e Fluoxetina respectivamente.

1.3.2 – Antidepressivos Tricíclicos:

Os fármacos tricíclicos fazem parte de um grupo importante de antidepressivos de primeira geração de uso clínico. Os antidepressivos tricíclicos (TCA) foram desenvolvidos em 1949 com a função de antipsicóticos e a partir da década de 50 foram utilizados como antidepressivos. Ainda hoje os TCA são utilizados no tratamento sintomático da depressão, crônica ou profunda e para outras síndromes, como as observadas na fase depressiva do transtorno bipolar. Estes também são empregados no tratamento de dores neuropáticas de pacientes que não respondem aos opiáceos, tanto para uso clínico em adultos quanto em crianças [51].

Sua nomenclatura, tricíclico, está relacionada à presença de três anéis aromáticos na fórmula estrutural dos fármacos e sua estrutura está intimamente relacionada com a estrutura das fenotiazinas que são utilizadas como intermediário na síntese de fármacos antidepressivos [51]. Estes TCA diferem das fenotiazinas principalmente pela substituição do enxofre e ainda pela adição de mais um grupo CH_2 ao anel central.

Como exemplos de antidepressivos tricíclicos podem ser destacados:

Imipramina (Figura 1.7), Clomipramina, Doxepina e ainda Desipramina [53].

No início, a Imipramina não foi utilizada para o tratamento da esquizofrenia, mas sua utilização se mostrou eficaz na clínica de diversos tipos de depressão sendo ainda utilizada em crianças em casos de distúrbios do sono. A partir da Imipramina outros compostos antidepressivos como a Clomipramina foram sintetizados [51].

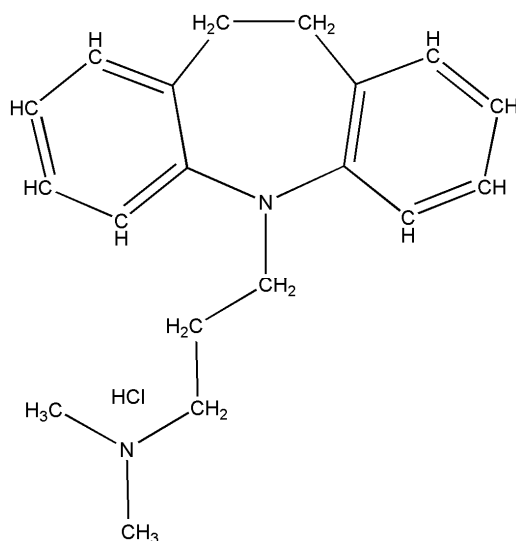


Figura 1.7: Fórmula estrutural do Cloridrato de Imipramina.

Contudo, os TCA, como a Imipramina, estão longe de serem ideais no tratamento de transtornos depressivos, uma vez que apresentam graves efeitos colaterais associados ao seu uso, como retenção urinária, taquicardia, visão turva e ainda boca seca. Em pacientes não-depressivos esta classe de fármacos pode causar confusão e uma redução na atividade motora. Em doses altas este tipo de medicamento pode levar à morte, onde seus principais efeitos são sobre o sistema nervoso central e o coração [53, 54].

1.3.3 – Antidepressivos Bicíclicos:

Os fármacos bicíclicos são aqueles que atuam de forma seletiva a captação de algumas monoaminas, e são conhecidos como inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs). O antidepressivo mais conhecido e se não, o mais utilizado nos dias atuais, é a Fluoxetina, Figura 1.8 [55, 56].

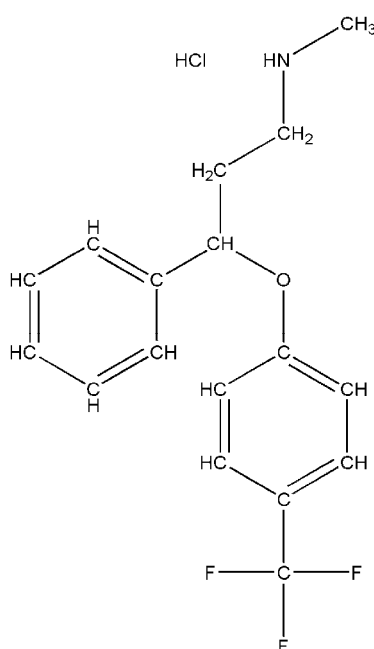


Figura 1.8: Fórmula estrutural do Cloridrato de Fluoxetina.

Em muitos países a Fluoxetina foi o primeiro SSRI que se tornou disponível para uso clínico e é usado para o tratamento da depressão. Desde sua aprovação, em 1988 [57, 58], este se tornou o antidepressivo mais prescrito no mundo. Em março de 1994, a Fluoxetina teve sua segunda indicação aprovada, para o tratamento de transtorno obsessivo compulsivo, e em abril deste mesmo ano ela teve sua aprovação unânime também para o tratamento de bulimia [55, 59]. A Fluoxetina, comercialmente conhecida como

Prozac[®], hoje é utilizada no tratamento de depressão unipolar, transtorno obsessivo compulsivo, bulimia, anorexia e ainda ataques de pânico sendo ainda empregada no tratamento de crianças depressivas [55, 60-62].

Este fármaco é um potente SSRI. Sua administração aumenta a função colinérgica e como consequência, os receptores de serotonina são desestabilizados após um longo período de sua utilização [35]. A dose inicial recomendada deste antidepressivo é de 20 mg/dia, embora adequada para maioria dos pacientes, esta dose pode chegar, mas não ultrapassar, 80 mg/dia [56, 63].

Na década de 90, a Fluoxetina foi considerada (pelos psiquiatras da época) um fármaco com efeitos colaterais aceitáveis, quando comparado com os antidepressivos tricíclicos, mas os resultados combinados de muitos testes não mostraram diferença global em termos de aceitabilidade deste medicamento pelos pacientes [64]. Hoje é conhecido que manifestações de raiva, ansiedade e insônia estão associadas à sua administração e possível interação com a glândula pineal. Outros efeitos colaterais são também reportados na literatura, como problemas gastrintestinais (náusea e vômito) e ainda uma redução na libido, em pacientes de ambos os sexos [65-67].

1.3.4 – Objetivos do trabalho:

O presente trabalho teve como objetivo preparar complexos supramoleculares entre a β -ciclodextrina e os fármacos Cloridrato de Imipramina e Cloridrato de Fluoxetina, pertencentes à classe dos antidepressivos tricíclicos e bicíclicos respectivamente.

Uma vez que esses antidepressivos (FLU e IMI) apresentam uma grande quantidade de efeitos colaterais, associados à sua administração por via oral, devido talvez às altas doses administradas por dia, a escolha da β -ciclodextrina, para a formulação farmacêutica teve como principal razão sua aprovação como excipiente por via oral, tanto pelo *Food and Drug Administration* (FDA) [57] quanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) [68] e ainda seu baixo custo em relação a outras ciclodextrinas também aprovadas para esse tipo formulação farmacêutica oral.

Depois de preparados, os compostos de inclusão formados, β CD/IMI e β CD/FLU, foram caracterizados por diversas técnicas físico-químicas de análise, com o objetivo de determinar e compreender de forma mais profunda tanto as estruturas supramoleculares e interações ocorrentes entre as moléculas (hóspede e hospedeira), como também os parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔG° $T\Delta S^\circ$) relacionados à suas reações de complexação.

Outro ponto chave do trabalho foi buscar novas estratégias de estudo em solução, através de técnicas modernas de espectroscopia (FTIR-HATR), que permitissem avaliar de forma quantitativa não somente as interações entre as espécies, mas também inferir sobre a estrutura do complexo formado e sua estequiometria.

Foram utilizadas ainda, técnicas modernas de RMN com o objetivo de determinar a estrutura e dinâmica dos fármacos livres e seus respectivos complexos de inclusão com a β -ciclodextrina, e a técnica de calorimetria isotérmica de titulação com o intuito de determinar os parâmetros termodinâmicos das reações de complexação e ainda a estequiometria. Estes

parâmetros para os dois sistemas supramoleculares estudados são dados inéditos na literatura.

Por último, a utilização de técnicas físico-químicas de análise no estado sólido, com TG/DSC e FT-IR complementam e auxiliam na caracterização dos complexos supramoleculares formados.

1.4 – Algumas Técnicas de Caracterização Utilizadas:

Os tópicos a seguir estão destinados há relatar um pouco sobre as técnicas de Reflectância Total Atenuada Horizontal, Ressonância Magnética Nuclear e Calorimetria Isotérmica de Titulação. As outras técnicas físico-químicas de análise no estado sólido, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) e análise térmica (TG/DTG e DSC) não serão descritas, embora sejam de igual importância para a caracterização dos complexos de inclusão.

1.4.1 – Reflectância Total Atenuada Horizontal:

Com o grande crescimento de áreas de pesquisa onde a água é o solvente mais importante para sistemas químicos de interesse, como por exemplo, adsorção de proteínas, análise da orientação de biomembranas, investigação de reações enzimáticas, auto-organização e ainda sistemas hóspede-hospedeiro, a descoberta de técnicas físico-químicas de análise capazes de monitorar estas fracas interações intermoleculares destes sistemas são ainda um desafio [38-40].

Desta forma, com o desenvolvimento da técnica Reflectância Total Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) um acessório do FT-IR é possível à aquisição de espectros de alta resolução e qualidade a partir de soluções aquosas. Esta técnica espectroscópica está baseada na captação da radiação refletida pela interface da amostra, que pode ser sólida ou líquida, e o prisma, no qual parte desta radiação é absorvida pela amostra e posteriormente refletida para o detector, como representado na Figura 1.9 [69, 70].

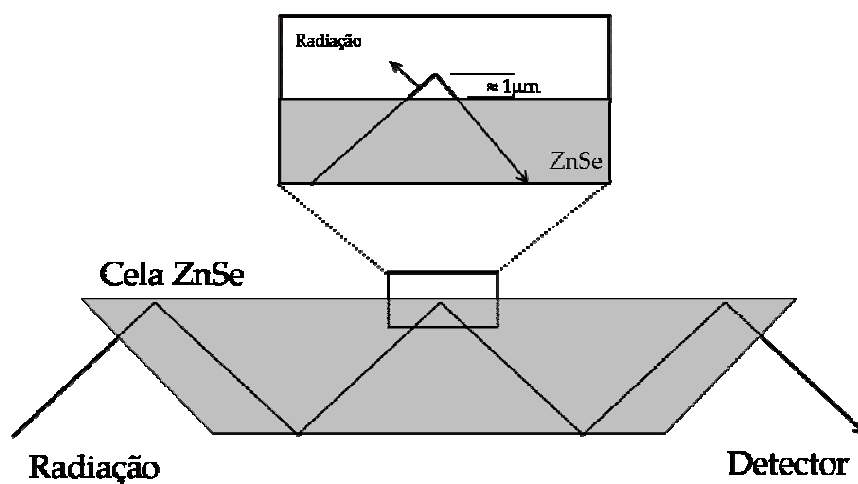


Figura 1.9: Representação esquemática do processo de reflectância obtido no experimento de FTIR-HATR.

Esta técnica é considerada uma das mais simples e rápidas espectroscopias de infravermelho *in situ* e como através dela é possível de se obter espectros de alta resolução em solução a diferentes concentrações, logo o FTIR-HATR torna-se uma excelente alternativa para análises em solução [71, 72]. O FTIR-HATR tem sido utilizado como método analítico na quantificação de componentes em substratos diversos: etanol em cerveja e sódio em

surfactantes em detergentes e ainda avaliação de processo de fermentação. Outra informação que pode ser obtida dos resultados de FTIR-HATR é referente às interações moleculares em solução aquosa [73-75]. Mas embora esta técnica espectroscópica de análise em solução, esteja sendo empregada para diversos processos químicos o estudo de sistemas supramoleculares do tipo hóspede-hospedeiro envolvendo ciclodextrinas ainda não foi relatado na literatura até então.

Desta forma esta técnica se torna uma nova sonda não somente com o objetivo de verificar mudanças nos modos vibracionais dos complexos de inclusão formados com ciclodextrinas, mas também como ferramenta para verificar e inferir sobre a estequiometria destes sistemas através de experimentos de Job [34, 76]. Estes experimentos utilizam a variação de uma propriedade física ou química do sistema em função da fração molar dos seus componentes para determinar a estequiometria do complexo formado.

1.4.2 – Ressonância Magnética Nuclear:

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas analíticas mais poderosas e versáteis. Através da RMN é possível conhecer a disposição espacial de grupos funcionais de moléculas ou ainda complexos, e estes dados relacionados à dinâmica molecular destes.

Devido à combinação de diversos experimentos modernos de ressonância desenvolvidos, a RMN tem sido amplamente utilizada no estudo da *Química Supramolecular*, com o objetivo de avaliar as interações intermoleculares que ocorrem, por exemplo, em sistemas do tipo hóspede-

hospedeiro envolvendo ciclodextrinas. A utilização de técnicas complementares de análise através da RMN para estes sistemas possibilita fornecer evidências da formação dos complexos de inclusão através do estabelecimento das constantes de formação e ainda das correlações espaciais. Logo a utilização da Ressonância Magnética Nuclear está diretamente associada à necessidade de compreender os sítios de interação entre a molécula hóspede e a hospedeira [77].

Desta forma os experimentos de RMN de ^1H são de grande importância na caracterização dos complexos supramoleculares através da análise da variação nos deslocamentos químicos em função da variação da concentração das espécies hóspede e hospedeira. As variações mais significativas de deslocamento químico são referentes aos núcleos que estão interagindo de forma efetiva e esta variação é resultado direto da complexação das espécies [43, 49, 77].

Outra forma de avaliar o processo de complexação é através das medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1). Desta forma o processo de relaxação magnética nuclear está relacionado ao restabelecimento do equilíbrio da magnetização dos núcleos que sofreram uma excitação mediante a aplicação de energia, na região da radiofrequência, e este processo é dependente das condições das vizinhanças. Desta forma, mudanças nos valores de T_1 podem dar indícios sobre a interação entre os sistemas hóspede-hospedeiro evidenciando os possíveis sítios de interação entre essas moléculas uma vez que o processo de relaxação dos núcleos depende diretamente dos movimentos nucleares afetados pela complexação [78].

A técnica bidimensional, NOESY, que se baseia no Efeito Nuclear Overhauser – NOE é muito indicada para a caracterização de sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrinas, uma vez que o efeito NOE não se propaga através das ligações químicas, mas apenas através do espaço. Logo, os experimentos de NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ são capazes de revelar correlações espaciais entre moléculas ou complexos em solução cujos núcleos de hidrogênio estejam interagindo no espaço a uma distância de até 5 Å. Desta forma este tipo de experimento permite que sejam estabelecidos não somente os sítios de interação, para sistemas supramoleculares, entre a ciclodextrina e a molécula hóspede, mas também possibilita inferir sobre a estequiometria do sistema e ainda sobre as forças intermoleculares envolvidas [78].

1.4.3 – Calorimetria Isotérmica de Titulação:

Uma das técnicas mais poderosas para o estudo de complexação é a Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC). Esta técnica permite obter, em um único experimento, parâmetros termodinâmicos como ΔG^0 , ΔH^0 e $T\Delta S^0$ para a interação entre um ligante e seu receptor, sendo possível ainda determinar a estequiometria do sistema formado. Isso porque o ITC utiliza como sonda para os processos de complexação a medida direta do fluxo de calor envolvido na reação. Uma vez que qualquer processo reacional envolve a quebra e formação de interações intermoleculares e que a estes fenômenos associa-se uma variação no fluxo de calor, logo o ITC se torna uma importante ferramenta para o estudo deste tipo de reação em solução. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para sistemas biológicos que envolvem interações entre

proteínas-ligantes, proteínas-ácidos nucléicos e proteína-proteína; entretanto tem sido ainda aplicada para sistemas supramoleculares, mais especificamente para complexos de inclusão com ciclodextrinas e para investigar a complexação entre éteres de coroa e metais [79].

Durante o processo de titulação por ITC, caso as espécies tituladas e titulantes sejam passíveis de sofrerem interações, ocorrerá uma variação de entalpia (ΔH^0) uma vez que haverá quebra e formação de interações entre as espécies. Como a cela é isotérmica essa variação de energia não poderá se refletir como um aumento de temperatura no sistema. Sendo a pressão constante, durante a titulação, ΔH^0 será equivalente à quantidade de calor recebida ou fornecida, Equação 1.4, pelo sistema, lembrando que o calorímetro é adiabático, mas a cela onde ocorre a titulação é isotérmica [80].

$$\Delta H = \left(\frac{dQp}{d[X]} \right)_p \quad \text{Eq. 1.4}$$

Onde Qp é um parâmetro medido experimentalmente, porém este fluxo de calor demora certo tempo, dt , para entrar ou sair do sistema.

Logo:

$$\Delta H = \left(\frac{dQp}{d[X]} \right)_p = \int_{t_1}^{t_2} F dt \quad \text{Eq. 1.5}$$

Para sistemas que interagem segundo uma estequiometria fixa, ou seja, não tendem a formar agregados moleculares em solução, e ainda apresentam valores relativamente altos para a constante de interação ($K > 10^5$), o perfil da curva de titulação calorimétrica tende a ser uma sigmóide, Figura 1.10 [79]. Esta curva pode ser dividida em duas regiões:

1- onde há excesso de titulado e cada injeção produzirá uma variação de entalpia diferente de zero.

2- onde há excesso de titulante e não mais levará a uma variação de entalpia.

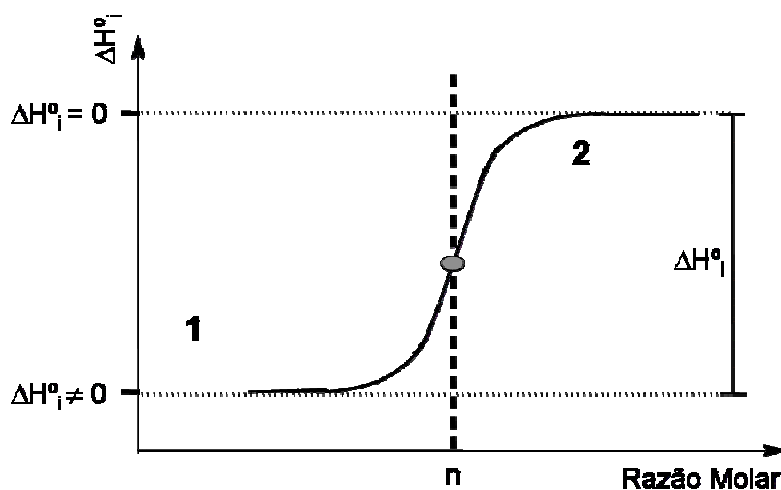


Figura 1.10: Representação de uma titulação calorimétrica de variação de entalpia (ΔH°) por razão molar (n).

Desta forma o modelo matemático que descreve a sigmóide para este tipo de processo é a isoterma de Wiseman e através deste ajuste é possível determinar simultaneamente a entalpia (ΔH°), a estequiometria (n) e a constante de equilíbrio do sistema (K) [79]. Sendo assim através de utilização das Equações 1.6 e 1.7 da termodinâmica é possível de determinar ΔG° e ainda o termo $T\Delta S^\circ$ [80].

$$\Delta_{\text{int}}G^\circ = -RT \ln K \quad \text{Eq. 1.6}$$

$$\Delta_{\text{int}}G^\circ = \Delta_{\text{int}}H^\circ - T\Delta_{\text{int}}S^\circ \quad \text{Eq. 1.7}$$

1.5 – Referências:

1. Lenh, J.-M., *Cryptates: Inclusion Complexes of Macropolycyclic Receptor Molecules*. Pure and Applied Chemistry, 1978. **50**: p. 871-892.
2. Ariga, K. and T. Kunitake, *Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications*. 2006, Leipzig: Springer-Verlag Heidelberg. 208.
3. Dodziuk, H., *Introduction to Supramolecular Chemistry*. 2002, New York: Kluwer Academic Publishers 350.
4. Hall, N., *Neoquímica - A química moderna e suas aplicações*. 2004, Porto Alegre: Bookman. 392.
5. Lenh, J.-M., *Design of organic complexing agents Strategies towards properties*. Structure & Bonding, 1973. **16**(1): p. 1-69.
6. Lenh, J.-M., *Supramolecular Chemistry: Receptors, Catalysts, and Carriers*. Science, 1985. **227**(4689): p. 849-856.
7. Rekharsky, M.V. and Y. Inoue, *Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1875-1918.
8. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
9. Bonini, M., et al., *Self-Assembly of -Cyclodextrin in Water. Part 1: Cryo-TEM and Dynamic and Static Light Scattering*. Langmuir, 2006. **22**(4): p. 1478 - 1484.
10. González-Gaitano, G., et al., *The Aggregation of Cyclodextrins as Studied by Photon Correlation Spectroscopy*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2002. **44**(1-4): p. 101-105.

11. Loftsson, T. and D. Duchene, *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **329**(1-2): p. 1-11.
12. Szejtli, J., *Past, present, and future of cyclodextrin research*. Pure and Applied Chemistry, 2004. **76**(10): p. 1825-1845.
13. Davis, M.E. and M.E. Brewster, *Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future*. Nature Reviews Drug Discovery, 2004. **3**(12): p. 1023-1035.
14. Stella, V.J. and R.A. Rajewski, *Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery*. Pharmaceutical Research, 1997. **14**(5): p. 556-567.
15. Zhang, M.-Q. and D.C. Rees, *A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 1999. **9**(12): p. 1697-1717.
16. Lindner, K. and W. Saenger, *Crystal and Molecular-Structure of Cyclohepta-Amylose Dodecahydrate*. Carbohydrate Research, 1982. **99**(2): p. 103-115.
17. Khan, A.R., et al., *Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins*. Chemical Review, 1998. **98**(5): p. 1977-1996.
18. Hirayama, F. and K. Uekama, *Cyclodextrin-based controlled drug release system*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **36**(1): p. 125-141.
19. Irie, T. and K. Uekama, *Cyclodextrins in peptide and protein delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **36**(1): p. 101-123.

20. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*. J. Pharm. Sci., 1996. **85**(10): p. 1017-1025.
21. Saenger, W., *Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1980. **19**(5): p. 344-362.
22. Sajeesh, S. and C.P. Sharma, *Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **325**(1-2): p. 147-154.
23. Hedges, A.R., *Industrial Applications of Cyclodextrins*. Chemical Review, 1998. **98**(5): p. 2035-2044.
24. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Cyclodextrins as pharmaceutical excipients*. Pharm. Tech. Eur., 1997. **9**: p. 26-34.
25. Thompson, D.O., *Cyclodextrins - enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals*. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 1997. **14**(1): p. 1-104.
26. Uekama, K., F. Hirayama, and T. Irie, *Cyclodextrin Drug Carrier Systems*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 2045-2076.
27. Evrard, B., et al., *Cyclodextrins as a potential carrier in drug nebulization*. Journal of Controlled Release, 2004. **96**(3): p. 403-410.
28. Uekama, K., *Recent Aspects of Pharmaceutical Application of Cyclodextrins*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2002. **44**(1-4): p. 3-7.

29. Sudhakar, Y., K. Kuotsu, and A.K. Bandyopadhyay, *Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs* Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 15-40.
30. Couvreur, P., et al., *Nanotechnologies for drug delivery: Application to cancer and autoimmune diseases* Progress in Solid State Chemistry, 2006. **34**(2-4): p. 231-235.
31. George, M. and T.E. Abraham, *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review* Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 1-14.
32. Stella, V.J., et al., *Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **36**(1): p. 3-16.
33. Loftsson, T., M. Másson, and M.E. Brewster, *Self-Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **92**(5): p. 1091-1099.
34. Denadai, A.M.L., et al., *Supramolecular Self-Assembly of [beta]-Cyclodextrin: An Effective Carrier of the Anti-microbial Agent Chlorhexidine*. Carbohydrate Research. 2007. **342**(15): p. 2286-2296.
35. Ali, S.M., et al., *Complexation of fluoxetine hydrochloride with [beta]-cyclodextrin. A proton magnetic resonance study in aqueous solution. II* Farmaco, 2005. **60**(5): p. 445-449.
36. Duan, M.S., et al., *Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: Formation of aggregates and higher-order complexes*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **297**(1-2): p. 213-222.

37. Magnusdottir, A., M. Másson, and T. Loftsson, *Self Association and Cyclodextrin Solubilization of NSAIDs*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2002. **44**(1-4): p. 213-218.
38. Kan, C.W. and C.W.M. Yuen, *Surface characterisation of low temperature plasma-treated wool fibre*. Journal of Materials Processing Technology, 2006. **178**(1-3): p. 52-60.
39. Laos, K., et al., *The adsorption of globular proteins, bovine serum albumin and [beta]-lactoglobulin, on poly-L-lysine-furcellaran multilayers*. Carbohydrate Polymers, 2006. **65**(3): p. 235-242.
40. Tang, Z.G. and J.A. Hunt, *The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro*. Biomaterials, 2006. **27**(25): p. 4409-4418.
41. Wimmer, R., et al., *NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules*. Carbohydrate Research, 2002. **337**(9): p. 841-849.
42. Simova, S. and S. Berger, *Diffusion measurements vs. chemical shift titration for determination of association constants on the example of camphor-cyclodextrin complexes*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2005. **53**(3): p. 163-170.
43. Denadai, Â.M.L., et al., *Self-assembly Characterization of the β -Cyclodextrin and Hydrochlorothiazide System: NMR, Phase Solubility, ITC and QELS*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2006. **55**(1-2): p. 41-49.

44. Dupuy, N., et al., *¹H NMR study of inclusion compounds of phenylurea derivatives in [beta]-cyclodextrin*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005. **61**(6): p. 1051-1057.
45. Brito, H.F., et al., *Spectroscopic study of the inclusion compound of beta-cyclodextrin and Tris(dibenzoylmethane)europium(III) dihydrate*. Spectrochimica Acta Part A, 1999. **55**(12): p. 2403–2410.
46. Lula, I.S., et al., *Study of Angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence specific NMR assignments and structural studies*. Peptides 2007. **28**(11): p. 2199-2210.
47. Sun, D.-Z., et al., *Isothermal titration calorimetry and ¹H NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with [beta]-cyclodextrin*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **316**(1-2): p. 7-13.
48. Mura, P., F. Maestrelli, and M. Cirri, *Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin and aminoacids*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **260**(2): p. 293-302.
49. De Sousa, F.B., et al., *Supramolecular complex of fluoxetine with beta-cyclodextrin: an experimental and theoretical study*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **aceito**.
50. Kaplan, H.I. and B.J. Sadock, *Compêndio de Psiquiatria*. Vol. 7^a. 2004, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, Lda 1169.
51. Rang, H.P., et al., *Farmacologia*. 5^a ed. 2004: Elsevier. 920.
52. Manji, H.K., W.C. Drevets, and D.S. Charney, *The cellular neurobiology of depression*. Nature Medicine, 2001. **7**(5): p. 541-547.

53. Rosenbaum, T.G. and M. Kou, *Are one or two dangerous? Tricyclic antidepressant exposure in toddlers*. Journal of Emergency Medicine, 2005. **28**(2): p. 169-174.
54. Juárez-Olguín, H., et al., *Adverse Effects of Imipramine are Increased by Interaction with ASA in Depressed Patients*. Neuropsychopharmacology, 2000. **22**(1): p. 100-101.
55. Wong, D.T., F.P. Bymaster, and E.A. Engleman, *Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication*. Life Sciences, 1995. **57**(5): p. 411-441.
56. Magnus, R., S. Preskorn, and R. Lane, *Minimum Effective Doses of SSRIs*. European Neuropsychopharmacology, 1996. **6**(Supplement 3): p. 121-121.
57. www.fda.gov. 2007 [cited].
58. Lavagnino, E.R., L.J. McShane, and B.B. Molloy, *1-Phenyl-3-(substituted phenoxy)propylamines.*, E.L.a. Company, Editor. 1980: USA.
59. Preskorn, S., R. Lane, and R. Magnus, *The SSRI Withdrawal Syndrome*. European Neuropsychopharmacology, 1996. **6**(Supplement 3): p. 121-121.
60. Baker, S.D. and D.L. Morgan, *Fluoxetine exposures: are they safe for children?* The American Journal of Emergency Medicine, 2004. **22**(3): p. 211-213.
61. Heikkinen, T., et al., *Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2002. **73**(4): p. 330-337.

62. Wang, W., et al., *Lack of effects by tricyclic antidepressant and serotonin inhibitors on anorexia in MCG 101 tumor-bearing mice with eicosanoid-related cachexia*. Nutrition, 2003. **19**(1): p. 47-53.
63. Stokes, P.E. and A. Holtz, *Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues*. Clinical Therapeutics, 1997. **19**(5): p. 1135-1250.
64. Song, F., et al., *Selective serotonin reuptake inhibitors: meta-analysis of efficacy and acceptability*. British Medical Journal, 1993. **306**(6879): p. 683-687.
65. Uz, T., et al., *The pineal gland and anxiogenic-like action of fluoxetine in mice*. Neuroreport 2004. **15**(4): p. 695-698.
66. Clayton, A., A. Kellera, and E.L. McGarvey, *Burden of phase-specific sexual dysfunction with SSRIs*. Journal Affective Disorders, 2006. **91**(1): p. 27-32.
67. G.K., I., et al., *Relative toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in overdose*. Journal of toxicology Clinical toxicology, 2004. **42**(3): p. 277-285.
68. www.anvisa.gov.br. 2007 [cited].
69. Tanaka, T., S. Nagao, and H. Ogawa, *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy of Functional Groups of Humic Acid Dissolving in Aqueous Solution*. Analytical Sciences, 2001. **17**(Supplement): p. i1081-i1084.
70. Grdadolnik, J., *ATR-FTIR Spectroscopy: Its Advantages and Limitations*. Acta Chim. Slov., 2002. **49**: p. 631-642.

71. Carolei, L. and I.G.R. Gutz, *Simultaneous determination of three surfactants and water in shampoo and liquid soap by ATR-FTIR*. *Talanta*, 2005. **66**(1): p. 118-124.
72. Armenta, S., et al., *Attenuated Total Reflection-Fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. **545**(1): p. 99-106.
73. Max, J.-J. and C. Chapados, *Infrared spectra of cesium chloride aqueous solutions*. *Journal of Chemical Physics*, 2000. **113**(16): p. 6803-6814.
74. Max, J.-J. and C. Chapados, *Infrared titration of aqueous NaOH by aqueous HCl*. *Canadian Journal of Chemistry*, 2000. **78**(1): p. 64-72.
75. Max, J.-J. and C. Chapados, *IR spectroscopy of aqueous alkali halide solutions: Pure salt-solvated water spectra and hydration numbers*. *Journal of Chemical Physics*, 2001. **115**(6): p. 2664-2675.
76. Jullian, C., et al., *Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007. **15**(9): p. 3217-3224.
77. Schneider, H.J., et al., *NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes*. *Chem. Rev.*, 1998. **98**(5): p. 1755-1786.
78. Claridge, T.D.W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* Vol. 19. 1999, London: Elsevier Ltda.
79. Turnbull, W.B. and A.H. Daranas, *On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?* *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(48): p. 14859-14866.
80. Klotz, I.M. and R.M. Rosenberg, *Chemical Thermodynamics*. 4 ed. Vol. 4. 1986: C. Jonh & Wiley Sons.

CAPÍTULO 2
Materiais e Métodos

2 – Materiais e Métodos:

2.1 – Reagentes Utilizados:

Os reagentes utilizados para a preparação e caracterização dos possíveis dispositivos de liberação sustentada estão listados abaixo, assim como algumas de suas propriedades físico-químicas e procedência. Os dois antidepressivos estudados foram cedidos, gentilmente, pelo Prof. Carlos Eduardo de M. Jensen, professor do Centro Universidade Newton Paiva, Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde. A pureza destes reagentes foi verificada usando experimentos de Ressonância Magnética Nuclear e medidas de ponto de fusão observado pelos experimentos de Calorimetria Diferencial Exploratória.

β-ciclodextrina:

Código: βCD.

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hepta-glucoamilose.

Fórmula molecular: $C_{42}H_{70}O_{35} \cdot 11H_2O$.

Massa molecular média: 1135 g mol^{-1} [1].

Solubilidade em água a 25 °C: $15,9 \text{ mmol L}^{-1}$ [1].

Ponto de fusão: 311,31 °C [2].

Característica: sólido branco semicristalino.

Fabricante: Xiamem Mchem Pharma LTD.

Lote: 20031210

Fórmula estrutural:

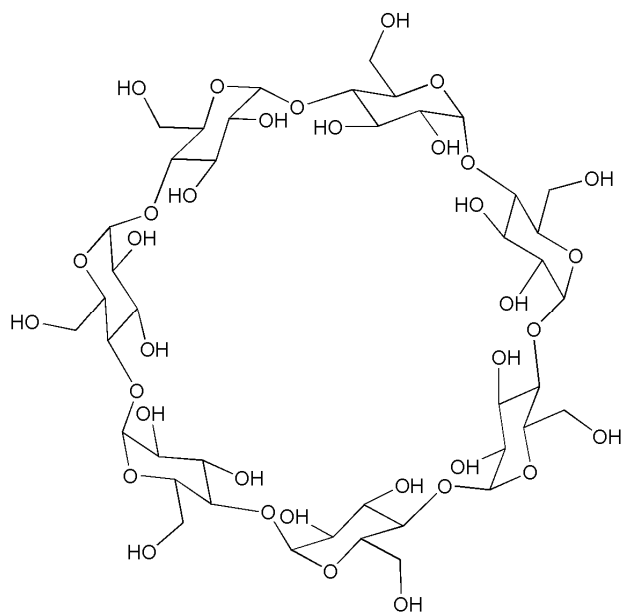


Figura 2.1: Fórmula estrutural da β -ciclodextrina.

Cloridrato de Fluoxetina

Código: FLU.

Nomenclatura IUPAC: N-metil- γ -[4-(trifluorometil)fenoxi]benzenopropanamina [3].

Fórmula estrutural: $C_{17}H_{18}F_3NO \cdot HCl$.

Massa molecular: $345,79 \text{ g mol}^{-1}$ [3].

Solubilidade em água a 25 °C: $\approx 15,0 \text{ mg mL}^{-1}$ [3].

Ponto de fusão padrão: 158,0 °C [4].

Ponto de Fusão experimental: 157 °C

Característica: sólido branco cristalino.

Fornecedor: Phama Nostras.

Lote: 05101363 A

Fórmula estrutural:

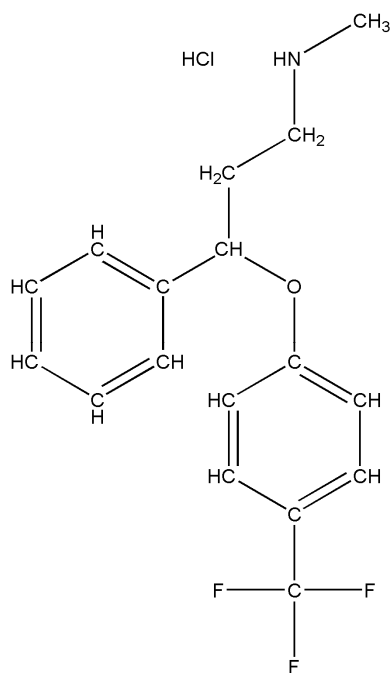


Figura 2.2: Fórmula estrutural do Cloridrato de Fluoxetina.

Cloridrato de Imipramina

Código: IMI.

Nomenclatura IUPAC: 5-[3-(dimetilamino)propil]-10,11-dihidro-5H-dibenzo[b,f]azepina [3].

Fórmula estrutural: C₁₉H₂₄N₂.HCl.

Massa molecular: 316,87 gmol⁻¹.

Solubilidade em água a 25 °C: ≈ 50,0 mgmL⁻¹.

Ponto de fusão padrão: 156,0 °C [5].

Ponto de Fusão experimental: 157 °C.

Característica: sólido branco cristalino.

Fornecedor: Galena

Lote: IH/015-12-2004

Fórmula estrutural:

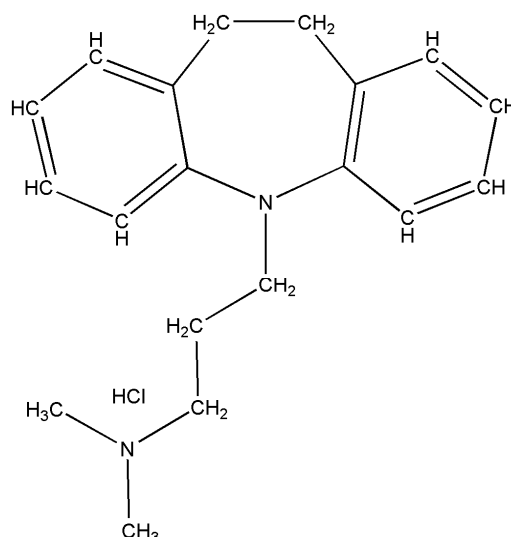


Figura 2.3: Fórmula estrutural do Cloridrato de Imipramina.

Outros reagentes utilizados:

- 1- Água Milli-Q®: Millipore, tipo 1.
- 2- Oxido de Deutério (D₂O): Cambridge Isotope Laboratories, Inc – 99,9 % de pureza isotópica.

2.2 – Equipamentos:

- Espectrofotômetro de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR), Perkin Elmer Spectrum GX.
- Acessório para Infravermelho, Reflectância Total Atenuada Horizontal.
- Cella de Seleneto de Zinco (ZnSe), para FTIR-HATR.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance DRX-400, operando a 400 MHz.
- Tubos de quartzo de 0,8 polegadas de comprimento e 5 milímetros de diâmetro externo, para RMN.

- Equipamento de análise termogravimétrica Shimadzu TGA-50H/DSC-50.
- Cadinho de alumina.
- Equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial 2920 TA Instruments.
- Cadinhos de alumínio.
- Liofilizador Savant MdulyoD – Freeze Dryer, Thermo Electron Corp.
- Microcalorímetro VP-ITC da Microcal.

2.3 – Descrição dos Experimentos:

2.3.1 – Preparo dos Compostos de Inclusão:

Uma vez que as moléculas hóspedes, Imipramina e Fluoxetina, estudadas no presente trabalho apresentam uma relativa solubilidade em água, aproximadamente 15 e 50 mgmL⁻¹, respectivamente [3], decidiu-se pelo preparo dos compostos de inclusão usando o método de liofilização [6, 7]. Este método de preparo consiste na solubilização da molécula hóspede (Fluoxetina ou Imipramina) e também da molécula hospedeira (β CD) em água. Desta forma, as soluções são unidas e mantidas sob agitação por um período de tempo suficiente para que o sistema entre em equilíbrio dinâmico. Após este período de agitação a solução é imediatamente congelada em nitrogênio líquido e submetida ao processo de liofilização, até a obtenção de um sólido completamente seco [7].

Com o objetivo de comparação com os complexos de inclusão, misturas mecânicas foram preparadas e avaliadas através das técnicas de análise no estado sólido TG/DTG, DSC e FT-IR. Essas misturas mecânicas foram preparadas pela mistura direta de Fluoxetina ou Imipramina com a β -

ciclodextrina nas mesmas razões molares dos compostos de inclusão, 1:1 e 2:1 β CD/molécula hóspede.

2.3.2 – Análise Térmica:

TG/DTG e DSC

Os experimentos de análise termogravimétrica (TG) foram conduzidos com a utilização de cadinhos de alumina sob atmosfera de N₂ com um fluxo constante de 50 mL/min. Na Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram utilizados cadinho de alumínio, também sob um fluxo de N₂ constante de 50 mL/min. Para as duas técnicas de análise térmica empregadas foi utilizada uma taxa de aquecimento, em cada experimento, de 10 °C por minuto. Foram avaliados pelas técnicas de análise térmica descritas acima os complexos de inclusão (1:1 e 2:1 β CD/FLU; 1:1 e 2:1 β CD/IMI), suas respectivas misturas mecânicas e ainda os compostos livres (β CD, FLU e IMI).

2.3.3 – Espectroscopia de Absorção (FT-IR) e Reflectância Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) na Região do Infravermelho:

FT-IR

Os espectros dos complexos de inclusão, misturas mecânicas e compostos livres foram obtidos pelo espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum GX, em pastilhas de KBr com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 32 scans por amostra. Todos os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região entre 4000 – 400 cm⁻¹. Os dados foram convertidos pelo próprio programa do espectrofotômetro (Spectrum) à arquivos do tipo ASC II e tratados posteriormente pelo programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

FTIR-HATR

Os espectros de FTIR-HATR foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer, Spectrum GX, com o auxílio do acessório para reflectância atenuada horizontal. Foi utilizada uma cela de Seleneto de Zinco (ZnSe), com o equipamento operando com 4 cm^{-1} de resolução e 128 scans. Os espectros foram obtidos na região entre $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$ embora devido a limitações, para as regiões onde são observadas as bandas da água, somente a região entre 1600 a 800 cm^{-1} foi utilizada. Essa limitação ocorre uma vez que as bandas da água são muito mais intensas do que aquelas observadas para as deformações e estiramentos das moléculas (β CD, IMI e FLU).

Para avaliar as alterações nos modos vibracionais dos compostos de inclusão, foi feita uma titulação de β CD com fármaco (FLU ou IMI). Desta forma foi possível identificar as modificações nos modos vibracionais a diferentes razões molares do sistema β CD/fármaco. Com o objetivo de comprovar as alterações observadas para os sistemas supramoleculares estudados em solução por FTIR-HATR, titulações de solução aquosa do fármaco (FLU ou IMI) em água e de água em solução de β CD foram realizadas como branco dos experimentos de titulação.

Para o sistema β CD/FLU a concentração da FLU variou de $2,7\text{ mM}$ a $15,0\text{ mM}$ e para a solução de β CD sua concentração variou de $12,0\text{ mM}$ a $6,0\text{ mM}$, durante o processo de titulação. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, a uma temperatura de $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ e o porta amostra foi purgado com N_2 antes de cada titulação para que o efeito da umidade do ar fosse removido. Para o sistema β CD/IMI foram utilizadas as mesmas condições de análise empregadas para o sistema β CD/FLU, assim como as mesmas

concentrações das soluções. Todos os espectros obtidos foram subtraídos do espectro da água, com a finalidade de observar somente os modos vibracionais das moléculas estudadas em solução.

De modo a validar a técnica de FTIR-HATR para a caracterização deste tipo de sistema supramolecular, o sistema formado pelo fármaco Cloridrato de Tetraciclina e β -ciclodextrina também foi testado através dessa metodologia [8].

Com o intuito de determinar a estequiometria dos sistemas supramoleculares formados entre a β CD e a FLU ou IMI, experimentos de Job foram conduzidos através da técnica de FTIR-HATR em solução aquosa, na qual a concentração inicial dos componentes β CD, FLU e IMI foi de 10,0 mM. Para este experimento foram realizadas titulações onde a concentração de cada um dos componentes do sistema (β CD/FLU ou β CD/IMI) variou em 0,5 mM, a cada ponto da titulação, até 9,5 mM. Entretanto a concentração final da solução foi mantida em 10,0 mM, conforme esquematizado na Figura 2.4. Todas as titulações foram realizadas em triplicata a temperatura de 25 ± 1 °C.

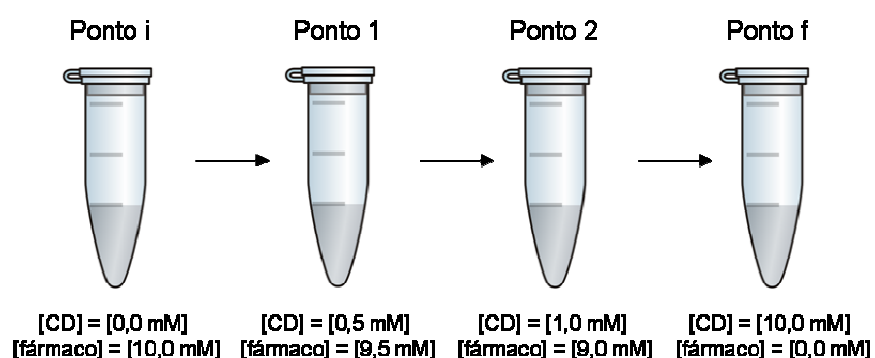


Figura 2.4: Representação esquemática das soluções utilizadas no experimento de Job.

2.3.4 – Ressonância Magnética Nuclear:

RMN

Os compostos de inclusão preparados pelo método de liofilização a diferentes razões molares: 0,5:1; 0,75:1; 1:1; 1,25:1; 1,5:1 e 2:1 β CD/fármaco antidepressivo foram dissolvidos em D_2O e utilizados para verificar o processo de inclusão usando os deslocamentos químicos de hidrogênio (1H), tempo de relaxação longitudinal (T_1) e através do Efeito Nuclear Overhauser, através do experimento de NOESY por Ressonância Magnética Nuclear. Para a caracterização estrutural e determinação da pureza dos fármacos livres e da β CD outros experimentos, unidimensionais e bidimensionais, foram realizados como: ^{13}C , ^{13}C -DEPT 135, COSY $^1H/^1H$, HSQC $^1H/^13C$ -DEPT-135 e HMBC $^1H/^13C$.

Os espectros de RMN foram obtidos a 27,0 °C em equipamento Bruker DRX 400 – AVANCE operando a 400 MHz, em tubos de quartzo de 5 mm. Os experimentos de 1H foram adquiridos com a técnica de supressão de água residual (WATERGATE). Os dados de NOESY e T_1 foram adquiridos através de experimentos padrões da biblioteca do espectrômetro com um tempo de mistura de 500 ms. Em todos os experimentos de RMN, o deslocamento químico da água foi utilizado como referência, com um valor de $\delta = 4,70$.

2.3.5 – Calorimetria Isotérmica de Titulação:

ITC

As titulações calorimétricas, da β CD com os antidepressivos (Fluoxetina e Imipramina) foram realizadas em duplicata no Microcalorímetro, da Microcal, a 25 °C. Cada titulação consiste de 51 injeções sucessivas com intervalos de

300 s entre cada ponto. O primeiro ponto da titulação, 1 μL , foi descartado com o objetivo de eliminar efeitos de diluição do titulante na cela calorimétrica, logo as 50 adições subsequentes de 5 μL e com um tempo de 2 s de injeção, foram utilizadas para construir a curva de titulação.

Para a titulação da Fluoxetina foi utilizada uma solução aquosa de 17,5 mM com um volume de 1,5 mL e a β -ciclodextrina, uma solução aquosa de 1 mM foi empregada como titulante. A concentração da βCD na cela calorimétrica variou de 1 para 0,86 mM e a concentração da FLU variou de 0,0 para 2,9 mM, durante o processo de titulação.

Para o sistema $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ a concentração de IMI utilizada foi de 10 mM com o volume, também de 1,5 mL e para a βCD , sua concentração utilizada foi de 0,5 mM. Durante o processo de titulação a concentração dos componentes variaram de 0,0 a 1,7 mM e de 1,0 a 0,44 mM para a Imipramina e para a β -ciclodextrina, respectivamente.

Para os dois processos de complexação estudados os dados obtidos foram tratados pelo *software* do próprio calorímetro (Microcal Oring 5.0 para ITC) e das curvas obtidas, para cada uma das titulações, foram subtraídas de suas respectivas curvas de diluição em água dos fármacos, que foram realizadas como branco do processo [9-11].

2.4 – Referências:

1. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
2. Saenger, W., *Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1980. **19**(5): p. 344-362.
3. Sigma-Aldrich, I., *Sigma-Aldrich Catalogue Products*. 2007.
4. Silva, M.A.S., et al., *Thermoanalytical Study of Fluoxetine Hydrochloride*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007. **87**(5): p. 463-467.
5. Abu-Eittah, R.H. and L.T. Kamel, *Kinetics and Thermodynamic Parameters of the Thermal Decomposition of Imipramine Hydrochloride and Trimipramine Maleate*. International Journal of Chemical Kinetics, 2002. **35**(4): p. 166 - 179.
6. Hedges, A.R., *Industrial Applications of Cyclodextrins*. Chemical Review, 1998. **98**(5): p. 2035-2044.
7. Denadai, Â.M.L., et al., *A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity*. Biodrugs, 2006. **20**(5): p. 283-291.
8. De Sousa, F.B., et al., *Study of inclusion compound in solution involving Tetracycline and β -cyclodextrin by FTIR-ATR*. Vibrational Spectroscopy. 2008. **46**(1): p. 57-62.
9. Denadai, Â.M.L., et al., *Self-assembly Characterization of the β -Cyclodextrin and Hydrochlorothiazide System: NMR, Phase Solubility,*

- ITC and QELS. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2006. **55**(1-2): p. 41-49.
10. Denadai, A.M.L., et al., *Novel pharmaceutical composition of bradykinin potentiating penta peptide with [beta]-cyclodextrin: Physical-chemical characterization and anti-hypertensive evaluation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. **336**(1): p. 90-98.
11. Lula, I.S., et al., *Study of Angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence specific NMR assignments and structural studies*. *Peptides* 2007. **28**(11): p. 2199-2210.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão:

Sistema β -ciclodextrina/fluoxetina

3 – Caracterização do Sistema β -ciclodextrina/fluoxetina:

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a caracterização dos compostos de inclusão formados pela interação entre a β CD e a FLU, a diferentes razões molares, e ainda a caracterização físico-química dos compostos livres através das metodologias descritas no capítulo 2. Foram utilizadas técnicas de análise térmica (TG/DTG e DSC), espectroscópicas (FT-IR, FTIR-HATR e RMN) e ainda microcalorimetria (ITC).

3.1 – Análise térmica:

TG/DTG e DSC

A Figura 3.1 apresenta a curva termogravimétrica para a β CD. De forma geral seu perfil termoanalítico pode se dividir em três regiões: a 1ª referente à perda de água, tanto das moléculas presentes no interior da cavidade quanto às moléculas localizadas entre as moléculas de CD, em aproximadamente 80 a 130 °C; a 2ª referente a um patamar de estabilidade térmica entre 140 a 290 °C; e a 3ª região que se refere à sua termodecomposição, a partir de aproximadamente 300 °C [1]. Analisando a curva DSC para a β CD, Figura 3.2, é possível observar tanto os eventos relacionados à perda das moléculas de água, a aproximadamente 65 °C, quanto a sua termodegradação a 320 °C. Alguns autores relatam a presença de transições de fase entre 210 – 240 °C, mas nem sempre estes fenômenos são observados, dependendo da condição que se realiza o experimento, e não há um consenso sobre a natureza destas transições [1].

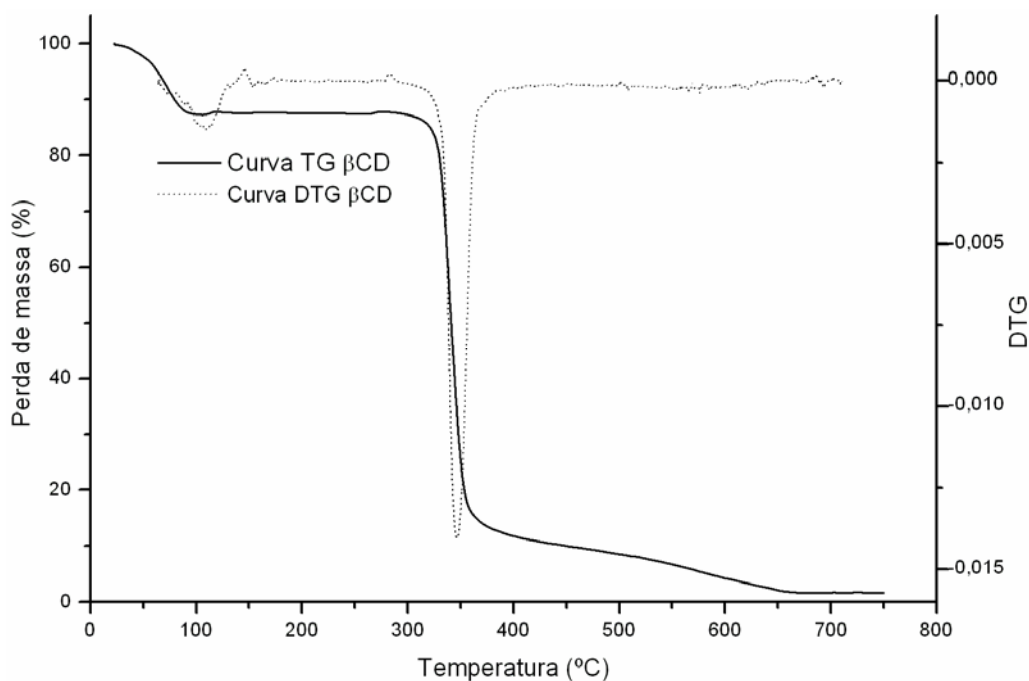


Figura 3.1: Curvas TG/DTG para a β -ciclodextrina, em atmosfera de N_2 .

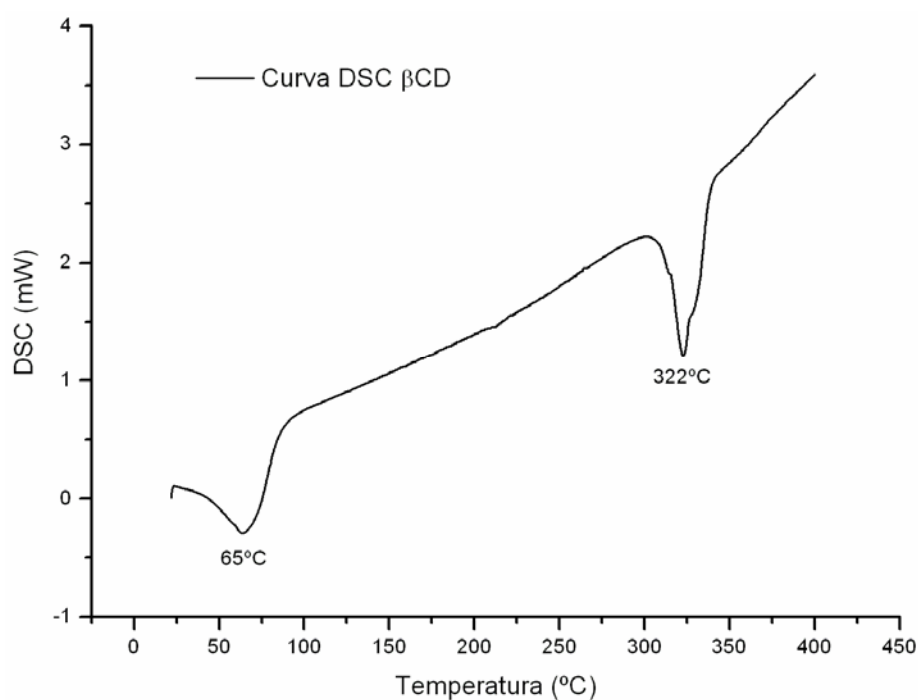


Figura 3.2: Curva DSC para a β -ciclodextrina, em atmosfera de N_2 .

Para a Fluoxetina a curva termogravimétrica (TG) está apresentada na Figura 3.3, juntamente com a derivada (DTG). Na curva TG para a FLU, nenhuma perda de massa é observada até, aproximadamente 190 °C, mas a

partir desta temperatura a Fluoxetina começa seu processo de decomposição. Outra perda de massa pode ser observada para temperaturas mais altas do que 520 °C, levando à degradação completa da amostra. Os eventos relacionados à fusão deste fármaco, a uma temperatura de 157 °C podem ser observados em sua curva DSC, Figura 3.4. Este valor de fusão está de acordo com o valor relatado na literatura para este antidepressivo, comprovando assim a pureza da amostra [2]. A curva DSC para a FLU indica um perfil tipicamente de uma substância pura e cristalina, uma vez que somente um evento endotérmico, bem definido, é observado [2]. Um evento exotérmico é observado à temperatura de 241 °C referente à sua termodecomposição [2].

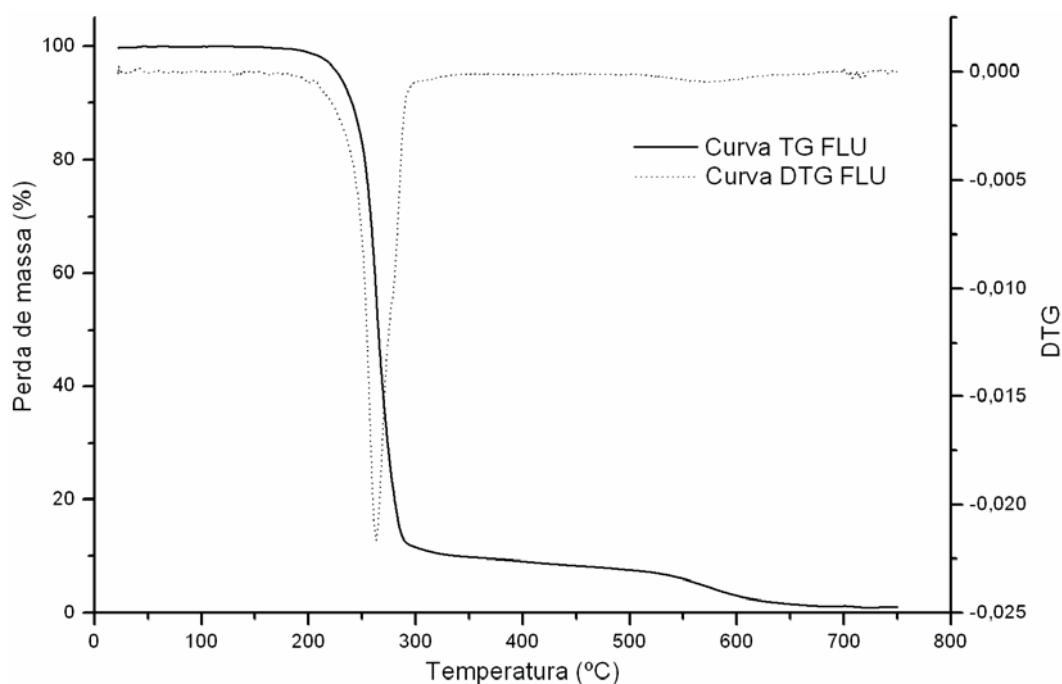


Figura 3.3: Curvas TG/DTG para a Fluoxetina, em atmosfera de N₂.

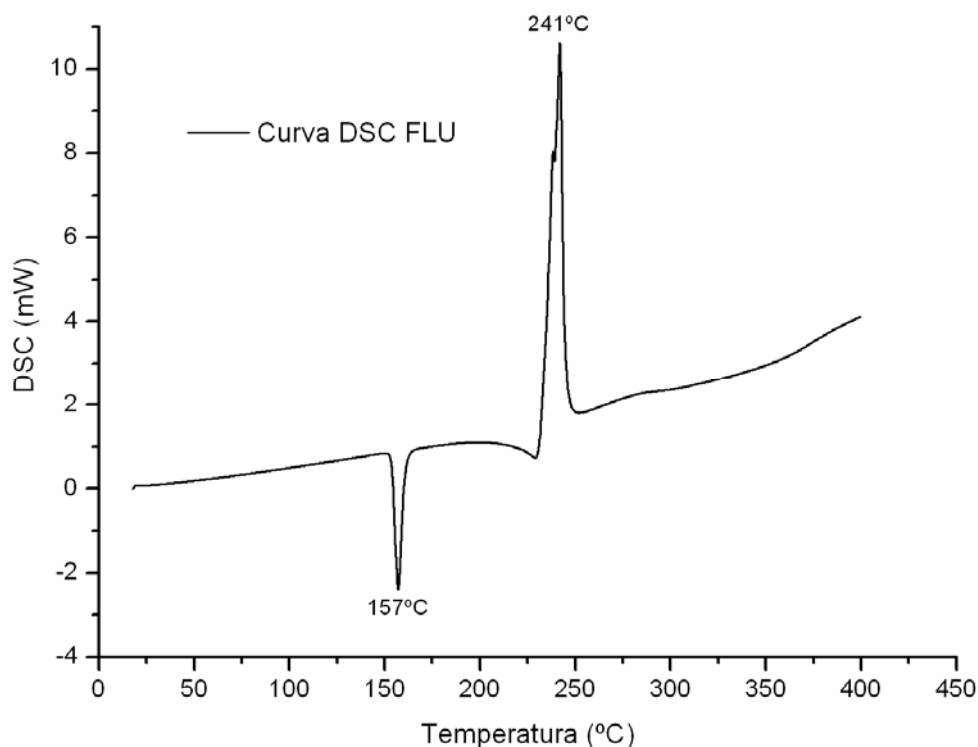


Figura 3.4: Curva DSC para a Fluoxetina, em atmosfera de N₂.

De modo a avaliar o processo de formação do complexo de inclusão entre a β CD e a Fluoxetina, foram feitas as análises termogravimétricas para os compostos de inclusão, na razão de 1:1 e 2:1 β CD/FLU e ainda para as respectivas misturas mecânicas.

Na Figura 3.5 estão apresentadas às curvas TG para os compostos livres (β CD e FLU) seu complexo na razão 1:1 e ainda sua respectiva mistura mecânica. Pode ser verificado através da comparação das curvas TG, que o complexo β CD/FLU apresenta uma maior estabilidade térmica do que os compostos livres a uma temperatura superior a 260 °C. A esta temperatura a Fluoxetina já sofreu uma perda de massa de aproximadamente 90 % e a mistura mecânica do, β CD/FLU, cerca de 70 %; entretanto para o complexo

β CD/FLU, somente uma perda de massa de 50 % é observada, indicando assim a interação entre as espécies no estado sólido.

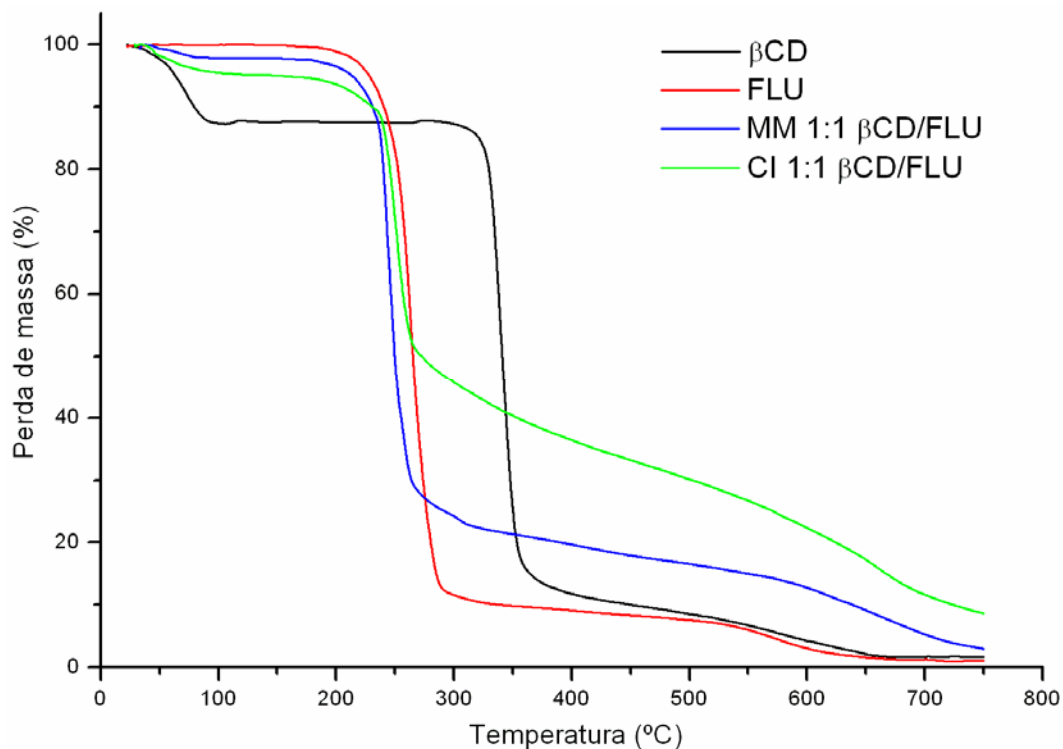


Figura 3.5: Curvas TG para β CD, FLU, mistura mecânica 1:1 β CD/FLU e composto de inclusão 1:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 .

Através da comparação entre a curva DSC do composto 1:1 β CD/FLU com os compostos livres, Figura 3.6, fica clara a ausência dos eventos, já descritos acima, relacionados à β CD e a FLU na curva DSC do complexo, principalmente o ponto de fusão característico do fármaco, a 157 °C. De modo a verificar a eficácia do processo de liofilização no preparo do complexo de inclusão as curvas DSC do CI e da mistura mecânica foram comparadas e pode-se observar que as duas não são semelhantes e ainda que para a curva DSC da mistura mecânica é observado o evento relacionado à fusão da

Fluoxetina, a 157 °C. Estas evidências experimentais auxiliam a afirmar que as espécies são capazes de interagir no estado sólido.

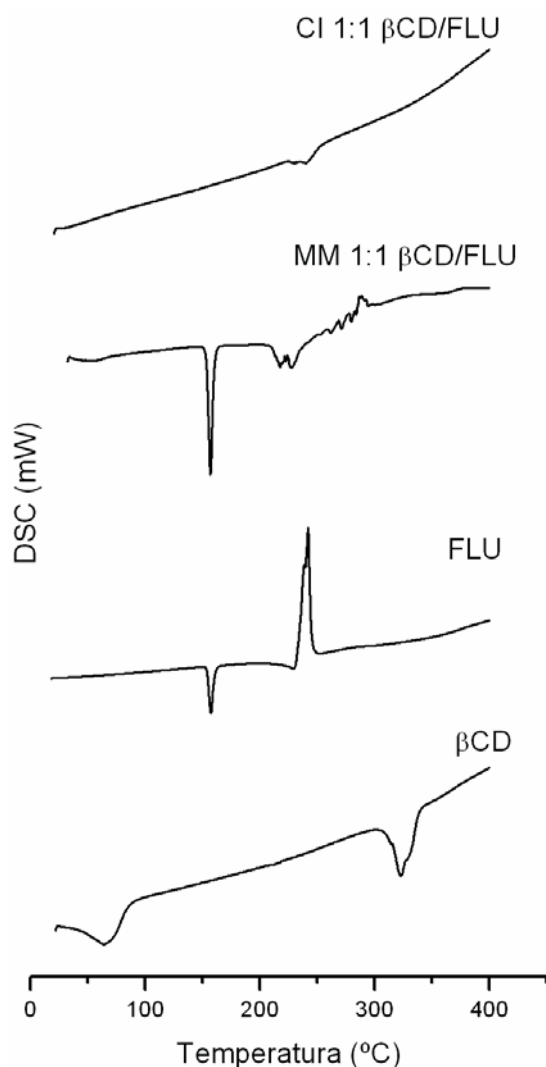


Figura 3.6: Curvas DSC para β CD, FLU, mistura mecânica 1:1 β CD/FLU e composto de inclusão 1:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 .

Para que pudesse ser avaliada a interação entre as espécies quando a razão molar de β -ciclodextrina é duas vezes maior que a de Fluoxetina, compostos na razão de 2:1 β CD/FLU foram preparados. A seguir, na Figura 3.7, estão apresentadas as curvas TG para este complexo e sua mistura

mecânica, nesta mesma razão molar. Da mesma forma que observado no complexo 1:1, o composto de razão molar 2:1, possui uma maior estabilidade térmica, quando comparado com os compostos livres e também com sua respectiva mistura mecânica. É possível também verificar que a curva para o complexo não é somente uma sobreposição das curvas TG dos compostos livres evidenciando a interação entre as espécies.

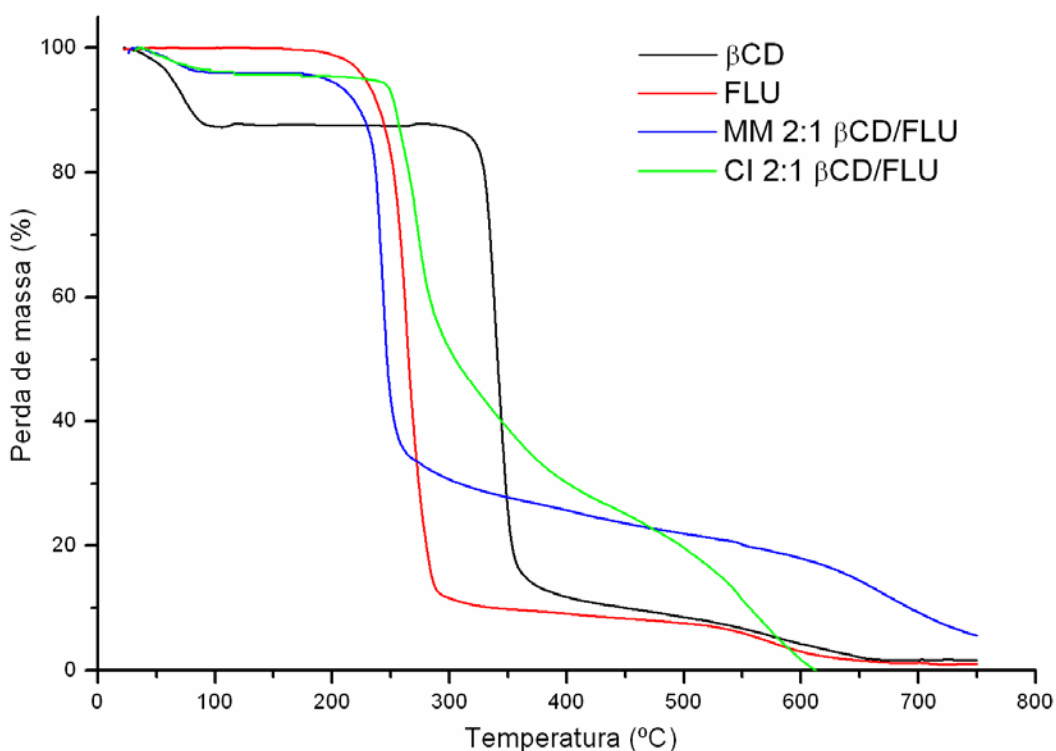


Figura 3.7: Curvas TG para β CD, FLU, mistura mecânica 2:1 β CD/FLU e composto de inclusão 2:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 .

Na Figura 3.8 estão apresentadas às curvas DSC para o sistema supramolecular 2:1 β CD/FLU. Mais uma vez fica claro que o perfil da curva DSC para o complexo não é simplesmente a sobreposição das curvas dos compostos livres, indicando a interação entre estas moléculas no estado sólido. Para a mistura mecânica ainda é observado o evento referente à fusão do

fármaco, em 157 °C, embora outra transição de fase seja observada em 215 °C, que não se refere aos compostos livres. Este fenômeno indica que a interação entre as espécies é forte, mas que o processo de preparação do complexo, pelo método de liofilização tem influência no perfil da curva DSC e sobre a forma com que as espécies interagem.

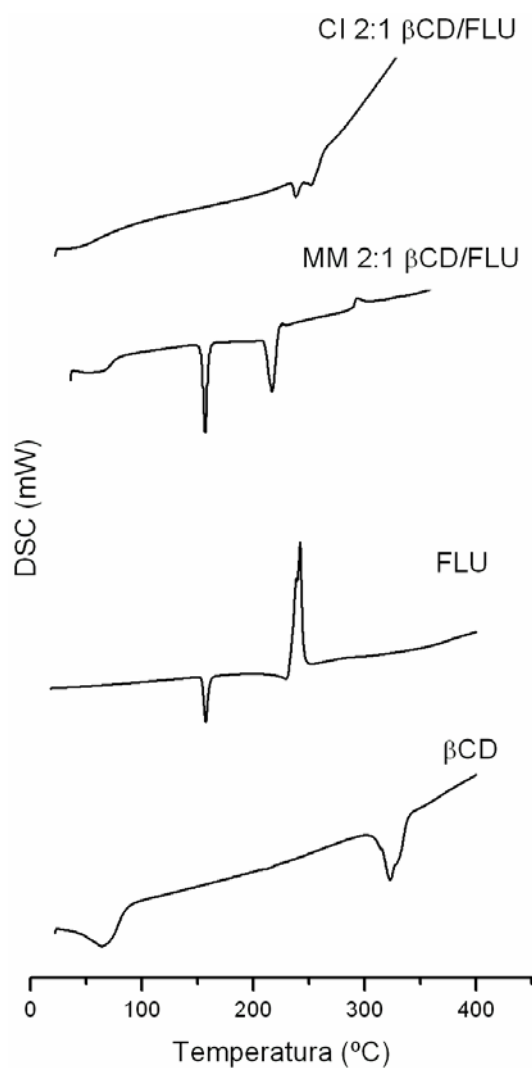


Figura 3.8: Curvas DSC para β CD, FLU, mistura mecânica 2:1 β CD/FLU e composto de inclusão 2:1 β CD/FLU, em atmosfera de N_2 .

3.2 – Espectroscopia de Absorção (FT-IR) e Reflectância Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) na Região do Infravermelho:

FT-IR

Através da análise do espectro de absorção na região do infravermelho para a β -ciclodextrina os seguintes modos vibracionais são atribuídos segundo a Figura 3.9: 3400 cm^{-1} banda referente ao estiramento (OH), em 2930 cm^{-1} estiramento (C-H), na região entre 1400 a 1250 cm^{-1} são observados alguns modos referentes às deformações (C-H) e um dos mais característicos, se não o mais, entre 1070 a 1030 cm^{-1} o estiramento (C-O-C), referente à ligação α (1-4) glicosídica [3, 4].

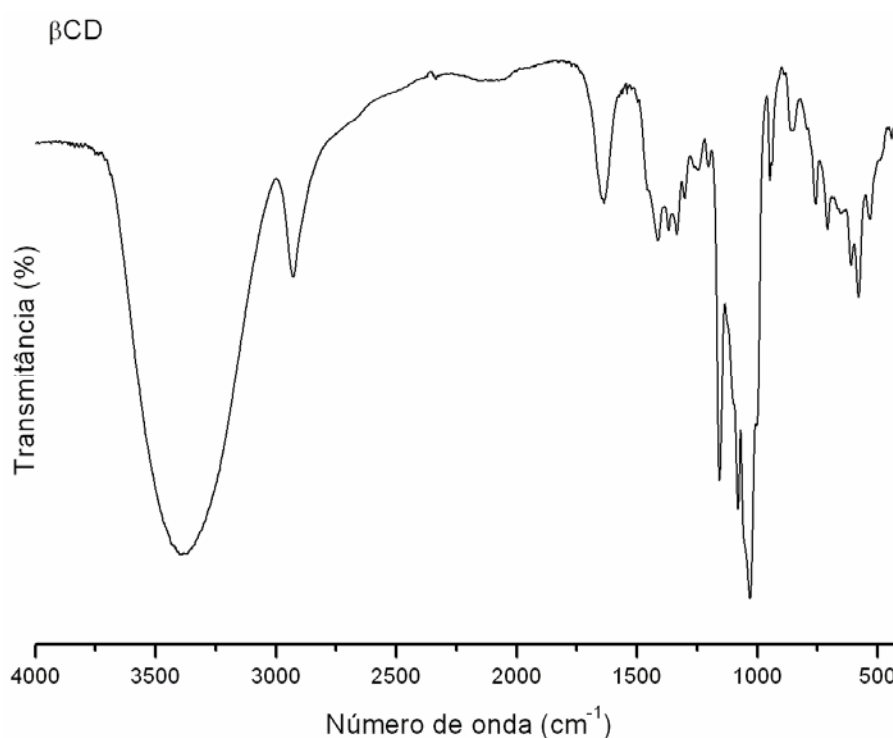


Figura 3.9: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β -ciclodextrina, em KBr na região entre 4000 – 400 cm^{-1} .

Para a molécula da Fluoxetina, em seu espectro de absorção na região do infravermelho, Figura 3.10, alguns modos característicos podem ser destacados e estão relacionados na Tabela 3.1. É importante mencionar que através do perfil dos modos vibracionais de baixa frequência da Fluoxetina, observados em seu espectro de infravermelho, pode-se dizer que esta possui uma característica de substância cristalina uma vez que essas bandas, na região de $650 - 450 \text{ cm}^{-1}$, são bem definidas.

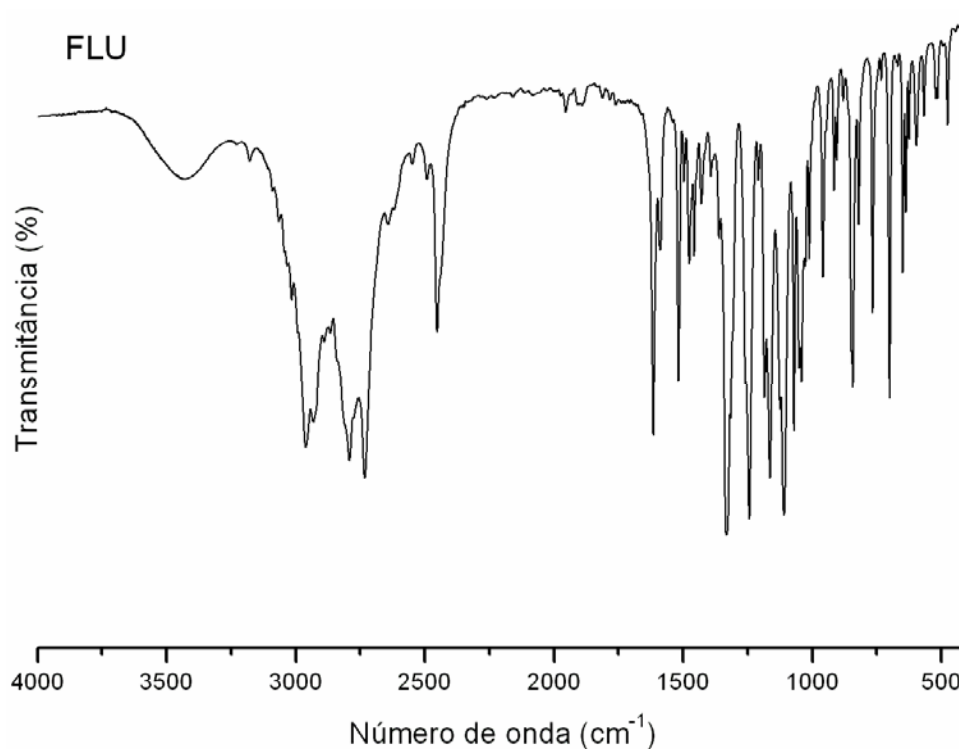


Figura 3.10: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Fluoxetina, em KBr na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 3.1: Relação de alguns modos vibracionais referentes à molécula de Fluoxetina, atribuídos através de seu espectro de absorção na região do infravermelho:

| Região (cm^{-1}) | Possível Atribuição |
|-----------------------------|--|
| 3435 | ν (N-H) |
| 2960 | ν (C-H) sim* e assim**. |
| 2452 | ν ($\text{R}_2\text{N}^+\text{H}_2$) |
| 1615 e 1588 | Sais de amônio |
| 1517 – 1456 | Vibrações (C=C) |
| 1332 e 1242 | ν (C-F) |
| 1109 | ν (C-O-C) |
| 1041 | ν (C-N) |

**sim. simétrico*

***assim. assimétrico*

Uma vez caracterizados os modos vibracionais mais importantes de cada uma das moléculas livres, uma comparação entre estes e os modos vibracionais referentes ao complexo β CD/FLU pode auxiliar a determinar a forma com que estas moléculas interagem e então inferir sobre a geometria do complexo no estado sólido. Desta forma, quando comparado o complexo, na razão 1:1, com as moléculas livres fica evidente, através da Figura 3.11, uma redução no número de modos que o CI apresenta quando comparado com a FLU livre, indicando uma menor mobilidade da molécula, o que sugere que a Fluoxetina está interagindo com a β CD de forma efetiva. As principais mudanças, nos modos vibracionais da FLU, atribuídas a esta interação com a β CD estão relacionadas às vibrações (C=C) dos anéis aromáticos, entre 1517 a

1456 cm^{-1} e às deformações (C-F) em 1332 e 1242 cm^{-1} que sofreram uma drástica redução em sua intensidade e ainda, alguns modos na região inferior a 900 cm^{-1} referentes a deformações dos anéis aromáticos mono e dissustituídos. A região entre 3100 a 2530 cm^{-1} referente à molécula da Fluoxetina também teve seu perfil significativamente modificado quando comparado com o complexo. A esta região estão relacionados os estiramentos (C-H) simétrico e assimétrico e ainda estiramentos (N-H) de aminas protonadas. Estas alterações nos modos vibracionais da FLU, correspondentes a mais de uma região da molécula, sugerem a possibilidade de que a ciclodextrina esteja interagindo com mais de um sítio da FLU.

Além destas alterações nos modos vibracionais referentes à FLU, um afilamento da região do estiramento (OH) em 3400 cm^{-1} e da região de estiramento (C-O-C) em 1070 cm^{-1} da β CD foram observados para o composto de inclusão. Estes afilamentos estão relacionados com a redução no número de ligações de hidrogênio após a inclusão da molécula hóspede e conseqüente saída das moléculas de água da cavidade da ciclodextrina [4, 5].

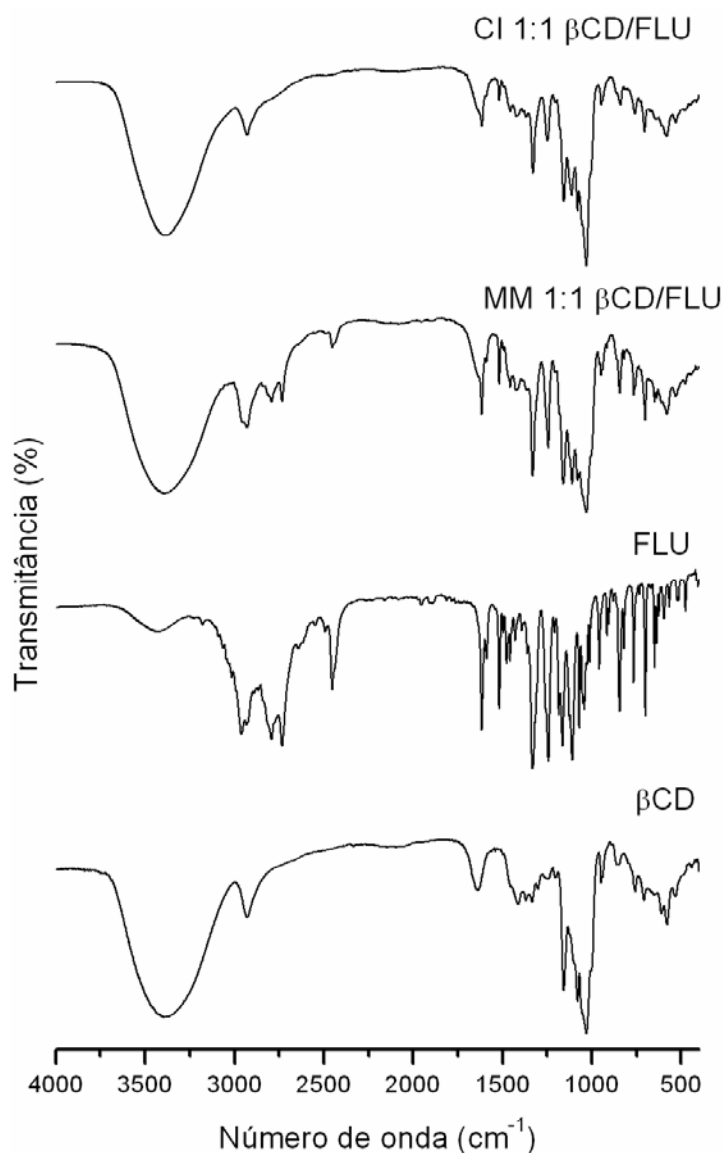


Figura 3.11: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β CD, FLU, mistura mecânica 1:1 β CD/FLU e composto de inclusão 1:1 β CD/FLU, em KBr na região entre 4000 – 400 cm^{-1} .

O espectro na região do infravermelho para o complexo de razão molar 2:1 β CD/FLU, Figura 3.12, apresenta da mesma forma que o complexo 1:1, uma redução no número de bandas referentes à molécula de FLU, que está relacionada com a redução na mobilidade desta última indicando sua interação efetiva com a β CD. Quando o espectro do complexo é comparado com os

espectros dos compostos livres, pode-se observar a supressão das bandas da FLU entre 3130 a 2340 cm^{-1} , referentes aos modos de estiramentos (C-H) simétrico e assimétrico e estiramentos referentes à (N-H) de aminas protonadas. Outras bandas da FLU que sofreram uma alteração em seu perfil foram: deformação de sais de amônio (1615 e 1588 cm^{-1}), vibrações referentes aos modos dos anéis aromáticos entre (1517 – 1456 cm^{-1}), os estiramentos C-F em 1332 e 1242 cm^{-1} e ainda diversos modos de baixa frequência. Mais uma vez estas mudanças, em diferentes modos da FLU quando complexada com β CD, indicam a interação de mais de uma região da molécula hóspede com a ciclodextrina. O fato do perfil do espectro de infravermelho das misturas mecânicas se assemelhar com o perfil dos espectros dos complexos de inclusão pode ser explicado pelo modo de preparação das pastilhas de KBr, que pode forçar a interação entre as moléculas hóspede-hospedeira.

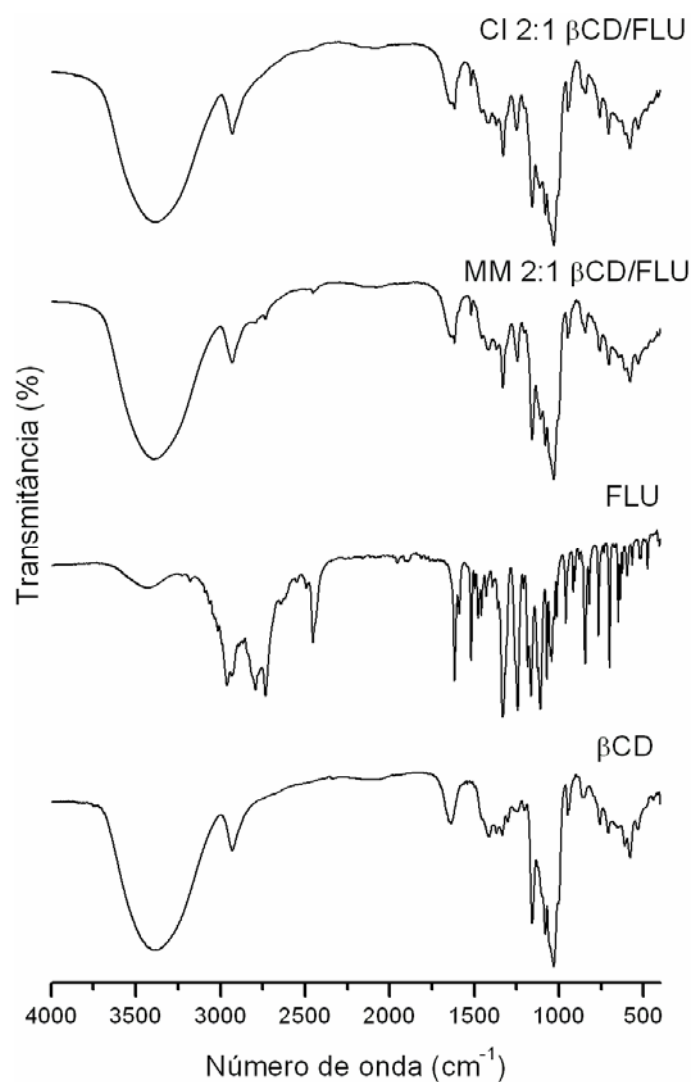


Figura 3.12: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β CD, FLU, mistura mecânica 2:1 β CD/FLU e composto de inclusão 2:1 β CD/FLU, em KBr na região entre 4000 – 400 cm⁻¹.

FTIR-HATR

Uma vez que o processo de preparação das pastilhas de KBr pode forçar a formação do composto de inclusão no estado sólido, a técnica de FTIR-HATR em solução aquosa foi utilizada para caracterizar estes complexos. Esta técnica de FTIR-HATR em solução aquosa, não havia sido utilizada e,

portanto não existiam registros na literatura, até então, para a caracterização de sistemas supramoleculares com ciclodextrinas através desta metodologia [6, 7].

A Figura 3.13, apresenta o espectro na região do infravermelho por reflectância atenuada total horizontal para a β CD a diferentes concentrações, após a subtração do espectro da água pura, utilizado como referência. Foram utilizadas diversas concentrações de β CD com a finalidade de verificar possíveis mudanças nas bandas da ciclodextrina devido ao efeito da diluição de mesma, entretanto esse fato não foi verificado. Embora exista uma limitação técnica na região onde são observados os sinais da água, já mencionada no Capítulo 2, esse fato não impediu a atribuição das bandas da β CD. Logo, para atribuir as bandas da β CD a região entre 1600 a 800 cm^{-1} foi utilizada, ficando evidentes os modos vibracionais referentes aos estiramentos (C-H) em 1156 e 1084 cm^{-1} e o estiramento (C-O-C) em 1030 cm^{-1} . Estas bandas estão de acordo com àquelas observadas para a β CD no estado sólido em pastilhas de KBr [3].

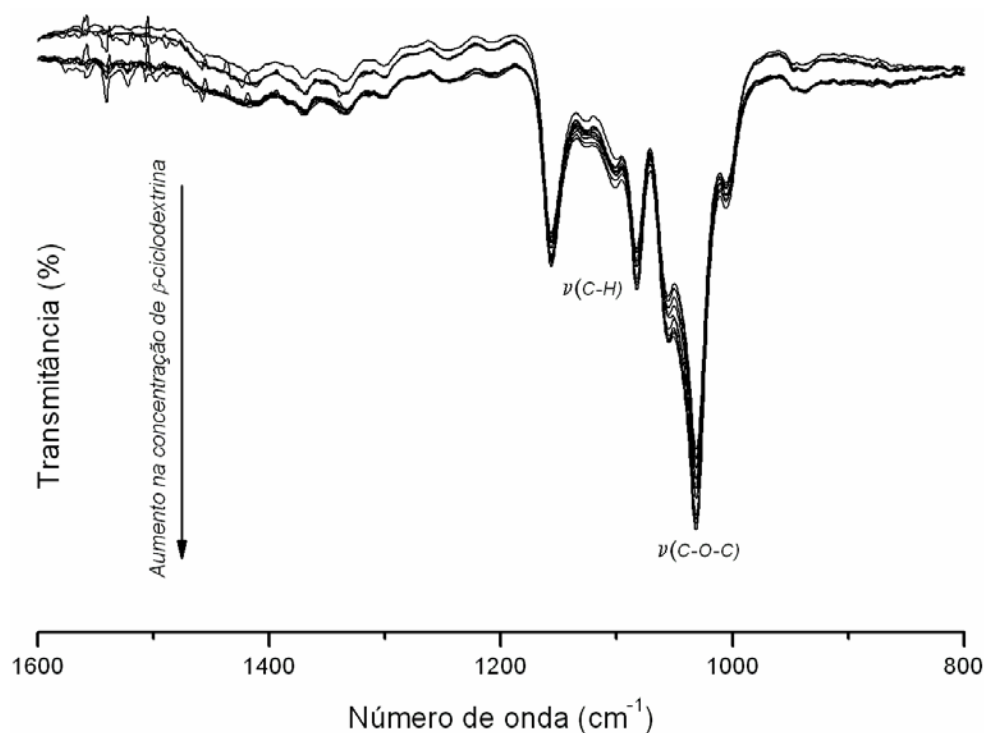


Figura 3.13: Espectro de FTIR-HATR para a β CD em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm^{-1} , após subtração do espectro da água.

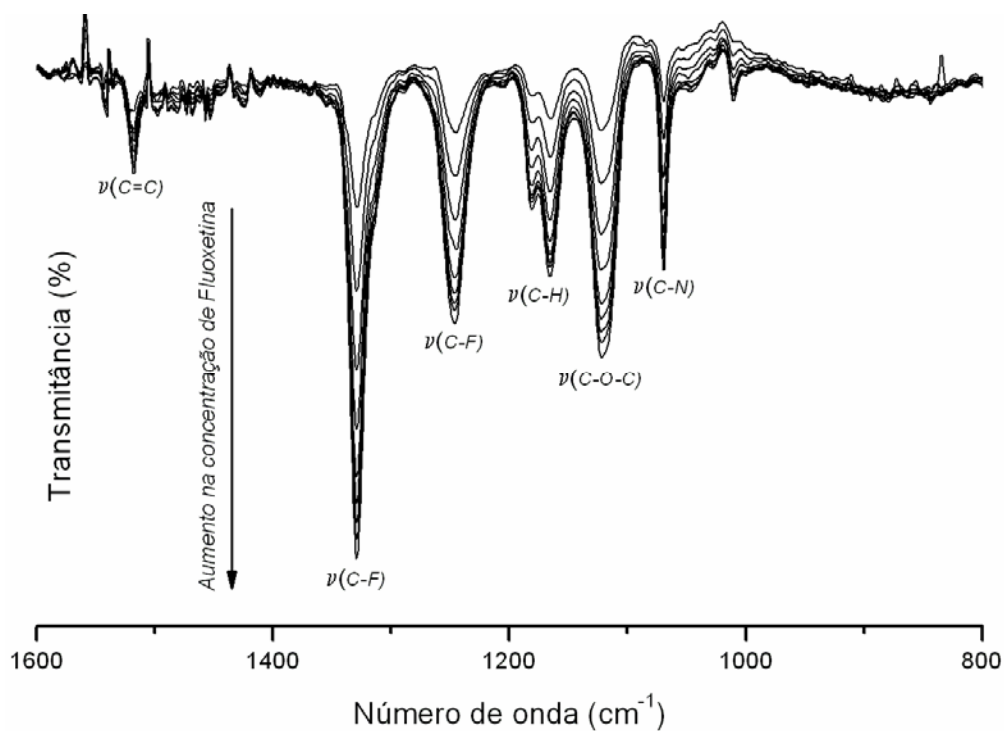


Figura 3.14: Espectro de FTIR-HATR para a FLU em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm^{-1} , após subtração do espectro da água.

Para a FLU a mesma região do espectro da FTIR-HATR foi avaliada também a diferentes concentrações e está apresentada na Figura 3.14. Do mesmo modo que ocorreu nos espectros de FTIR-HATR para a β CD, a FLU também não sofreu nenhuma modificação em seus modos vibracionais durante o processo de diluição e as bandas observadas por FTIR-HATR, na região entre 1600 a 800 cm^{-1} estão de acordo com aquelas observadas e atribuídas no estado sólido.

Desta maneira, os compostos de inclusão a diferentes concentrações foram preparados de modo a ser possível a comparação de seus espectros com os espectros dos compostos livres. Estes espectros estão apresentados na Figura 3.15.

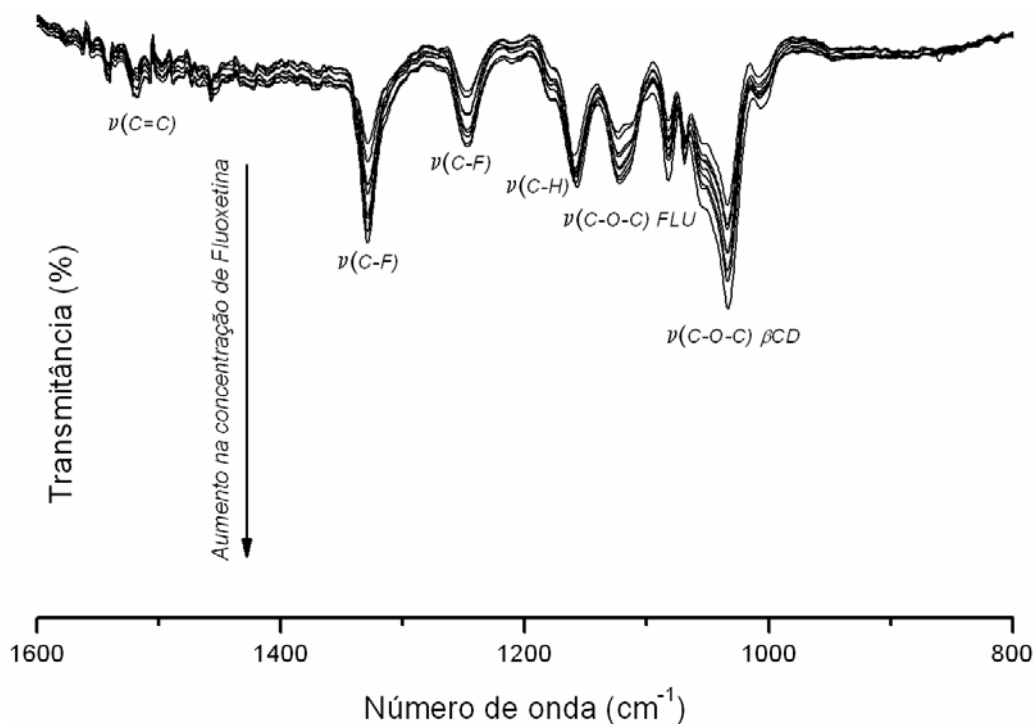


Figura 3.15: Espectro de FTIR-HATR para o composto de inclusão entre a β CD e a FLU em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm^{-1} , após subtração do espectro da água.

De modo a facilitar a comparação entre os três espectros, β CD, FLU e seu composto de inclusão a Figura 3.16 foi registrada, onde a concentração da β CD é igual a 8,0 mM, da FLU 11,6 mM e seu respectivo composto de inclusão, no qual a concentração da β CD é 8,0 mM e da FLU 11,6 mM. A comparação entre as intensidades dos modos vibracionais, feita entre os espectros de reflectância atenuada para os compostos livres e o complexo de inclusão, só pode ser realizada uma vez que esta técnica espectroscópica de FTIR-HATR é quantitativa.

Ao comparar o espectro da FLU com seu CI pode ser observada uma redução na intensidade dos modos referentes aos estiramentos (C=C) em aproximadamente 1500 cm^{-1} , (C-F) em 1329 e 1245 cm^{-1} e (C-O-C) em 1120 cm^{-1} , indicando uma interação entre a β CD e a FLU através dos anéis aromáticos da molécula hóspede. Além disso, uma redução na intensidade do estiramento (C-O-C) da β CD em 1030 cm^{-1} foi observada. Esta redução na intensidade está relacionada com a redução no número de ligações de hidrogênio após a saída das moléculas de água da cavidade e a inclusão da molécula da Fluoxetina, do mesmo modo que no estado sólido. Uma vez que este sistema β CD/FLU se encontra em equilíbrio em solução e as principais mudanças nos modos vibracionais observados por FTIR-HATR foram para os modos dos anéis aromáticos e também para o grupo CF_3 , sugere-se uma interação preferencial da β CD por este anel aromático dissubstituído. É importante lembrar que estas alterações nestes modos também foram observadas no estado sólido por FT-IR e que em solução um equilíbrio entre mais de uma espécie de complexo de inclusão pode existir de forma simultânea [8]. Logo, não pode ser descartada a possibilidade da formação do

complexo supramolecular através da inclusão do anel aromático monosubstituído.

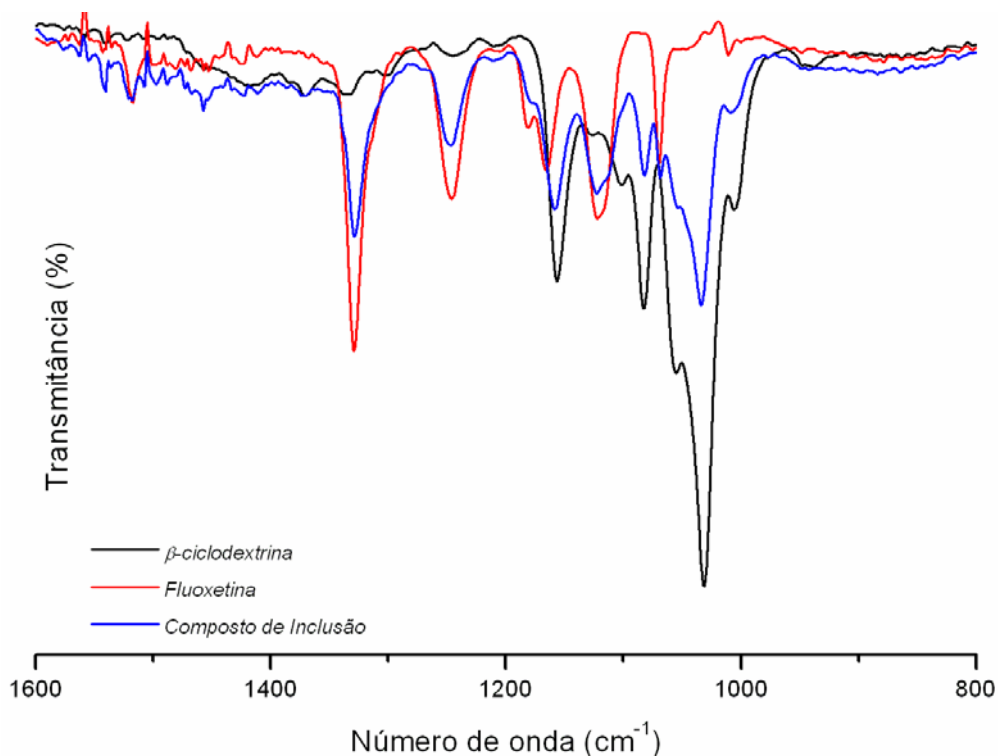


Figura 3.16: Espectro de FTIR-HATR para a β CD (8,0 mM), FLU (11,6 mM) e o respectivo composto de inclusão em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm⁻¹, após subtração do espectro da água.

Outra utilização da técnica de FTIR-HATR foi para o experimento de titulação pelo método de variação contínua da concentração dos componentes, molécula hóspede e hospedeira, mas mantendo constante a soma total das concentrações no sistema. Este experimento é conhecido também como método de Job e possibilita, através da monitoração de algum parâmetro físico ou químico do sistema, determinar a estequiometria do complexo formado a partir de uma curva de variação da propriedade monitorada por fração molar do sistema [9-12].

Para o sistema β CD/FLU o parâmetro utilizado como sonda foi a variação na intensidade da banda de estiramento (C-O-C) em aproximadamente 1030 cm^{-1} referente à ligação α (1-4) glicosídica da β -ciclodextrina, uma vez que essa metodologia de espectroscopia por FTIR-HATR permite análises quantitativas em solução. Para este sistema β CD/FLU a curva de titulação é apresentada na Figura 3.17.

A concentração inicial das soluções aquosas de β CD e FLU foi de 10,0 mM. Durante o processo de titulação a concentração de cada um dos componentes variou de 0,5 mM a 9,5 mM (com incrementos de 0,5 mM), entretanto a soma da concentração final dos componentes se manteve constante e equivalente a 10,0 mM.

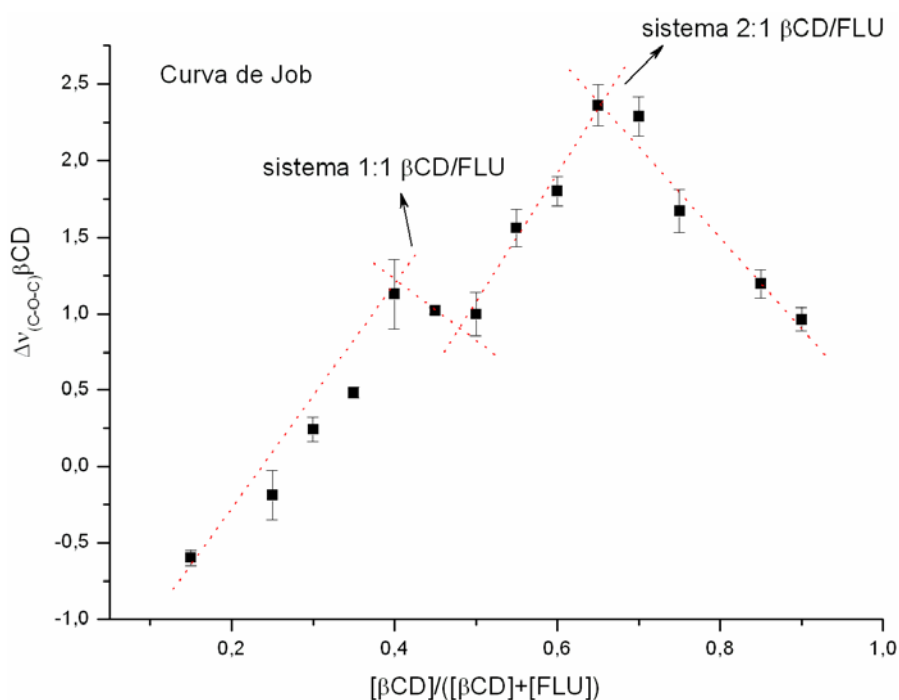


Figura 3.17: Curva de Job correspondente à variação de intensidade referente ao $\nu_{(C-O-C)}$ da β CD por FTIR-HATR para o sistema β CD/FLU.

Através da análise da curva obtida para o sistema β CD/FLU pode ser observado a existência de dois regimes distintos, um referente à região de sistemas do tipo 1:1 β CD/FLU localizado na região de fração molar próximo a 0,5. A outra região está localizada para o máximo da curva com fração molar igual a 0,70, o que corresponde à sistemas do tipo 2:1 β CD/FLU. A observação desses dois patamares para o experimento de Job corresponde à existência de mais de um tipo de complexo de inclusão em equilíbrio em solução aquosa, possibilidade já relatada através da análise da modificação dos diversos modos vibracionais observados por infravermelho. Entretanto, estes fatores não impedem que uma estrutura supramolecular seja mais estável do que outra em solução, uma vez que o efeito de impedimento espacial, devido ao reduzido tamanho da FLU em relação à β CD, pode impossibilitar o favorecimento da estabilidade de complexos de razão 2:1 β CD/FLU.

3.3 – Ressonância Magnética Nuclear:

RMN

Foram utilizados para a caracterização dos materiais de partida, β CD e FLU, diversas técnicas, uni- e bidimensionais, de RMN. O emprego destas técnicas teve como objetivo a caracterização estrutural das moléculas hóspede e hospedeira e ainda avaliar a pureza dessas moléculas.

Para a β -ciclodextrina o espectro de hidrogênio a 400 MHz, em D₂O, está apresentado na Figura 3.18. A escolha do D₂O como solvente deve-se ao fato de que a molécula hóspede, a hospedeira e seu respectivo composto de inclusão são relativamente solúveis neste solvente. Os sinais observados para

a β CD estão de acordo com aqueles relatados na literatura [13] e as atribuições e valores de deslocamento químico estão relacionados na Tabela 3.2. Os hidrogênios ligados as hidroxilas não aparecem uma vez que estes hidrogênios lábeis são trocados pelo átomo de deutério do solvente.

Tabela 3.2: Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios da β CD, a 400 MHz em D_2O .

| Hidrogênios | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|
| δ /ppm | 5,03 | 3,61 | 3,93 | 3,55 | 3,84 | 3,81 |

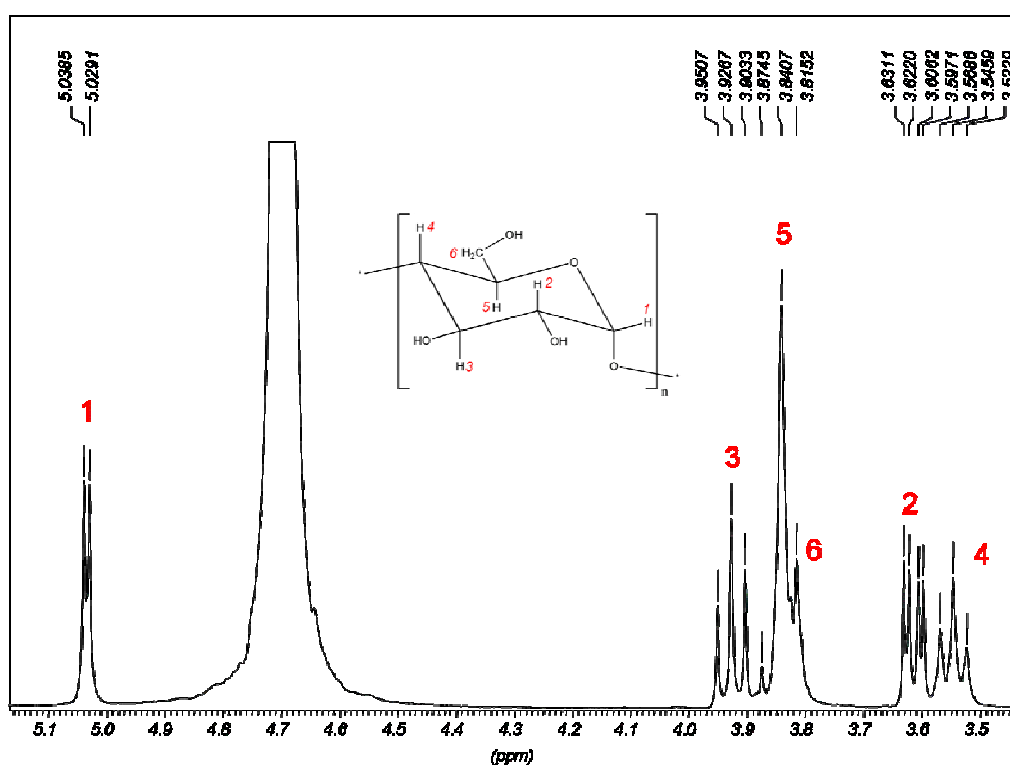


Figura 3.18: Espectro de RMN de 1H da β CD a 400 MHz em D_2O .

Para a molécula de Fluoxetina foram utilizadas as técnicas de 1H , COSY $^1H/^1H$, ^{13}C e ainda HSQC $^1H/^13C$ para elucidação estrutural e determinação de sua pureza. Em todos os experimentos o D_2O foi utilizado como solvente.

Conforme mencionado anteriormente, devido à utilização deste solvente, os hidrogênios referentes ao grupo amino não aparecem, uma vez que estes são trocados com o átomo de deutério do D_2O .

O espectro de RMN de 1H , a 400 MHz, para a Fluoxetina está apresentado na Figura 3.19 na qual é possível verificar que a integral de cada sinal corresponde ao número de hidrogênios total da molécula. As atribuições dos sinais dos hidrogênios para a Fluoxetina encontram-se apresentadas na Tabela 3.3. Para uma melhor visualização dos sinais de hidrogênio da FLU foram montadas expansões de seu espectro de hidrogênio, que foi dividido em duas regiões, Figura 3.20 e 3.21.

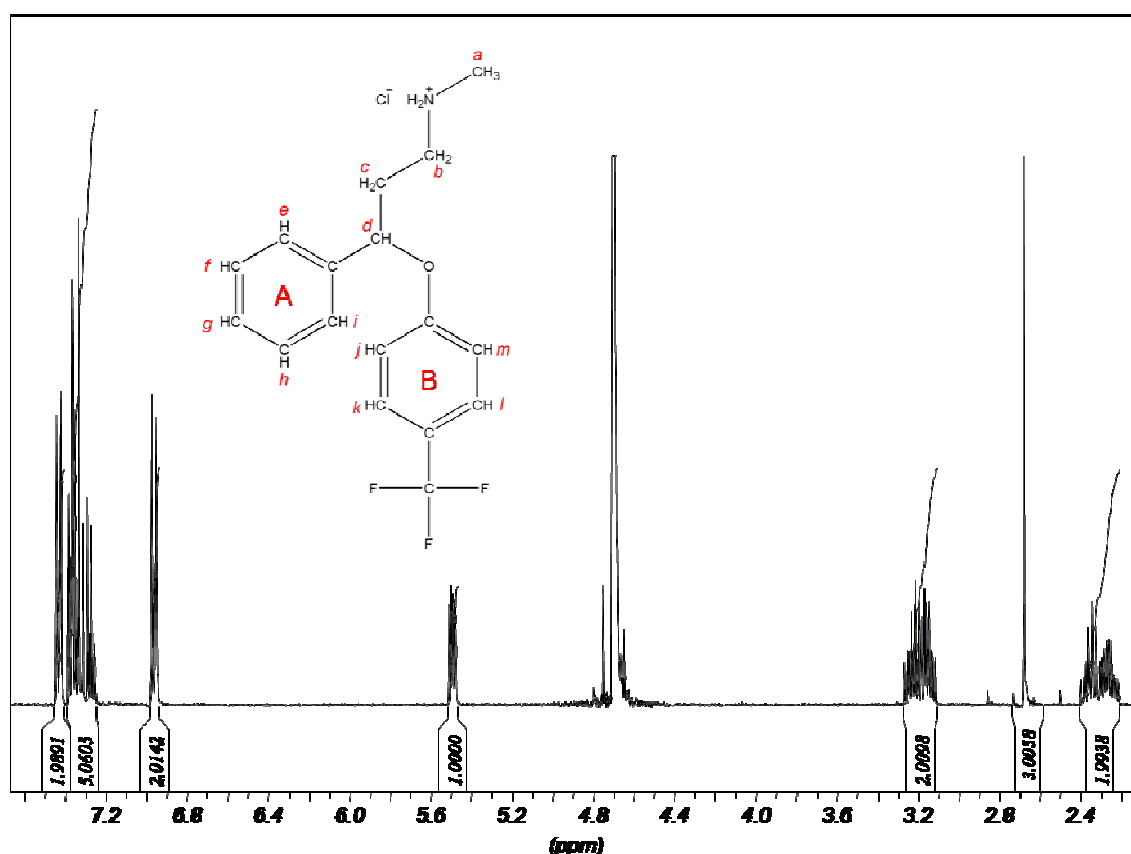


Figura 3.19: Espectro de RMN de 1H da Fluoxetina a 400 MHz em D_2O .

Tabela 3.3: Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios da Fluoxetina, a 400 MHz em D₂O.

| Hidrogênios | a | b | c | d | Anel A | j,m | k,l |
|---------------|------|------|------|------|-----------|------|------|
| δ /ppm | 2,68 | 3,19 | 2,31 | 5,49 | 7,25-7,36 | 6,96 | 7,43 |

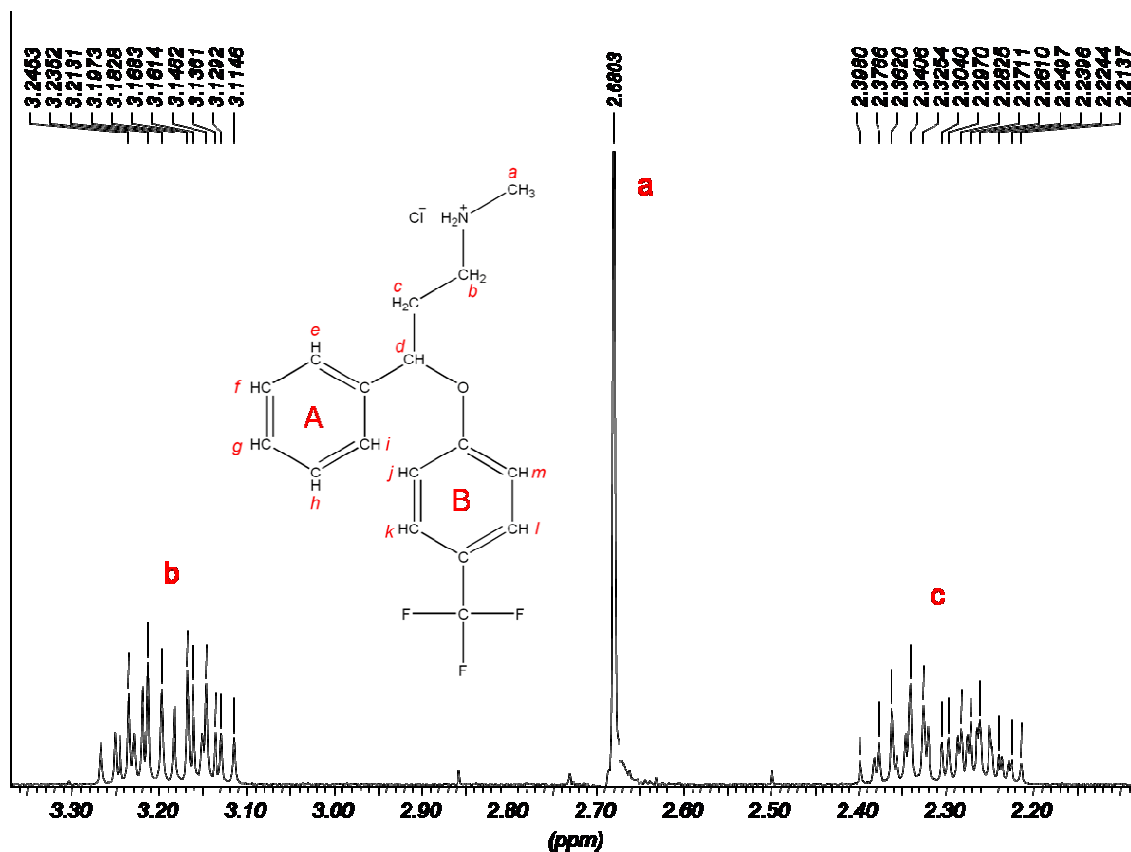


Figura 3.20: Expansão do espectro de RMN de ¹H da Fluoxetina para a região de δ entre 2,10 a 3,40.

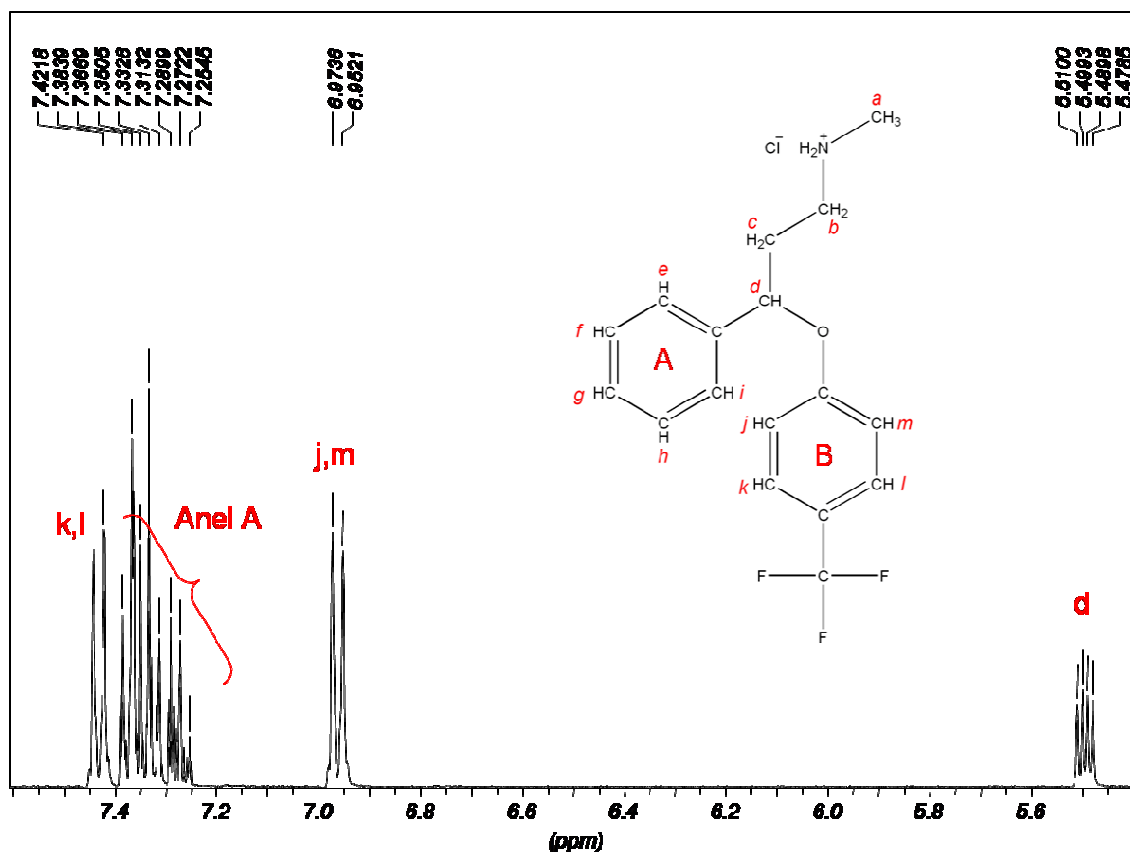


Figura 3.21: Expansão do espectro de RMN de ^1H da Fluoxetina para a região de δ entre 5,50 a 7,50.

Os experimentos bidimensionais de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ auxiliaram na atribuição dos sinais de hidrogênio, através das correlações escalares observadas no mapa de contorno COSY, Figura 3.22.

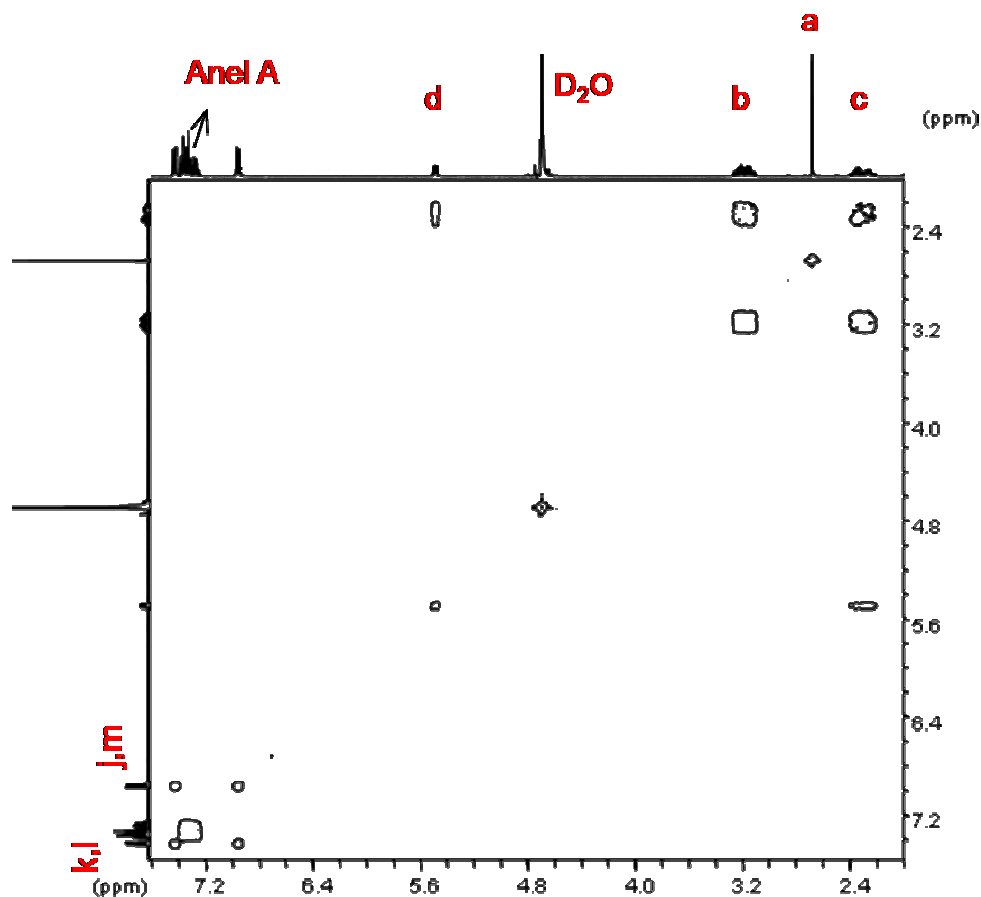


Figura 3.22: Mapa de contorno COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz, em D_2O .

A atribuição dos sinais de carbono para a Fluoxetina foi baseada nos experimentos de ^{13}C , cujo espectro está apresentado na Figura 3.23, e tiveram como auxílio para sua atribuição o experimento bidimensional HSQC, Figura 3.24, que permitiu determinar a posição dos carbonos diretamente ligados a hidrogênios, simplificando a atribuição do espectro de ^{13}C .

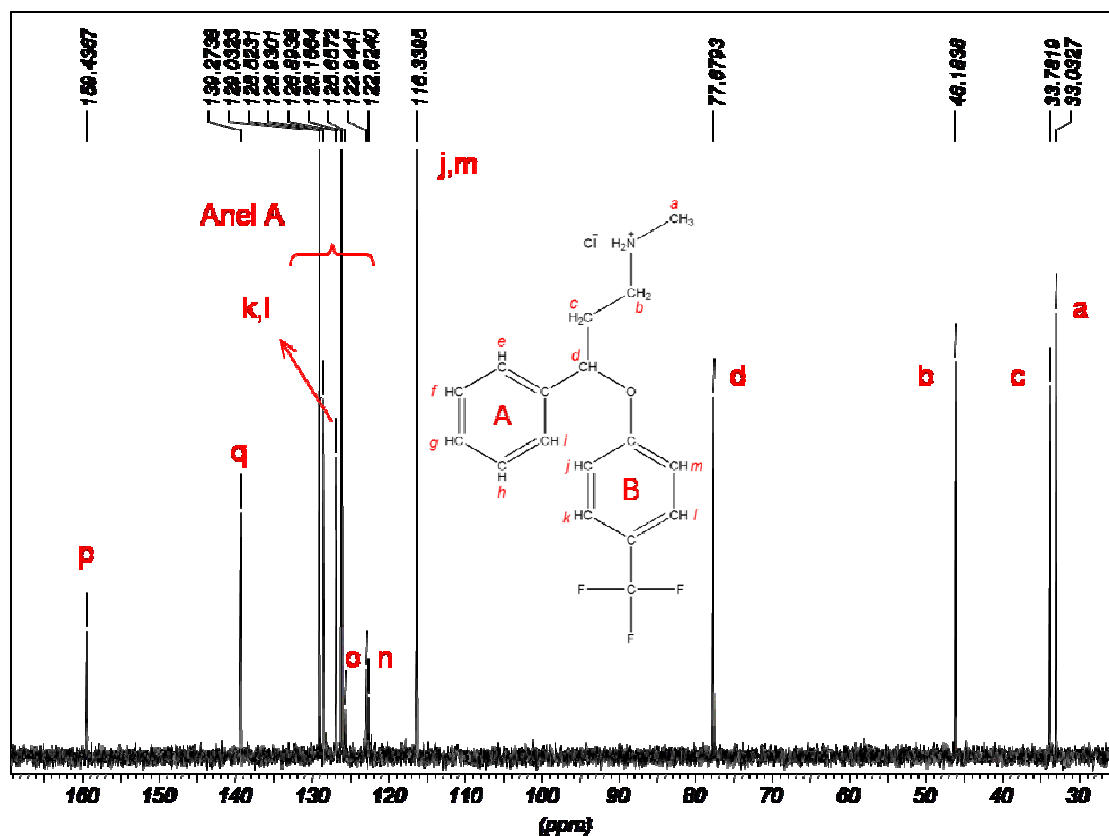


Figura 3.23: Espectro de RMN de ^{13}C para a Fluoxetina a 400 MHz em D_2O .

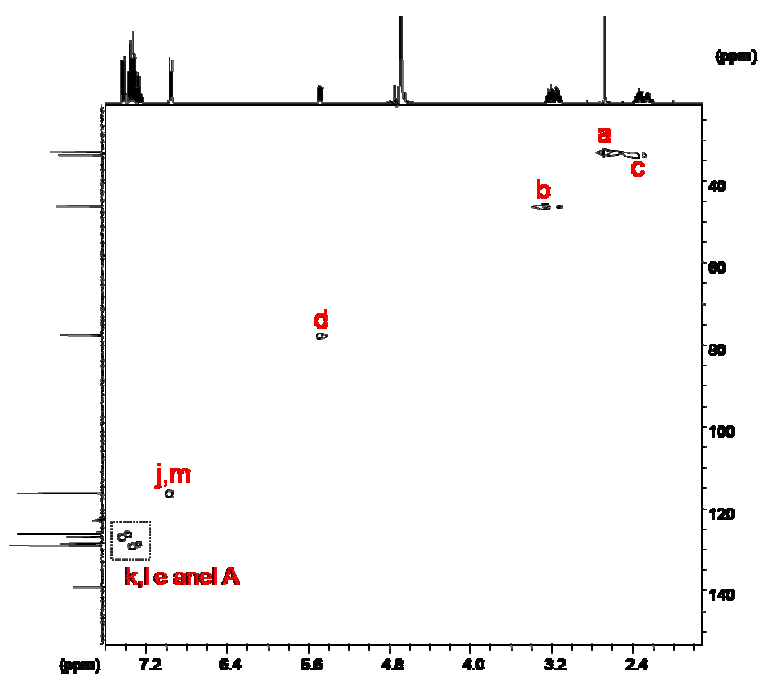


Figura 3.24: Mapa de contorno HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a Fluoxetina a 400 MHz em D_2O .

Com o intuito de avaliar a formação do complexo de inclusão entre a Fluoxetina e a β -ciclodextrina e prever uma geometria complexos a diferentes razões molares (0,5:1 até 2:1 β CD/FLU), foram preparados. Esses complexos de inclusão foram analisados através dos experimentos de ^1H e T_1 e para os compostos de inclusão preparados na razão molar de 1:1 e 2:1 β CD/FLU foram realizados também os experimentos bidimensional NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$.

Comparando os espectros de ^1H dos complexos a diferentes razões molares (0,5:1; 0,75:1; 1:1; 1,25:1; 1,5:1 e ainda 2:1) com o espectro da Fluoxetina livre, Figura 3.25a, na região referente aos hidrogênios dos anéis aromáticos, fica evidente uma variação no deslocamento químico para estes hidrogênios [8]. Para os hidrogênios H_j e H_m ($\delta = 6,96$), referentes ao anel aromático B, ocorre a perda de sua equivalência na presença da β CD, principalmente para complexos com maior concentração de ciclodextrina. Para os hidrogênios H_k e H_l , também presentes no anel aromático B, ocorre um deslocamento químico para regiões de frequência mais baixas, de 7,43 para a FLU livre para 7,31 quando o complexo tem razão de 2:1 β CD/FLU. Esta variação no deslocamento químico para estes hidrogênios é uma forte evidência de que esta região da FLU, anel aromático B, está interagindo de forma efetiva com a cavidade da β CD. Na Tabela 3.4 são apresentados os valores de deslocamento químico para a Fluoxetina livre e seus compostos de inclusão nas razões 1:1 e 2:1 β CD/FLU, bem como a variação de deslocamento químico para os hidrogênios da FLU livre e complexada com β CD.

Tabela 3.4: Valores de deslocamento químico para os hidrogênios da FLU, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/FLU, a 400 MHz em D₂O.

| Hidrogênios | δ FLU | δ IC 1:1 | $\Delta\delta^a$ IC 1:1 | δ IC 2:1 | $\Delta\delta^b$ IC 2:1 |
|-------------|--------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| a | 2,68 | 2,72 | -0,04 | 2,68 | 0,0 |
| b | 3,19 | 3,24 | -0,05 | 3,23 | -0,04 |
| c | 2,31 | 2,42 | -0,11 | 2,41 | -0,10 |
| d | 5,49 | 5,52 | -0,03 | 5,47 | 0,02 |
| Anel A | 7,32 | 7,41 | -0,09 | 7,37 | -0,05 |
| j, m | 6,96 | 7,04 | -0,08 | 7,00 | -0,04 |
| k, l | 7,43 | 7,38 | 0,05 | 7,31 | 0,12 |

$$^a\Delta\delta = \delta FLU - \delta 1:1 \beta CD/FLU$$

$$^b\Delta\delta = \delta FLU - \delta 2:1 \beta CD/FLU$$

Uma outra mudança no perfil do espectro de hidrogênio da FLU é observada para os hidrogênios do outro anel aromático, o anel A. Ocorre neste caso, a coalescência destes hidrogênios o que permite afirmar que uma interação entre esta parte da molécula hóspede e a cavidade da β CD, também deve existir. Estas diferentes modificações no perfil do espectro de hidrogênio da FLU em presença de β CD ajudam a corroborar a existência de um equilíbrio entre mais de uma espécie em solução. Essa hipótese já foi verificada através dos experimentos de FTIR-HATR, nos quais diferentes modos vibracionais da molécula de FLU sofreram alterações na presença de ciclodextrina. Esse resultado também foi sugerido pelo experimento de Job, no qual a presença de mais de um tipo de complexo pode ser observado, sistemas 1:1 e 2:1 β CD/FLU. Contudo, como as principais variações no deslocamento químico são observadas para os hidrogênios do anel aromático que contém o grupo

CF₃ como substituinte, este fato indica uma preferência da cavidade da ciclodextrina por esta região da molécula hóspede.

Verifica-se ainda, a coalescência dos hidrogênios internos da β CD, H3 e H5 ($\delta = 3,82 - 3,96$) em todos os complexos supramoleculares nas diferentes razões molares, Figura 3.25b. Vale a pena enfatizar que uma grande variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios externos H2 e H4 ($\delta = 3,51 - 3,65$) também foi observada quando comparados com os sinais da β CD livre.

A confirmação da troca de posição, no espectro de RMN de ¹H para os hidrogênios externos H2 e H4 da β CD, se deu através da verificação do deslocamento químico de seus respectivos carbonos através dos experimentos de HSQC, Figura 3.26, uma vez que os núcleos de carbono não sofrem uma alteração significativa de deslocamento após a complexação com a ciclodextrina. Os valores de deslocamento químico para esses carbonos, C2 e C4, estão de acordo com aqueles encontrados na literatura [13]. Estas mudanças, nos sinais da β CD, são outras evidências de que a interação entre as espécies β CD e FLU ocorre em solução [8].

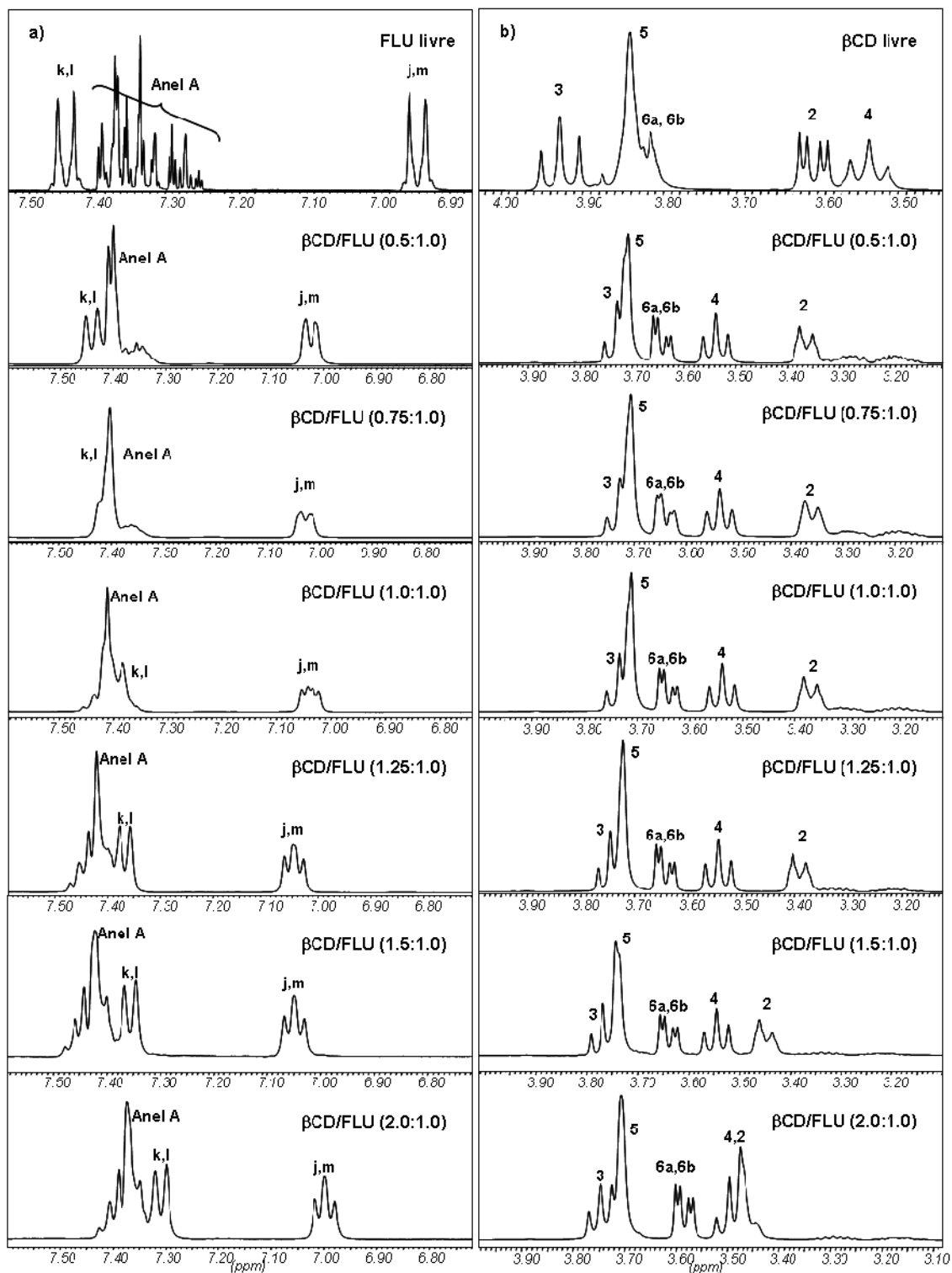


Figura 3.25: Expansão do espectro de RMN de ^1H , a 400 MHz em D_2O a) FLU e os CIs para as razões molares de 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.25:1, 1.5:1 e 2:1 β CD/FLU em $\delta = 6.80 - 7.50$ e b) β CD e os CIs para as razões molares de 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.25:1, 1.5:1 e 2:1 β CD/FLU em $\delta = 3.10 - 3.90$.

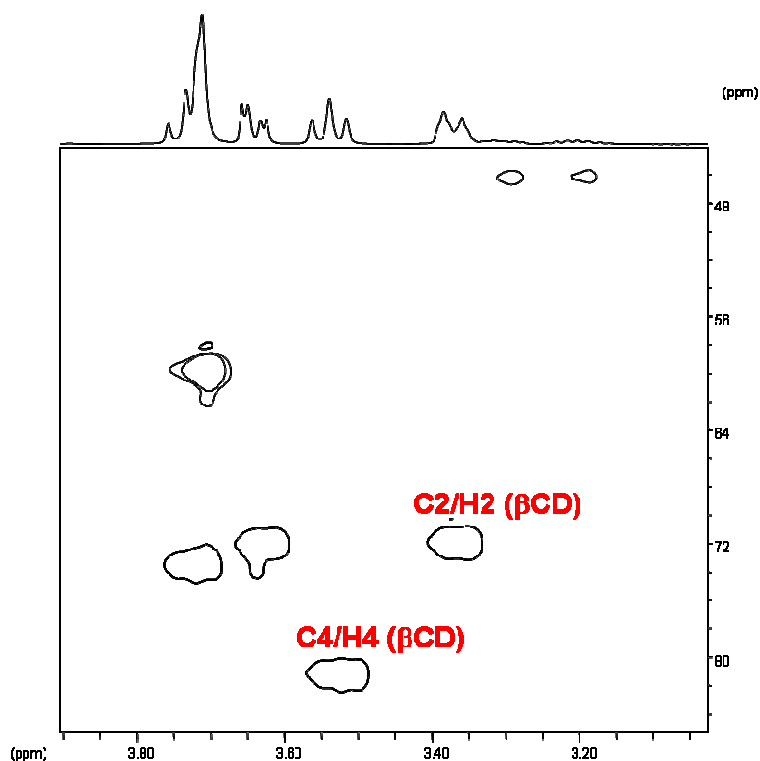


Figura 3.26: Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo de inclusão 1:1 β CD/FLU a 400 MHz em D_2O .

Estas modificações observadas nos espectros dos complexos de inclusão, para os hidrogênios da FLU e da β CD, são causadas pela mudança na densidade eletrônica dos grupos funcionais envolvidos no processo de complexação que conseqüentemente, altera o momento magnético nuclear resultante sobre estes núcleos, refletindo no espectro como variação no deslocamento químico e na alteração do perfil do sinal [13, 14]. Estes fenômenos têm sido relatados na literatura e geralmente são observados para grupos com alta densidade eletrônica presentes na molécula hóspede, que são capazes de causar ou sofrer perturbações significativas para serem detectadas por RMN, servindo como sonda para a análise do composto de inclusão [15].

Os experimentos de tempo de relaxação longitudinal (T_1) foram conduzidos com o objetivo de avaliar a mobilidade dos hidrogênios da

Fluoxetina na ausência e na presença de β CD. Na Tabela 3.5 estão apresentados os valores de T_1 para os hidrogênios da FLU livre, seus complexos de inclusão nas razões 1:1 e 2:1 β CD/FLU e ainda a variação de T_1 para o sistema livre e complexado. Para moléculas orgânicas o processo de relaxação ocorre principalmente pelo mecanismo de relaxação dipolar e desta forma, os valores de T_1 estão diretamente relacionados com o coeficiente de difusão rotacional. Assim, para o sistema supramolecular β CD/FLU uma gradual redução no valor de T_1 , principalmente para os hidrogênios do anel aromático B, é observada. Este efeito se torna mais acentuado quando a concentração de β CD aumenta, para o sistema 2:1 β CD/FLU. Esta maior redução na mobilidade dos hidrogênios do anel B está de acordo com os resultados obtidos tanto para os experimentos de RMN de ^1H quanto para os experimentos de FTIR-HATR, indicando uma redução na mobilidade destes hidrogênios da Fluoxetina, após a complexação com a β CD e conseqüentemente, sua inclusão na cavidade desta. Para H_k e H_l na razão molar de 1:1 β CD/FLU não foi possível determinar o valor de tempo de relaxação, uma vez que estes sinais de hidrogênios se encontram sobrepostos com os sinais do hidrogênio do anel aromático A.

Tabela 3.5: Valores de T_1 para a FLU, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/FLU e a variação de T_1 (ΔT_1) para cada sistema.

| Hidrogênio | T_1/s (FLU) | T_1/s IC 1:1 | $\Delta T_1/s^a$ | T_1/s IC 2:1 | $\Delta T_1/s^b$ |
|------------|---------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| <i>a</i> | 1,28 ± 0,01 | 1,14 ± 0,01 | 0,14 | 1,02 ± 0,01 | 0,26 |
| <i>b</i> | 0,62 ± 0,01 | 0,50 ± 0,01 | 0,12 | 0,40 ± 0,01 | 0,22 |
| <i>c</i> | 0,47 ± 0,01 | 0,38 ± 0,01 | 0,09 | 0,33 ± 0,01 | 0,14 |
| <i>d</i> | 0,79 ± 0,01 | 0,55 ± 0,01 | 0,24 | 0,51 ± 0,01 | 0,28 |
| <i>j,m</i> | 1,30 ± 0,01 | 0,81 ± 0,01 | 0,49 | 0,71 ± 0,01 | 0,59 |
| <i>k,l</i> | 1,48 ± 0,01 | — | — | 0,87 ± 0,01 | 0,61 |

$$^a \Delta T_1/s = T_1/s \text{ FLU} - T_1/s \text{ IC 1:1}$$

$$^b \Delta T_1/s = T_1/s \text{ FLU} - T_1/s \text{ IC 1:1}$$

—sobreposição de sinais

Com o objetivo de confirmar as correlações a curtas distâncias (menores do que 5 Å) entre os hidrogênios da Fluoxetina e os hidrogênios da β CD, os experimentos de NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ foram conduzidos, uma vez que o Efeito Nuclear Overhauser é uma das medidas de RMN mais importantes para a confirmação da interação hóspede-hospedeiro, além de sugerir a geometria do complexo de inclusão formado em solução [10, 16-18]. Logo, foram utilizados os sistemas 1:1 e 2:1 β CD/FLU para a avaliação das interações entre as espécies e os mapas de contorno NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ para estes sistemas estão apresentados nas Figuras 3.27a e 3.27b. Desta forma, correlações à curtas distâncias entre todos os hidrogênios aromáticos da Fluoxetina, anéis A e B da região entre δ 6,95 a δ 7,44, com os hidrogênios internos (H3, H5 e H6, região de δ 3,59 to δ 3,75) e também com os hidrogênios externos (H2 e H4 região de

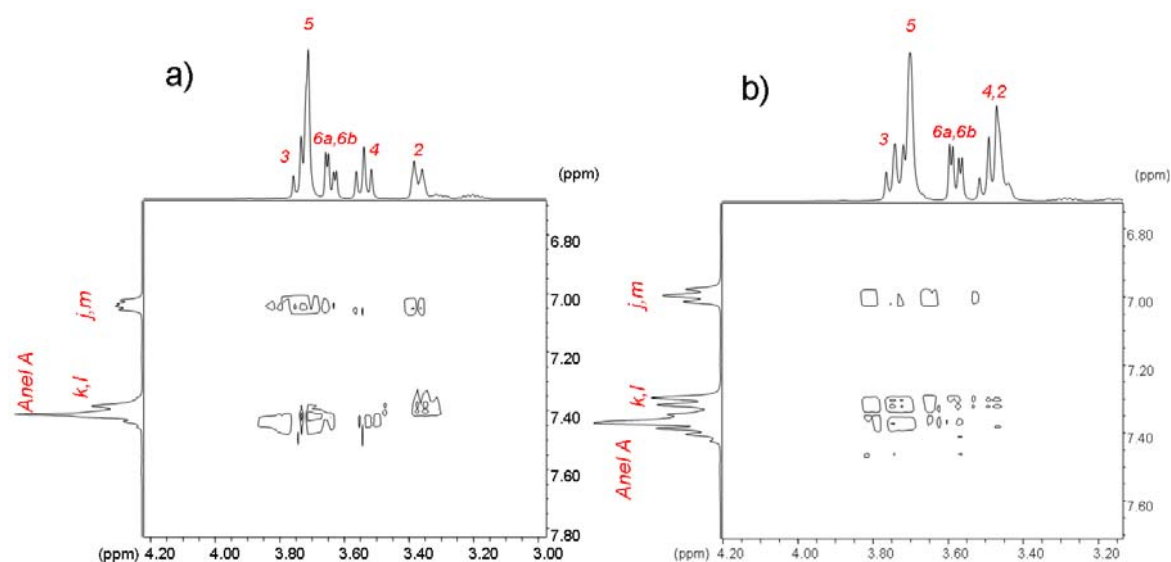
δ 3,44 to δ 3,76) da molécula de β CD foram observados através da análise dos mapas de contorno para todos os sistemas nas diferentes razões molares estudadas.

Estas correlações, observadas com mais de um sítio da molécula hóspede, indicam mais uma vez que um equilíbrio rápido pode ocorrer em solução. Estes equilíbrios podem ocorrer entre as espécies quando:

1. uma molécula de β CD interage com o anel aromático A da Fluoxetina [8]
2. uma molécula de β CD interage com o anel aromático B da Fluoxetina [8]
3. duas moléculas de β CD interagem de forma simultânea com os dois anéis aromáticos da Fluoxetina.

Devido ao grande tamanho da β CD relativo à estrutura da FLU, a terceira possibilidade de complexo, 2:1 β CD/FLU onde os dois anéis aromáticos se encontrem completamente incluídos na cavidade da β CD, seria estericamente improvável de ocorrer. Entretanto, conforme verificado a partir do experimento de Job, sistemas 2:1 β CD/FLU existem em solução, mas este tipo de complexo provavelmente não apresenta ambos os anéis aromáticos incluídos de forma profunda na cavidade da β CD.

As outras técnicas físico-químicas de análise, FT-IR, FTIR-HATR e ainda RMN utilizadas na caracterização deste complexo supramolecular formado entre a β CD e a FLU, sugerem fortemente que o composto de inclusão formado é aquele através da interação entre a cavidade da β CD com o anel aromático B da FLU. Entretanto, é importante lembrar que sistemas supramoleculares de alta massa molecular podem ocorrer em solução, o que explicaria as diferentes correlações dipolares observadas nos mapas de contorno NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ [10].



Figuras 3.27: a) mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 1:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ e b) mapa de contorno 2D NOESY a 400 MHz em D_2O para o sistema 2:1 $\beta\text{CD}/\text{FLU}$.

A maior estabilidade da inclusão pelo anel B foi confirmada através de cálculos teóricos realizados no Laboratório de Química Computacional e Modelagem Molecular, do Departamento de Química da UFMG, sob responsabilidade do Prof. Dr. Wagner B. de Almeida e com a colaboração da doutoranda Juliana F. Lopes e estes resultados se encontram apresentados na referência [7] e não serão discutidos no corpo desta dissertação.

3.4 – Calorimetria Isotérmica de Titulação:

ITC

Na Figura 3.28a estão apresentadas as curvas de titulação calorimétrica para a Fluoxetina em água e em solução de β -ciclodextrina e na Figura 3.28b a subtração da curva do processo de diluição da FLU pela sua curva de titulação

com a β CD. O procedimento de subtração das curvas tem como objetivo excluir os efeitos de diluição do titulante no solvente, explicitando apenas as interações entre a titulante (FLU) e o titulado (β CD).

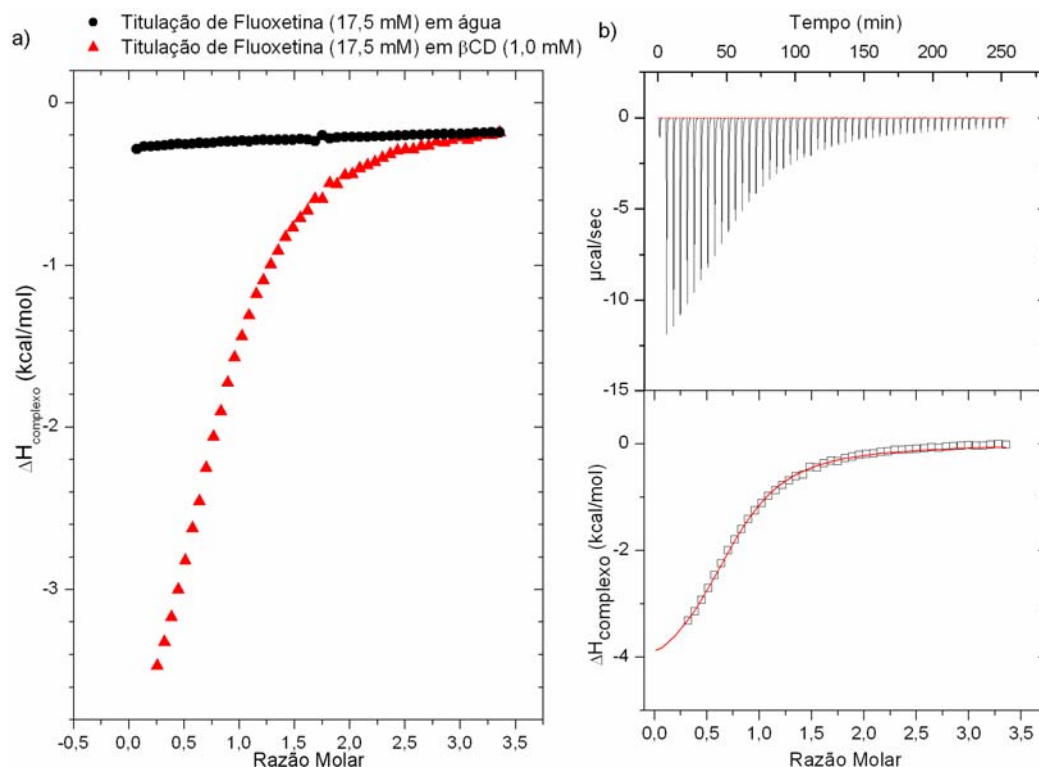


Figura 3.28: Curvas de titulação calorimétrica: a) Fluoxetina (17,5 mM) em água e da Fluoxetina (17,5 mM) em β CD (1,0 mM) b) curva final após subtração e seu ajuste não linear.

Através da análise da curva de diluição da Fluoxetina em água é verificada uma variação de entalpia próxima de zero. Outro dado obtido a partir da curva de diluição da FLU em água é que esta não tende a se agregar em solução, uma vez que o processo de diluição não apresentou variação de entalpia. Essa variação de entalpia, para o processo de diluição da FLU, seria esperada uma vez que durante a titulação as moléculas do titulante são necessariamente afastadas umas das outras levando a alterações nas

interações entre soluto-soluto, soluto-solvente e ainda solvente-solvente, que não são observadas para este sistema.

Para a curva de titulação da FLU em β CD foi possível ajustar uma curva de perfil sigmóide, que permitiu obter o coeficiente estequiométrico da reação, aproximadamente (0,82), correspondendo a um complexo de estequiometria 1:1 β CD/FLU. O fato da técnica de ITC não ter fornecido valores de estequiometria para este sistema supramolecular na razão molar de 2:1 β CD/FLU, como observado pela curva de Job, pode ser explicado pela diferença no monitoramento dos diferentes fenômenos físico-químicos do sistema. Entretanto, a técnica de calorimetria isotérmica de titulação é mais sensível a variações de entalpia do sistema do que a técnica de FTIR-HATR é para variações na intensidade de transmitância. Desta forma, é possível inferir que sistemas do tipo 1:1 β CD/FLU sejam mais estáveis em solução do que sistemas 2:1, uma vez que não foram observadas outras inflexões na curva de titulação calorimétrica, além do valor de $N = 0,82$. Contudo, isso não significa que sistemas do tipo 2:1 não ocorram em solução e que não possam estar em equilíbrio com sistemas 1:1 β CD/FLU.

Além disso, através do ajuste não linear, obtido pelo próprio programa, Microcal Origin 5.0, foi possível estimar a constante de formação do complexo β CD/FLU e seu valor está apresentado na Tabela 3.6. Este perfil de curva para o sistema β CD/FLU demonstra a existência de uma forte interação entre as espécies, quando comparado a outros sistemas com ciclodextrinas descritos na literatura [19, 20]. Essa forte interação é confirmada pela constante de equilíbrio estimada, $K \approx 6921 \pm 316$ e pode ser atribuída ao pequeno tamanho da molécula hóspede, a Fluoxetina, e ainda a possíveis interações

eletrostáticas entre esta última e a β -ciclodextrina. De posse do valor da variação de entalpia do processo obtido experimentalmente e com a utilização de equações clássicas da termodinâmica [21] foi possível determinar ainda os termos ΔG° e $T\Delta S^\circ$, também apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema β CD/FLU.

| N | K | $\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ | $\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ | $T\Delta S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
|------|----------------|--|--|---|
| 0,82 | 6921 ± 316 | -21,5 | -17,2 | 4,3 |

O processo de formação do complexo de inclusão formado pelas moléculas de β CD e FLU se mostrou espontâneo, com uma variação de energia de $\Delta G^\circ = -21,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

O termo entálpico está relacionado com a quebra e formação de interações, mais ou menos estáveis, que descrevem processos de complexação entre as moléculas hóspedes e hospedeiras. Para a complexação entre a β CD e a FLU um processo exotérmico ($\Delta H^\circ = -17,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) é observado e, a este fenômeno, pode ser atribuído a saída das moléculas de água do interior da cavidade e ainda a existência de interações cooperativas entre as moléculas hóspede e hospedeira, como o efeito hidrofóbico e interações eletrostáticas. A contribuição entrópica ($T\Delta S^\circ = 4,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) pode ser atribuída à dessolvatação das moléculas hóspedes durante a complexação que foi possível pelo reduzido tamanho da FLU e ainda à possibilidade da existência de mais de um tipo de complexo de inclusão em equilíbrio, aumentando o número de espécies existentes em solução.

3.5 – Referências:

1. Giordano, F., C. Novak, and J.R. Moyano, *Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds*. *Thermochimica Acta*, 2001. **380**(2): p. 123-151.
2. Silva, M.A.S., et al., *Thermoanalytical Study of Fluoxetine Hydrochloride*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2007. **87**(5): p. 463-467.
3. Egyed, O., *Spectroscopic studies on [beta]-cyclodextrin*. *Vibrational Spectroscopy*, 1990. **1**(2): p. 225-227.
4. Denadai, Â.M.L., et al., *A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity*. *Biodrugs*, 2006. **20**(5): p. 283-291.
5. Brito, H.F., et al., *Spectroscopic study of the inclusion compound of β -cyclodextrin and Tris(dibenzoylmethane)europium(III) dihydrate*. *Spectrochimica Acta Part A*, 1999. **55**(12): p. 2403–2410.
6. De Sousa, F.B., et al., *Study of inclusion compound in solution involving Tetracycline and β -cyclodextrin by FTIR-ATR*. *Vibrational Spectroscopy*. 2008. **46**(1): p. 57-62.
7. De Sousa, F.B., et al., *Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: an experimental and theoretical study*. *International Journal of Pharmaceutics*. **aceito**.
8. Ali, S.M., et al., *Complexation of fluoxetine hydrochloride with [beta]-cyclodextrin. A proton magnetic resonance study in aqueous solution*. *II Farmaco*, 2005. **60**(5): p. 445-449.

9. Liu, Y., et al., *Secondary assembly of bile salts mediated by [beta]-cyclodextrin-terbium(III) complex*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006. **14**(19): p. 6615-6620.
10. Denadai, A.M.L., et al., *Supramolecular Self-Assembly of [beta]-Cyclodextrin: An Effective Carrier of the Anti-microbial Agent Chlorhexidine*. *Carbohydrate Research*. 2007. **342**(15): p. 2286-2296.
11. Jullian, C., et al., *Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007. **15**(9): p. 3217-3224.
12. Hazekamp, A. and R. Verpoorte, *Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated [beta]-cyclodextrin*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. **29**(5): p. 340-347.
13. Schneider, H.J., et al., *NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes*. *Chem. Rev.*, 1998. **98**(5): p. 1755-1786.
14. Denadai, A.M.L., et al., *Self-assembly Characterization of the β -Cyclodextrin and Hydrochlorothiazide System: NMR, Phase Solubility, ITC and QELS*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2006. **55**(1-2): p. 41-49.
15. Loftsson, T., et al., *Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1993. **1**(2): p. 95-101.
16. Dupuy, N., et al., *^1H NMR study of inclusion compounds of phenylurea derivatives in [beta]-cyclodextrin*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005. **61**(6): p. 1051-1057.

17. Xiliang, G., et al., *Study on inclusion interaction of piroxicam with [beta]-cyclodextrin derivatives*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003. **59**(14): p. 3379-3386.
18. Duan, M.S., et al., *Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: Formation of aggregates and higher-order complexes*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **297**(1-2): p. 213-222.
19. Rekharsky, M.V. and Y. Inoue, *Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1875-1918.
20. Turnbull, W.B. and A.H. Daranas, *On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(48): p. 14859-14866.
21. Klotz, I.M. and R.M. Rosenberg, *Chemical Thermodynamics*. 6 ed. 2000: John Wiley & Sons Inc.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão:

Sistema β -ciclodextrina/imipramina

4 – Caracterização do Sistema β -ciclodextrina/imipramina:

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a caracterização dos dispositivos de liberação sustentada, formados pela interação entre a β CD e a IMI, a diferentes razões molares, e ainda a caracterização físico-química da Imipramina pura através das metodologias previamente descritas no capítulo 2. Uma vez que os resultados para a β -ciclodextrina livre já foram apresentados no Capítulo 3, estes dados não serão reapresentados no presente Capítulo. Foram utilizadas técnicas de análise térmica (TG/DTG e DSC), espectroscópicas (FT-IR, FTIR-HATR e RMN) e ainda a microcalorimetria (ITC).

4.1 – Análise térmica:

TG/DTG e DSC

Na Figura 4.1 está apresentada a curva termogravimétrica (TG) e sua respectiva derivada (DTG) para o Cloridrato de Imipramina. Através desta curva TG é possível verificar que a IMI apresenta uma pequena quantidade de moléculas de água de hidratação, que representam apenas 3 % do total de perda de massa da molécula. Analisando essa curva TG é possível verificar ainda que a partir da temperatura de 55 até 190 °C, aproximadamente, nenhum evento relacionado à sua termod decomposição é verificado. Entretanto, a partir dessa temperatura de 190 °C, dois eventos relacionados à perda de massa da amostra são observados. O primeiro inicia-se a 190 e estende-se até 332 °C, sendo equivalente a 91 % da perda de massa total da amostra e o outro evento

inicia-se a partir de 335 °C correspondendo à decomposição completa do material. Esses dois eventos, observados e relacionados à termodecomposição da Imipramina, estão de acordo com os dados relatados na literatura [1].

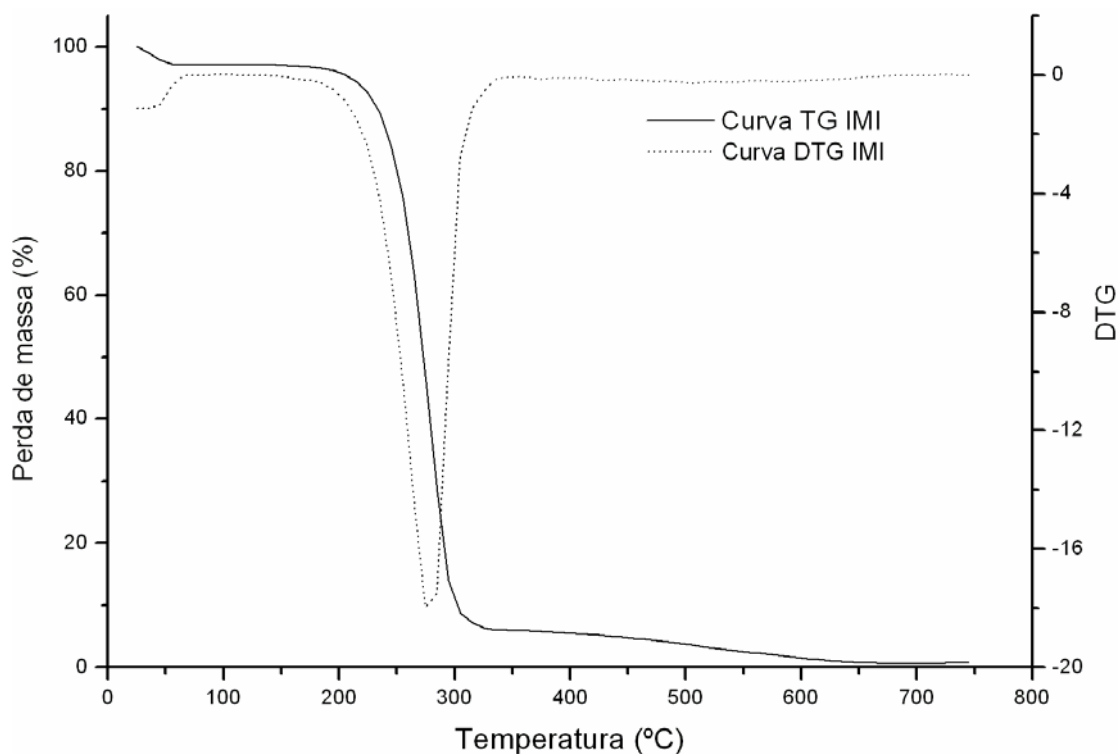


Figura 4.1: Curvas TG/DTG para a Imipramina, em atmosfera de N₂.

De modo a avaliar os eventos relacionados às transições de fase e confirmar a pureza da IMI, o experimento de Calorimetria Diferencial Exploratória foi conduzido e sua respectiva curva DSC, está apresentada na Figura 4.2. É possível verificar através da análise da curva DSC para a molécula de Imipramina, o evento endotérmico relacionado à fusão do material a 157 °C [1]. São observados ainda dois fenômenos endotérmicos, um em aproximadamente 50 °C e outro em 262 °C, referentes à saída das moléculas de água de hidratação e à termodecomposição da Imipramina, respectivamente.

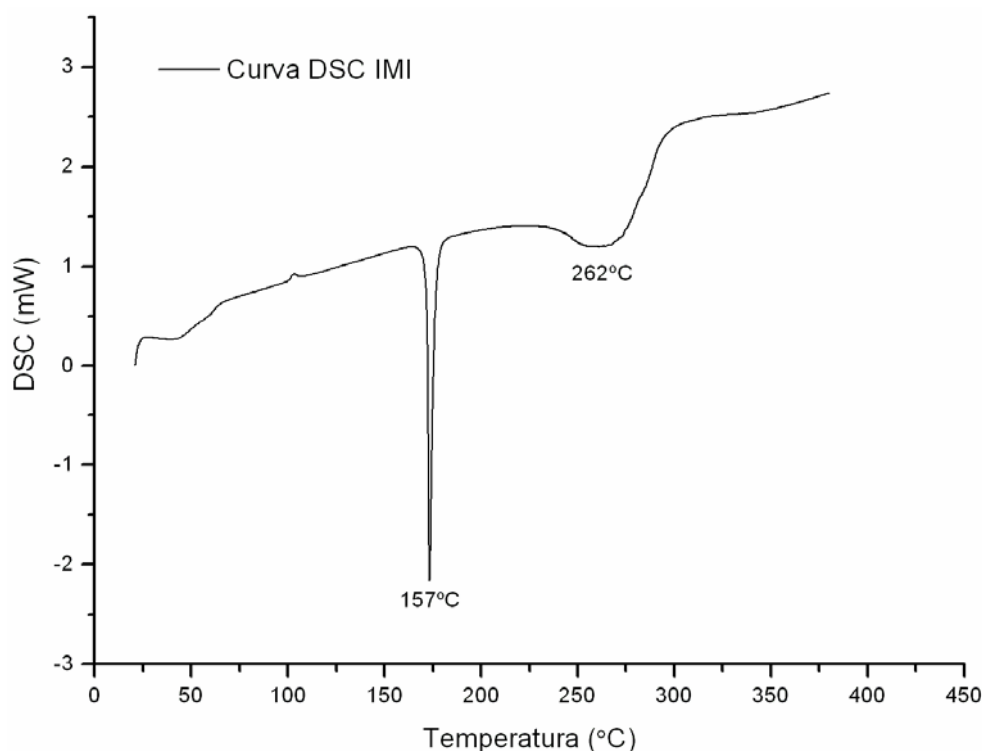


Figura 4.2: Curva DSC para a Imipramina, em atmosfera de N₂.

Com o objetivo de avaliar a interação entre as espécies, β CD e IMI, no estado sólido, foram conduzidos os experimentos de análise térmica TG e DSC para os complexos e suas respectivas misturas mecânicas, nas razões molares de 1:1 e 2:1 β CD/IMI.

As curvas TG para o composto na razão 1:1 β CD/IMI, sua respectiva mistura mecânica e para os compostos livres (β CD e IMI) são apresentadas na Figura 4.3. Comparando essas curvas pode ser observada uma maior estabilidade térmica para o composto 1:1 β CD/IMI e sua mistura mecânica, quando comparados com a β CD e a IMI livres. Embora o perfil da curva TG para o complexo se assemelhe bastante ao de sua mistura mecânica, para o complexo pode ser observada uma menor perda de massa a temperaturas

inferiores a 100 °C. Para a mistura mecânica o processo de decomposição inicia-se a temperatura de 225 °C enquanto que para o CI este fenômeno inicia-se a 240 °C, corroborando a maior estabilidade térmica do CI, frente à sua mistura mecânica. A partir da temperatura de 240 °C, o perfil da curva de termodecomposição é semelhante para os dois materiais (CI e MM), levando a formação de um produto de 20 % de massa à temperatura final de 650 °C.

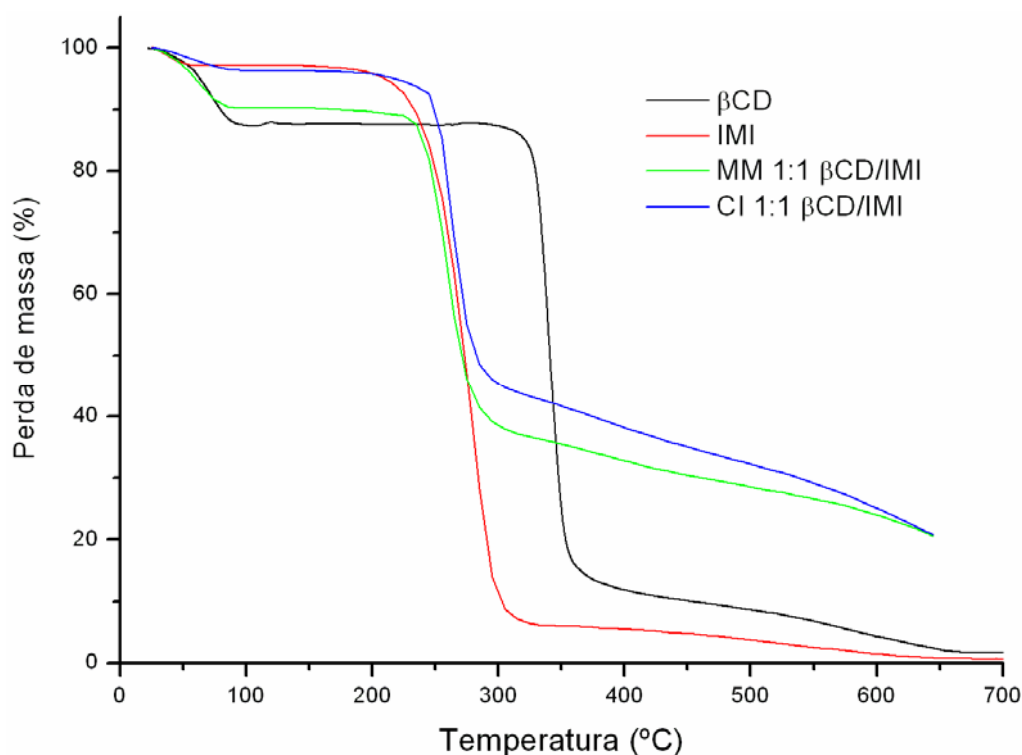


Figura 4.3: Curvas TG para β CD, IMI, mistura mecânica 1:1 β CD/IMI e composto de inclusão 1:1 β CD/IMI, em atmosfera de N_2 .

Avaliando as curvas DSC, Figura 4.4, para os compostos citados anteriormente, β CD, IMI, MM 1:1 β CD/IMI e CI 1:1 β CD/IMI, pode ser notada a ausência do evento relacionado à fusão da IMI, para a mistura mecânica e para o composto β CD/IMI. Este fato é mais um indicativo da interação entre as

espécies, sugerindo ainda que a interação entre essas moléculas seja relativamente forte, uma vez que o perfil das duas curvas DSC é semelhante. Este fato também foi observado quando comparadas às curvas TG para esse mesmo sistema. Para a MM uma transição de fase, à temperatura de aproximadamente 80 °C foi observada e está relacionada à perda de massa referente às moléculas de água de hidratação presentes na β CD e na IMI.

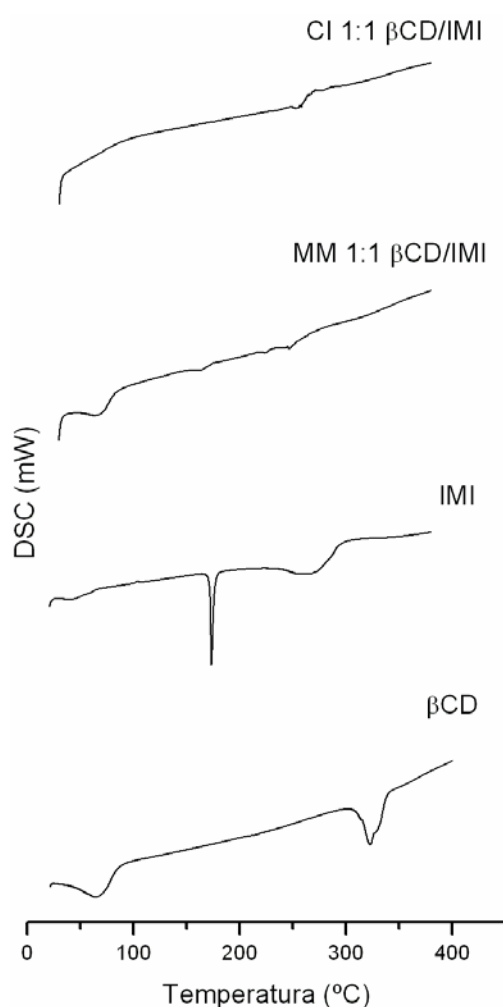


Figura 4.4: Curvas DSC para β CD, IMI, mistura mecânica 1:1 β CD/IMI e composto de inclusão 1:1 β CD/IMI, em atmosfera de N_2 .

Com o intuito de avaliar a estabilidade térmica dos complexos de inclusão com uma maior concentração de β CD, complexos de razão molar 2:1 β CD/IMI foram preparados. A escolha desta outra estequiometria (2:1 β CD/IMI) deve-se ao fato da estrutura da molécula da Imipramina permitir a formação efetiva deste tipo de complexo supramolecular. Para esse sistema 2:1, as curvas TG para o complexo e sua MM estão apresentadas na Figura 4.5.

Diferentemente do que foi observado no sistema 1:1, para o sistema supramolecular 2:1 β CD/IMI, fica evidente uma maior estabilidade térmica do complexo de inclusão a temperaturas mais altas, não só quando comparado aos compostos livres, mas também quando comparado com sua mistura mecânica. Desta forma o complexo de inclusão tende a levar a formação de um produto de aproximadamente 15 % da massa total, enquanto que a MM, β CD e IMI se decompõem completamente. O fato do complexo de inclusão ser mais estável termicamente é um indicativo da maior estabilidade de complexos a razões molares mais altas 2:1, uma vez que a IMI possui, efetivamente, dois anéis aromáticos praticamente equivalentes para a interação com a cavidade da β CD. Para faixas de temperatura mais baixas, inferiores a 100 °C, o comportamento do CI é muito semelhante ao da β CD livre, o que pode ser explicado pela alta concentração de β CD presente neste complexo.

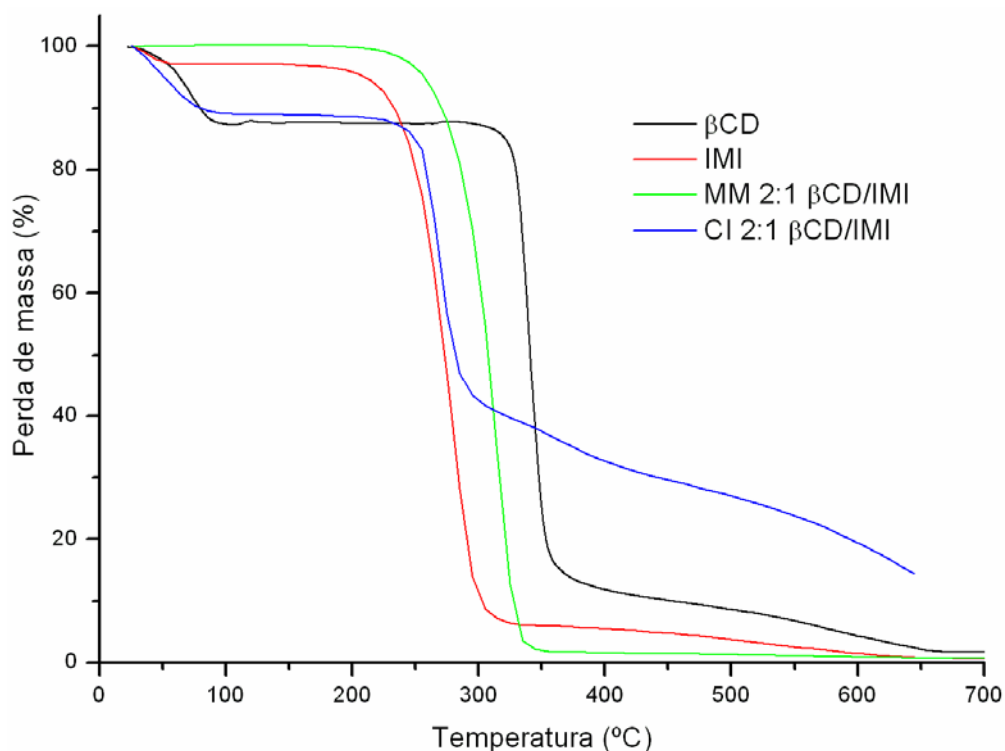


Figura 4.5: Curvas TG para β CD, IMI, mistura mecânica 2:1 β CD/IMI e composto de inclusão 2:1 β CD/IMI, em atmosfera de N_2 .

Entretanto, da mesma forma como observado para o sistema supramolecular 1:1, no complexo 2:1 β CD/IMI, tanto a curva DSC do CI quanto de sua mistura mecânica não apresentaram o evento relacionado à fusão da Imipramina a temperatura de 157 °C, Figura 4.6. Além disso, o perfil dessas duas curvas DSC se mostrou semelhante àquele observado para o sistema 1:1 β CD/IMI, indicando que há interação entre as espécies tanto para o sistema do tipo 1:1 quanto 2:1 β CD/IMI.

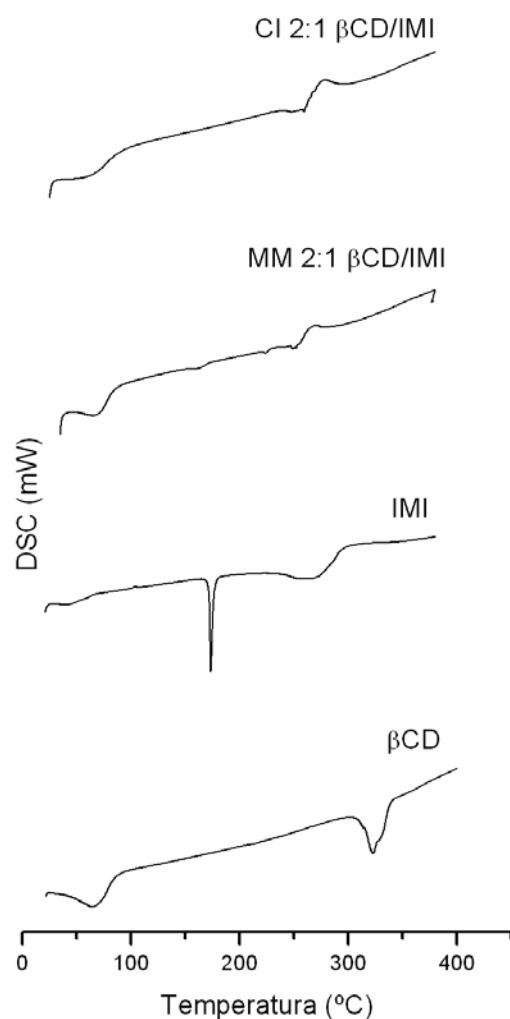


Figura 4.6: Curvas DSC para β CD, IMI, mistura mecânica 2:1 β CD/IMI e composto de inclusão 2:1 β CD/IMI, em atmosfera de N_2 .

4.2 – Espectroscopia de Absorção (FT-IR) e Reflectância Atenuada Horizontal (FTIR-HATR) na Região do Infravermelho:

FT-IR

De modo a caracterizar os modos vibracionais referentes à molécula de Imipramina livre, seu espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em pastilha de KBr, e este espectro encontra-se apresentado na Figura 4.7.

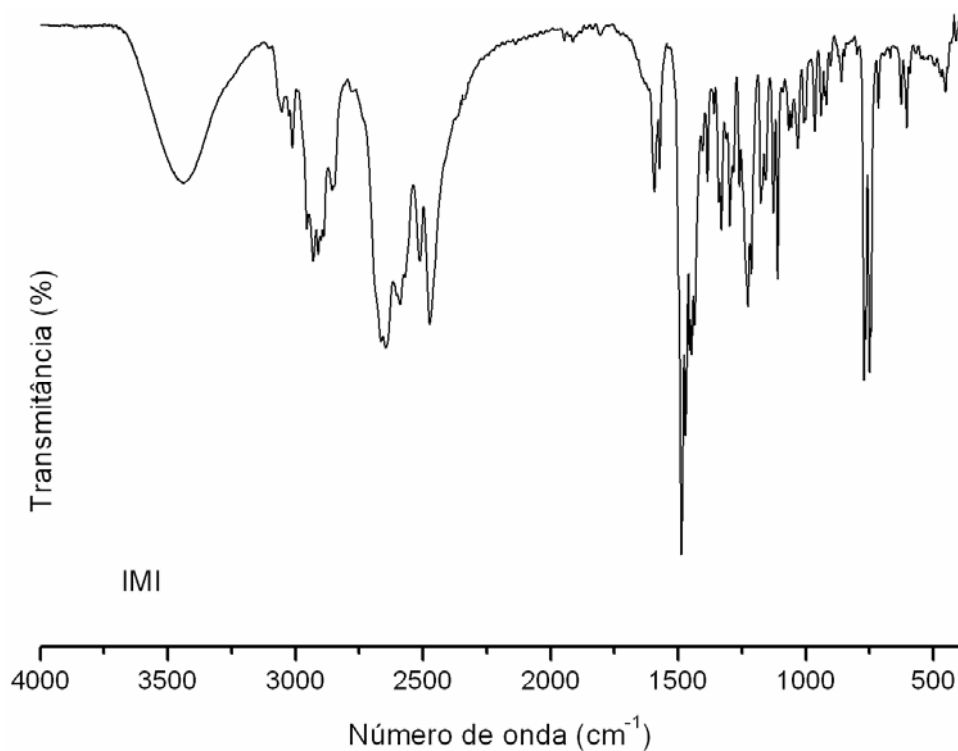


Figura 4.7: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Imipramina, em KBr na região entre 4000 – 400 cm^{-1} .

Analisando o espectro de infravermelho para a molécula de Imipramina podem ser notadas características de uma substância cristalina, uma vez que suas bandas, na região entre 650 a 450 cm^{-1} , apresentam-se bem definidas. A atribuição de alguns dos principais modos vibracionais para a molécula de IMI encontra-se descrita na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Relação de alguns modos vibracionais referentes à molécula de Imipramina, atribuídos através de seu espectro de absorção na região do infravermelho:

| Região (cm^{-1}) | Provável Atribuição |
|-----------------------------|------------------------------|
| 3439 | ν (N-H) |
| 2924 | ν (C-H) sim*. e assim**. |
| | ν (C-N) |
| 2644 | ν (N-H) |
| 2470 | ν (N-H) |
| 1591 | Vibrações (C=C) |
| | δ (N-H) |
| 1485 | δ (C-H) |
| 1443 | ν (C=C) |
| 1225 | ν (C-N) |
| 769 e 744 | δ (C-H) |

**sim. simétrico*

***assim. assimétrico*

Uma vez caracterizadas as principais bandas de absorção na região do infravermelho para a molécula de Imipramina livre, a comparação qualitativa entre esse espectro de FT-IR e o espectro da β CD com os àqueles referentes aos compostos de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/IMI e de suas misturas mecânicas, é imprescindível para sugerir uma possível estrutura para o complexo de inclusão formado.

Desta forma, na Figura 4.8 estão apresentados os espectros de infravermelho para o sistema 1:1 β CD/IMI e ainda para a molécula hóspede

(IMI) e hospedeira (β CD). Observa-se, através da simples comparação entre o espectro da IMI e o espectro do CI, uma redução no número de bandas deste último. Desta maneira, pode-se dizer que o espectro do complexo de inclusão não é simplesmente a sobreposição dos espectros dos compostos livres, sugerindo a interação efetiva entre as espécies. As principais alterações, nos modos vibracionais observadas no espectro de FT-IR para o CI, ocorreram nas regiões de: 2924 cm^{-1} referentes aos estiramentos (C-H) simétricos e assimétricos e aos estiramentos (C-N) de amins terciárias protonadas, $2785 - 2295\text{ cm}^{-1}$ referente aos estiramentos (N-H) de amins protonadas, $1530 - 1200\text{ cm}^{-1}$, aproximadamente, referente a alguns modos vibracionais de deformação e estiramento dos anéis aromáticos (C-H) e (C=C) e por último os modos em 769 e 744 cm^{-1} também referente à anéis aromáticos dissubstituídos, com quatro átomos de hidrogênio adjacentes.

Além disso, um afilamento na região referente aos estiramentos (O-H) e (C-O-C) da β CD também foram observados, uma vez que estes modos vibracionais são comparados com o espectro da β CD livre. Este fenômeno é atribuído à redução no número de ligações de hidrogênio após a saída das moléculas de água do interior da cavidade que são substituídas pela inclusão da molécula hóspede [2]. Todas estas modificações nos modos vibracionais do complexo de inclusão indicam uma interação entre a Imipramina e a β CD, principalmente através dos anéis aromáticos, que não descartam algum tipo de interação puramente eletrostática entre o grupo amino carregado, pertencente à região alifática da molécula, com as regiões de alta densidade eletrônica da β CD, como por exemplo, as hidroxilas primárias e secundárias da parte externa do cone.

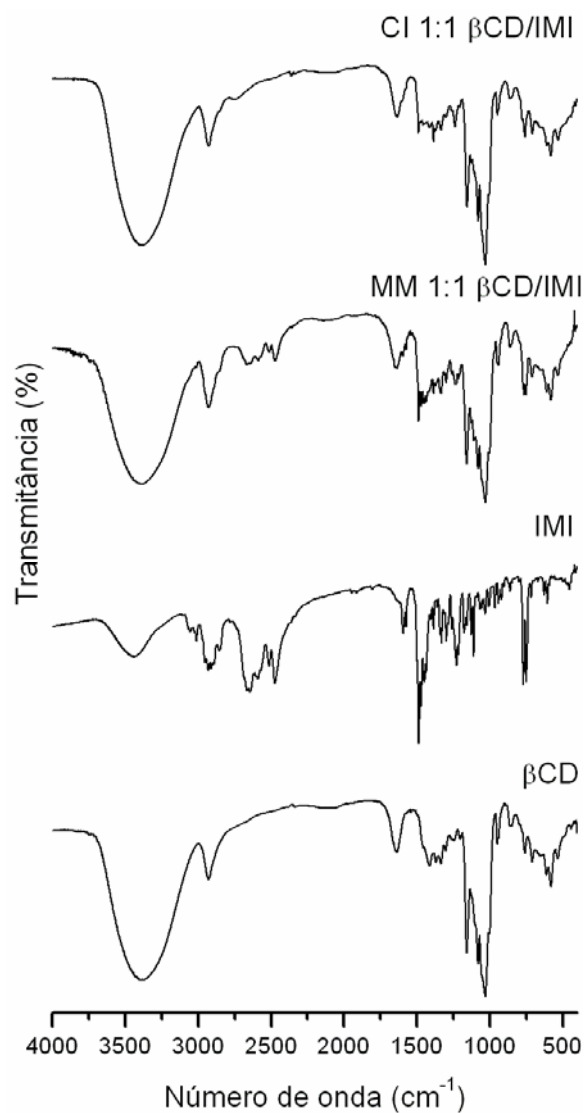


Figura 4.8: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β CD, IMI, mistura mecânica 1:1 β CD/IMI e composto de inclusão 1:1 β CD/IMI, em KBr na região entre 4000 – 400 cm⁻¹.

Com a finalidade de monitorar a variação nos modos vibracionais para este sistema supramolecular formado entre a β CD e a IMI à razão molar de 2:1 β CD/IMI, este composto de inclusão foi preparado e seu espectro de infravermelho obtido em pastilha de KBr, assim como o espectro de sua mistura mecânica, Figura 4.9.

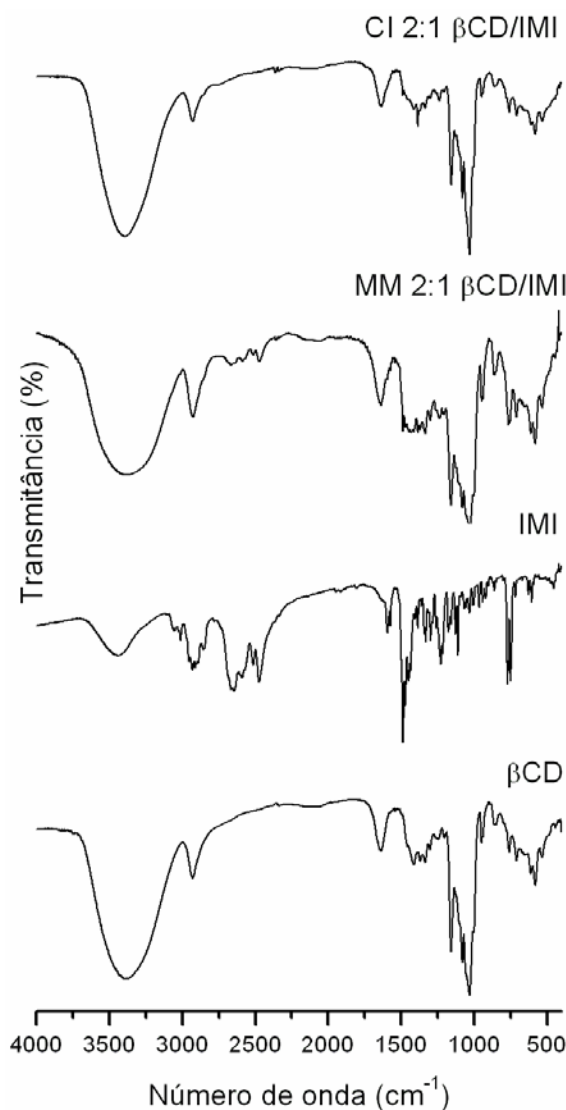


Figura 4.9: Espectro de absorção na região do infravermelho para a β CD, IMI, mistura mecânica 2:1 β CD/IMI e composto de inclusão 2:1 β CD/IMI, em KBr na região entre 4000 – 400 cm^{-1} .

Da mesma forma como observado para o sistema 1:1, no sistema 2:1 β CD/IMI, uma redução no número de estiramentos e deformações para o composto de inclusão foi verificado. Este fenômeno indica uma menor mobilidade das estruturas moleculares da β CD e IMI livres, quando comparadas com essas moléculas após o processo de complexação, sugerindo assim uma interação efetiva entre as espécies no estado sólido.

Analisando o espectro de infravermelho para o composto de inclusão, as principais regiões que sofreram modificações nos modos vibracionais foram: 2924 cm^{-1} referentes a estiramentos (C-H) simétricos e assimétricos e a estiramentos (C-N) de aminas terciárias, 2785 – 2295 cm^{-1} referente aos estiramentos (N-H) de aminas protonadas, entre 1500 e 1200 cm^{-1} referente aos modos dos estiramentos e deformações dos anéis aromáticos, bem como as duas deformações (C-H) em 769 e 744 cm^{-1} , referente a anéis dissubstituídos, que foram praticamente suprimidas do espectro de infravermelho. Essa supressão das bandas de infravermelho da IMI após a complexação com a β CD sugere uma forte interação entre as espécies no estado sólido.

Além das observações já mencionadas para as bandas de infravermelho da IMI no complexo de razão molar 2:1 β CD/IMI, modificações como o afilamento dos estiramentos (O-H) e (C-O-C) referente à β CD foram observadas para o CI e estas alterações estão relacionadas com a saída das moléculas de água do interior da cavidade da β CD para a inclusão dos anéis aromáticos da Imipramina [2, 3].

De forma contrária ao ocorrido para os complexos de inclusão com a Fluoxetina, para os dois sistemas supramoleculares formados entre a β CD e a IMI e analisados por infravermelho, as misturas mecânicas não apresentaram espectros com perfil semelhante aos dos compostos de inclusão. Estes resultados sugerem a eficácia do processo de preparação dos complexos, através do método de liofilização.

FTIR-HATR

Embora os espectros de infravermelho das misturas mecânicas para os dois sistemas 1:1 e 2:1 β CD/IMI não tenham se assemelhado com seus respectivos espectros de FT-IR dos complexos de inclusão, a análise dos modos vibracionais destes compostos de inclusão também foi conduzida em solução aquosa através da técnica de FTIR-HATR.

Para a Imipramina livre os espectros de reflectância atenuada, a diferentes concentrações, se encontram apresentados na Figura 4.10. De forma equivalente ao observado para a β CD livre e também para a FLU (Capítulo 3), os espectros de FTIR-HATR para a IMI não apresentaram mudanças de deslocamento de suas bandas e de perfil, durante o processo de diluição para a região entre 1600 a 800 cm^{-1} . Os modos vibracionais observados no espectro de FTIR-HATR para a IMI livre, na região de 1600 e 800 cm^{-1} , foram destacados na Figura 4.10.

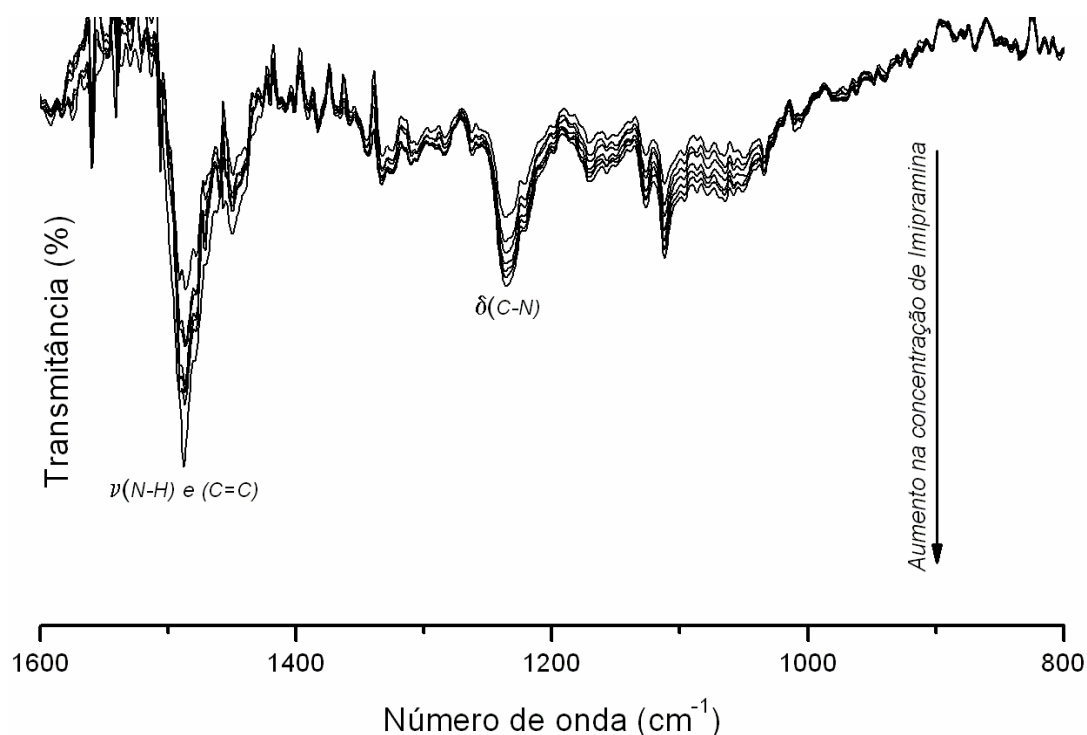


Figura 4.10: Espectro de FTIR-HATR para a IMI em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm^{-1} , após subtração do espectro da água.

Da mesma forma que para o sistema supramolecular β CD/FLU, os espectros de FTIR-HATR para a IMI e seus complexos de inclusão encontram-se subtraídos do espectro da água pura, usado como branco.

Uma vez caracterizado o espectro de FTIR-HATR para a Imipramina livre, os espectros de reflectância atenuada em solução aquosa para os compostos de inclusão, a diferentes razões molares entre a IMI e a β CD, foram obtidos e estão apresentados na Figura 4.11. De forma a facilitar a comparação entre os espectros de FTIR-HATR para a β CD, IMI e seu complexo de inclusão, a Figura 4.12 foi criada, onde a concentração das espécies é de: β CD 6,5 mM, IMI 16,5 mM e seu respectivo complexo de inclusão, no qual a concentração da β CD é de 6,5 mM e de IMI 16,5 mM. A comparação quantitativa entre as intensidades para os modos vibracionais observados nessa região do espectro,

só pode ser feita uma vez que o composto de inclusão apresenta a mesma concentração dos compostos livres.

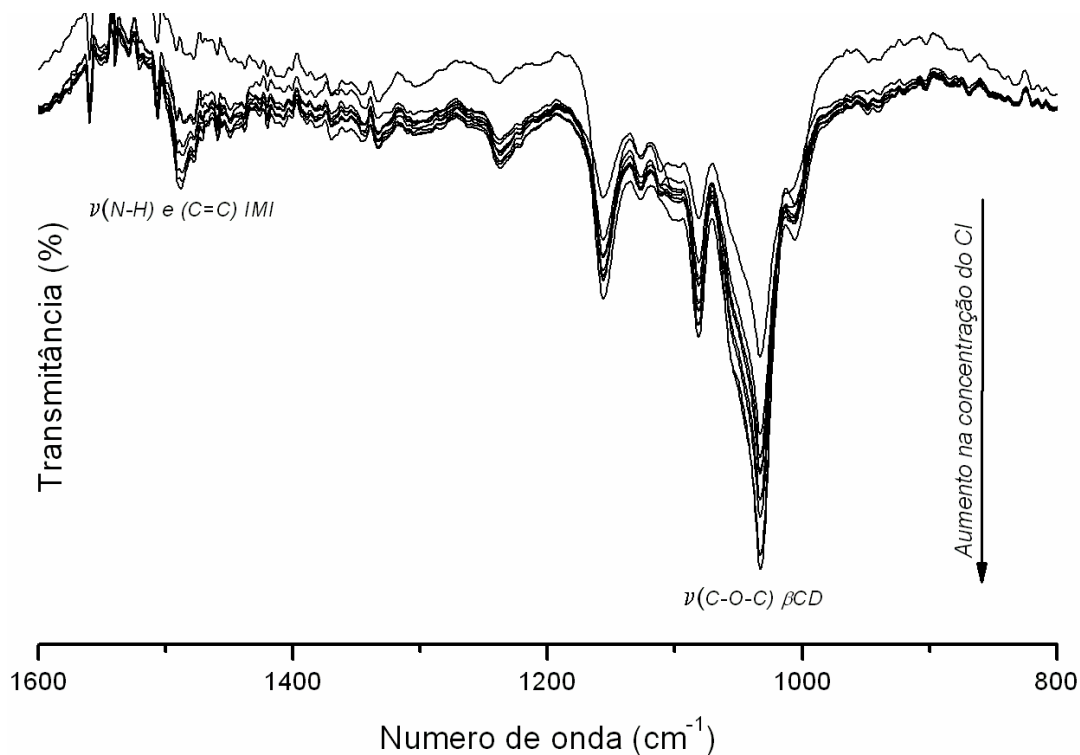


Figura 4.11: Espectro de FTIR-HATR para o composto de inclusão entre a β CD e a IMI em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm^{-1} , após subtração do espectro da água.

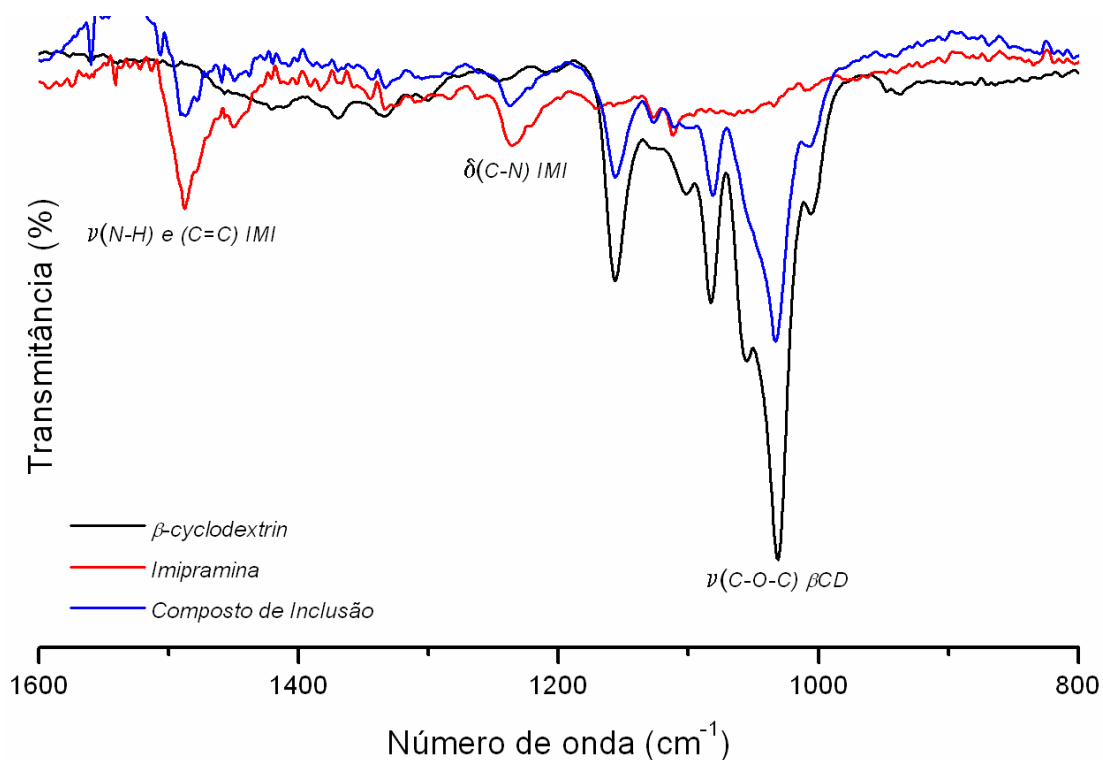


Figura 4.12: Espectro de FTIR-HATR para a βCD (6,5 mM), IMI (16,5 mM) e o respectivo composto de inclusão em solução aquosa na região entre 1600 a 800 cm^{-1} , após subtração do espectro da água.

Comparando esses três espectros de reflectância atenuada (βCD , IMI e CI), pode ser observada uma redução na intensidade dos modos referentes aos estiramentos (N-H) e (C=C) em aproximadamente 1500 cm^{-1} , referente à molécula de Imipramina. Além disso, da mesma forma como observado para o sistema supramolecular formado entre a Fluoxetina e a βCD , uma significativa redução na intensidade do estiramento (C-O-C) referente à βCD , em 1030 cm^{-1} foi verificada.

Essas reduções de intensidade, tanto dos sinais da IMI quanto da βCD , indicam que estas espécies estão interagindo em solução principalmente através dos anéis aromáticos da IMI e a cavidade da βCD . A caracterização da

complexação através da intensidade dos sinais só pode ser feita através da técnica de FTIR-HATR em solução, uma vez que esta análise é quantitativa. E da mesma forma que no estado sólido, a redução na intensidade dos modos vibracionais está relacionada com a menor mobilidade das moléculas após a complexação com a ciclodextrina. Além disso, para o estiramento (C-O-C) da β CD, a redução em intensidade é explicada pela redução no número de ligações de hidrogênio após a saída das moléculas de água do interior da cavidade, com conseqüente inclusão da molécula hóspede através dos anéis aromáticos [2].

A técnica de FTIR-HATR em solução aquosa foi utilizada também para os experimentos de Job, ou método da variação contínua da concentração dos componentes, que permite determinar a estequiometria do sistema supramolecular formado através do monitoramento da variação de alguma propriedade física ou química de um dos componentes do sistema [4, 5]. Da mesma forma como para o sistema β CD/FLU, no sistema β CD/IMI o parâmetro utilizado como sonda para investigar o processo de complexação e construir a curva de Job, foi o estiramento (C-O-C) da β -ciclodextrina em aproximadamente 1030 cm^{-1} . As concentrações iniciais dos compostos puros utilizadas na titulação foram de 10,0 mM, e a concentração de cada componente variou de 0,5 mM a 9,5 mM (com incrementos de 0,5 mM), mantendo a concentração final da solução em 10,0 mM.

A curva de Job para a para o sistema supramolecular β CD/IMI, bem como o ajuste linear que indica as inflexões da curva estão apresentados na Figura 4.13.

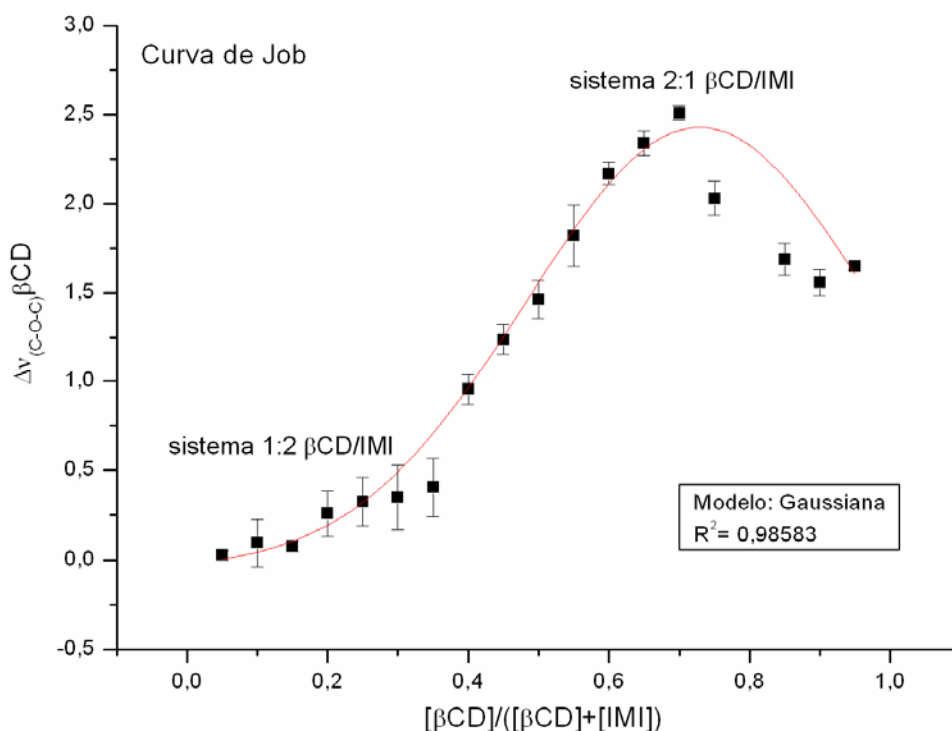


Figura 4.13: Curva de Job correspondente à variação de intensidade referente ao $\nu_{(C-O-C)}$ da β CD por FTIR-HATR para o sistema β CD/IMI.

Pode-se sugerir através da curva de Job para o complexo supramolecular β CD/IMI, que este apresenta pelo menos dois sistemas com estequiometrias distintas que coexistem em solução. Um primeiro sistema no qual a fração molar é equivalente a 0,35 corresponde a sistemas do tipo 1:2 β CD/IMI. A existência dessa espécie em solução é razoável, uma vez que há predominância de moléculas de Imipramina em solução. O outro ponto de inflexão da curva, e também ponto de máximo, está localizado na região de fração molar equivalente a 0,70 correspondendo a sistemas do tipo 2:1 β CD/IMI. A existência deste tipo de complexo é bastante favorável uma vez que a molécula de Imipramina é praticamente simétrica, logo os dois anéis aromáticos existentes na IMI são suscetíveis à inclusão na cavidade da β -

ciclodextrina. Além disso, a concentração de β CD nesse ponto da titulação é bem superior à de IMI.

Desta forma, conclui-se que há a possibilidade de existir em solução equilíbrios múltiplos formados entre a β CD e a IMI. Um desses sistemas ocorre quando há excesso de IMI, favorecendo sistemas do tipo 1:2 β CD/IMI e quando há excesso de β CD, complexos do tipo 2:1 β CD/IMI ocorrem preferencialmente. Isso indica que a predominância de uma das espécies em solução pode favorecer um ou outro complexo, conforme sugerido na Figura 4.14. O fato de ocorrerem inflexões na curva de Job indica que as espécies interagem efetivamente em solução aquosa.

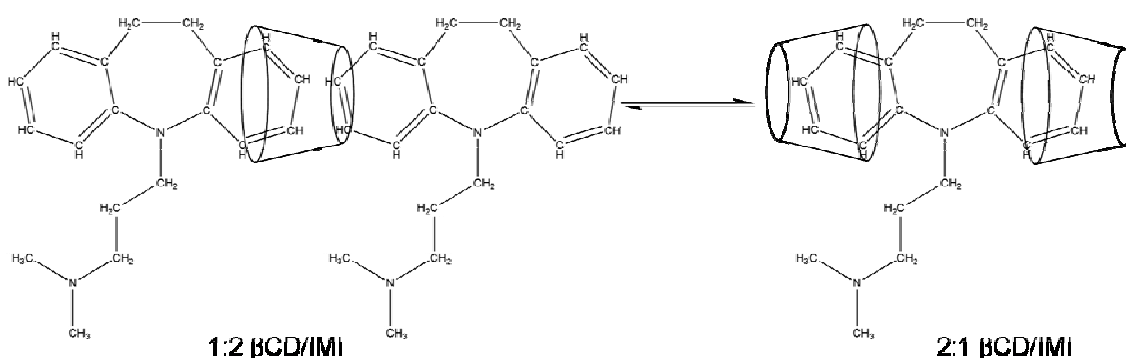


Figura 4.14: Representação esquemática dos possíveis sistemas que coexistem em solução formados entre a β CD e a IMI.

4.3 – Ressonância Magnética Nuclear:

RMN

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada com a finalidade de caracterizar estruturalmente a molécula de Imipramina, bem como determinar sua pureza. Com esse intuito, técnicas unidimensionais como: ^1H ,

^{13}C e DEPT-135 e ainda técnicas bidimensionais, COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, HSQC $^1\text{H}/\text{DEPT-135}$, HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ e NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ foram utilizadas. O caráter complementar destas técnicas de RMN possibilitou a caracterização não só dos hidrogênios da molécula, mas também de seus carbonos.

Na Figura 4.15 pode ser observado através do espectro de ^1H de RMN que a soma de todas as integrais dos hidrogênios é equivalente ao número de hidrogênios da molécula, indicando assim a pureza do material utilizado na preparação dos complexos de inclusão. A pureza da Imipramina já havia sido constatada, também, através de sua curva DSC, que apresentou o evento característico à fusão a temperatura de $157\text{ }^\circ\text{C}$.

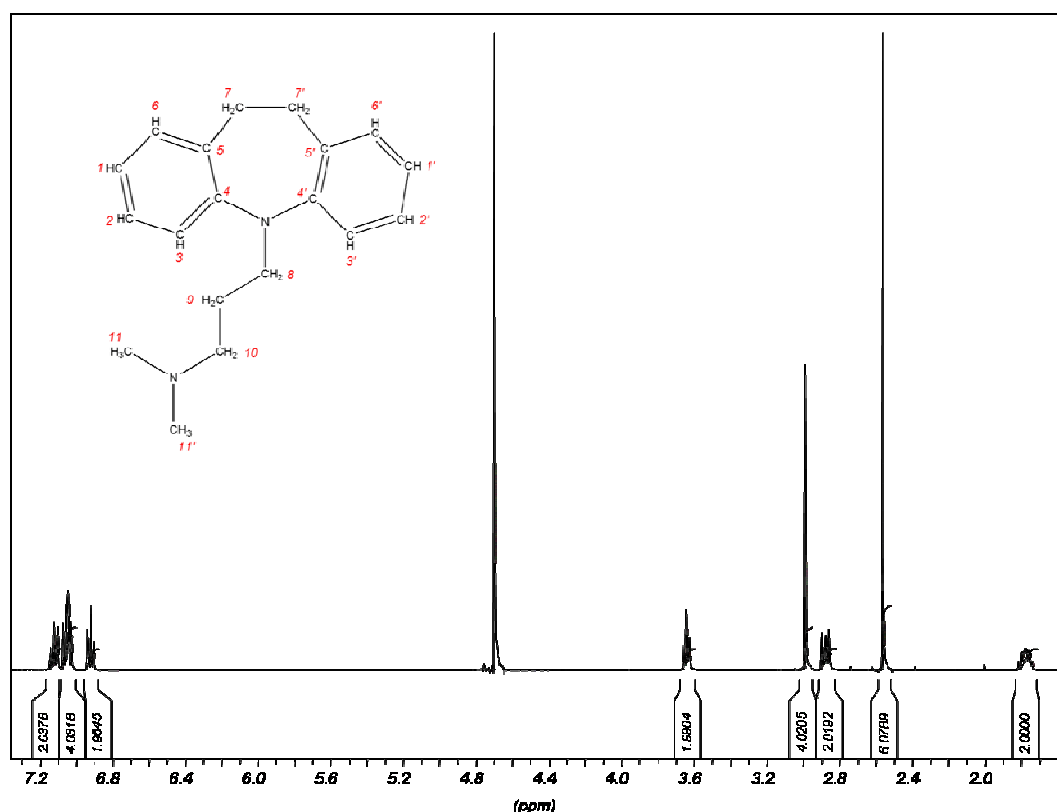


Figura 4.15: Espectro de RMN de ^1H da Imipramina a 400 MHz em D_2O .

A atribuição dos respectivos hidrogênios, para a molécula de Imipramina, pode ser observada através das Figuras 4.16 e 4.17, onde são apresentadas duas expansões do espectro de RMN de ^1H em D_2O para esta molécula. Os valores de deslocamento químico, para cada hidrogênio da molécula de Imipramina, estão relatados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios da Imipramina, a 400 MHz em D_2O .

| ^1H | 1/1' | 2/2' | 3/3' | 6/6' | 7/7' | 8 | 9 | 10 | 11/11' |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| δ (ppm) | 6,92 | 7,12 | 7,03 | 7,06 | 2,99 | 3,64 | 1,77 | 2,87 | 2,56 |

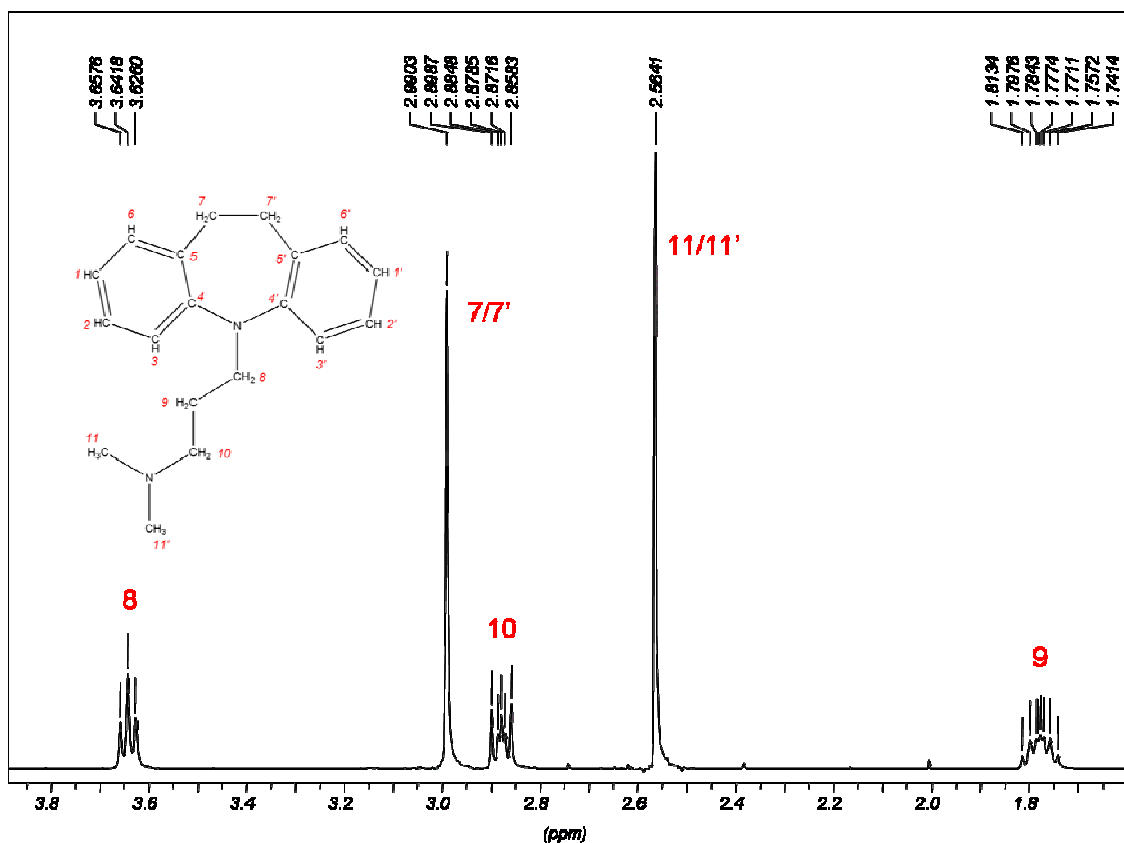


Figura 4.16: Expansão do espectro de RMN de ^1H da Imipramina para a região de δ entre 1,70 a 3,80.

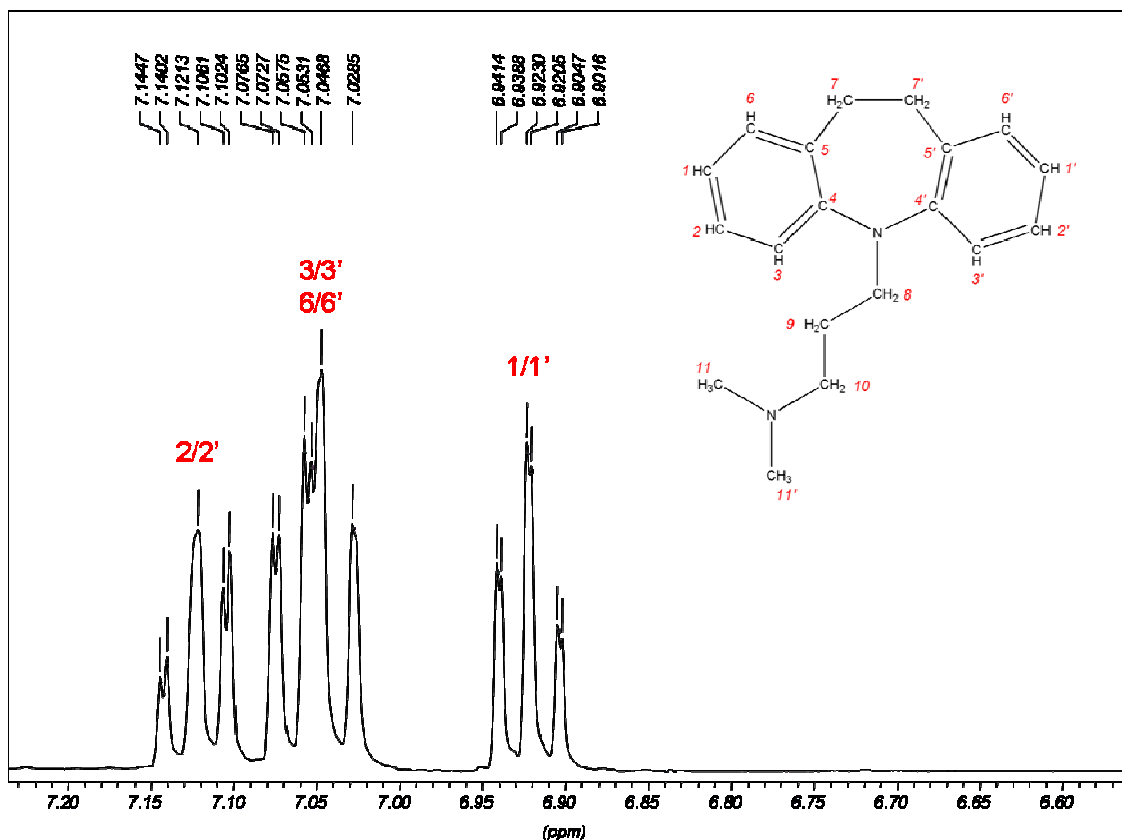


Figura 4.17: Expansão do espectro de RMN de ^1H da Imipramina para a região de δ entre 6,60 a 7,20.

A atribuição completa dos hidrogênios para a molécula de Imipramina só foi possível com o auxílio dos experimentos bidimensionais como HSQC $^1\text{H}/\text{DEPT-135}$ e HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ [6] que permitem avaliar correlações heteronucleares e ainda com a utilização dos experimentos COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ e NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$, que permitem verificar correlações escalares e dipolares respectivamente [6]. Esta atribuição para os hidrogênios corrige aquela já apresentada na literatura [7], na qual a incoerência é observada para os deslocamentos químicos dos anéis aromáticos.

Desta forma, através dos experimentos de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, Figura 4.18, foi possível verificar correlações escalares entre os hidrogênios da região alifática da molécula, como: correlações entre H9/H10 e H9/H8. Para os hidrogênios

H11/H11' (-CH₃) e também para os hidrogênios H7/H7' (-CH₂) nenhuma correlação escalar foi observada como esperado.

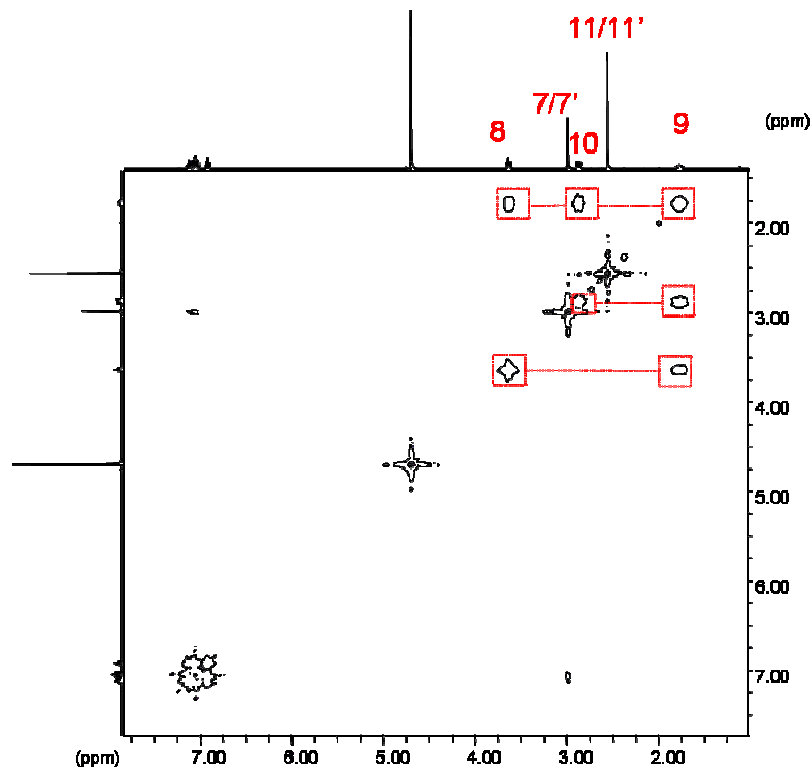


Figura 4.18: Expansão do mapa de contorno COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ para a Imipramina a 400 MHz, em D₂O.

De modo a verificar as possíveis correlações dipolares para a molécula de IMI, experimentos de NOESY foram realizados, Figura 4.19. Através de seu mapa de contorno NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ é possível observar correlações entre a região alifática da molécula com sua parte aromática, evidenciando o deslocamento químico dos hidrogênios pertencentes aos carbonos, H8, H9 e H10 (-CH₂). Tendo em vista que as respectivas intensidades das manchas de correlação dipolar estão relacionadas com a proximidade espacial dos hidrogênios [6], este fato pode sugerir as atribuições dos hidrogênios H8, H9 e H10.

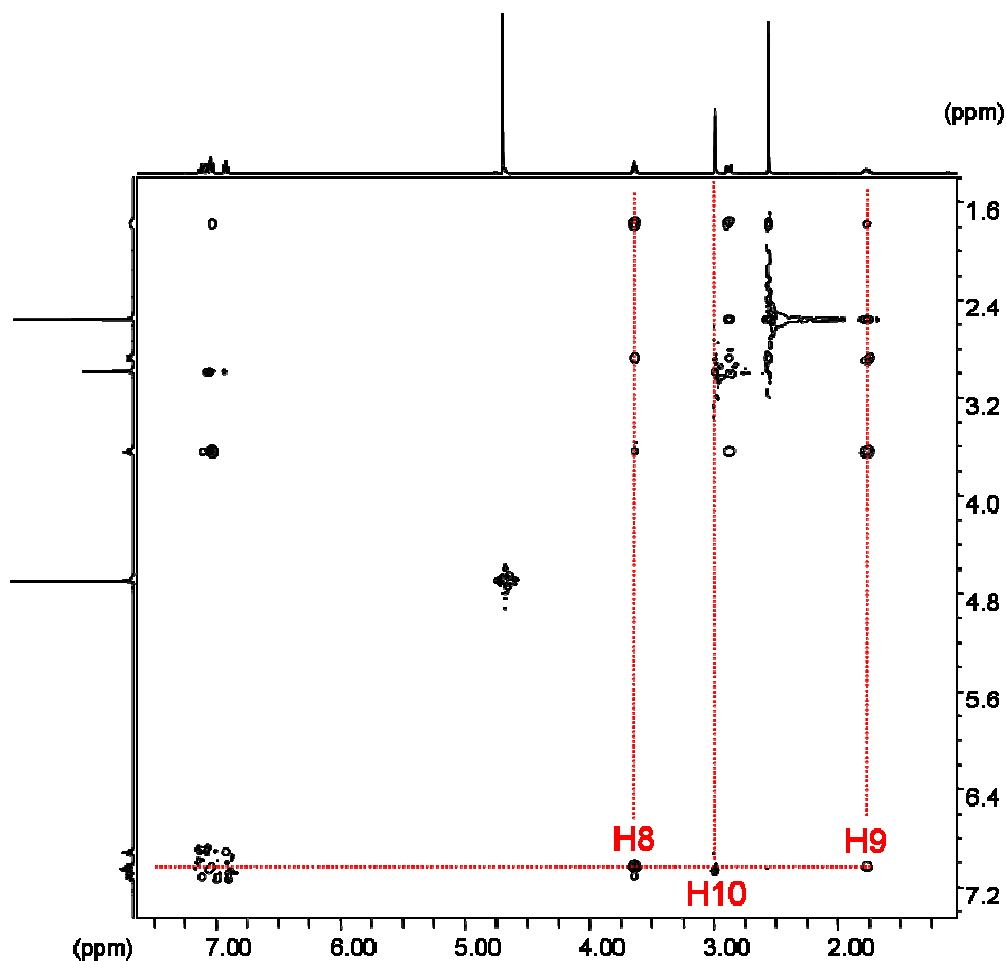


Figura 4.19: Expansão do mapa de contorno NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ para a Imipramina a 400 MHz, em D_2O .

Analisando o espectro de ^{13}C -DEPT-135, Figura 4.20, foi possível determinar a posição do carbono C11/11'. Sendo assim, a partir do mapa de contorno HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135, Figura 4.21, os valores de deslocamento químico para os hidrogênios H11/11' puderam ser determinados através das correlações heteronucleares presentes.

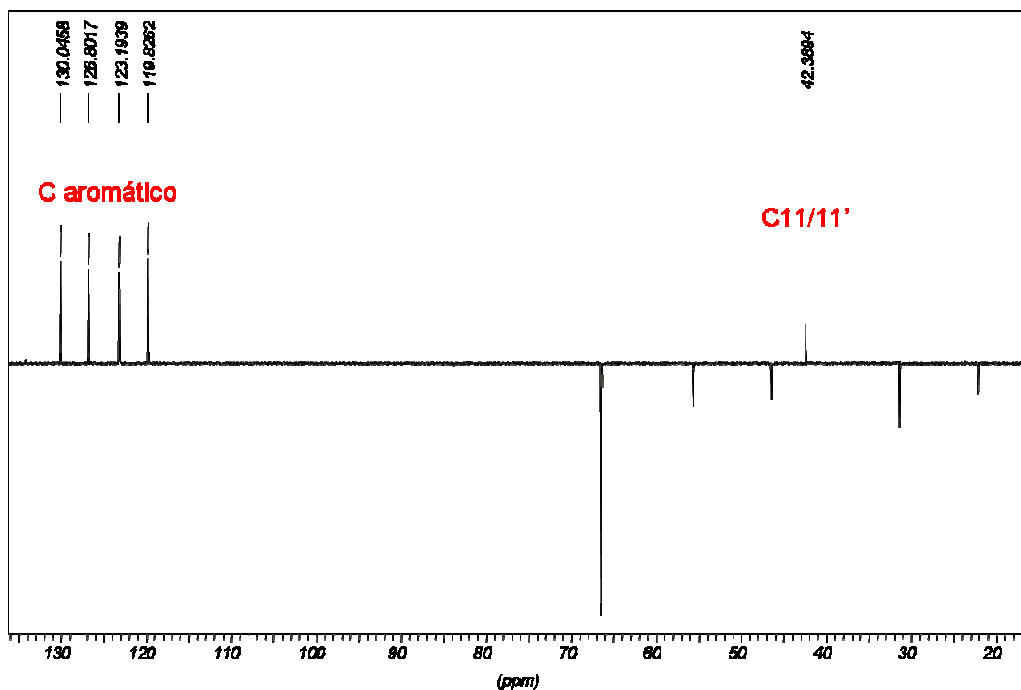


Figura 4.20: RMN de ^{13}C -DEPT 135 para a Imipramina a 400 MHz em D_2O .

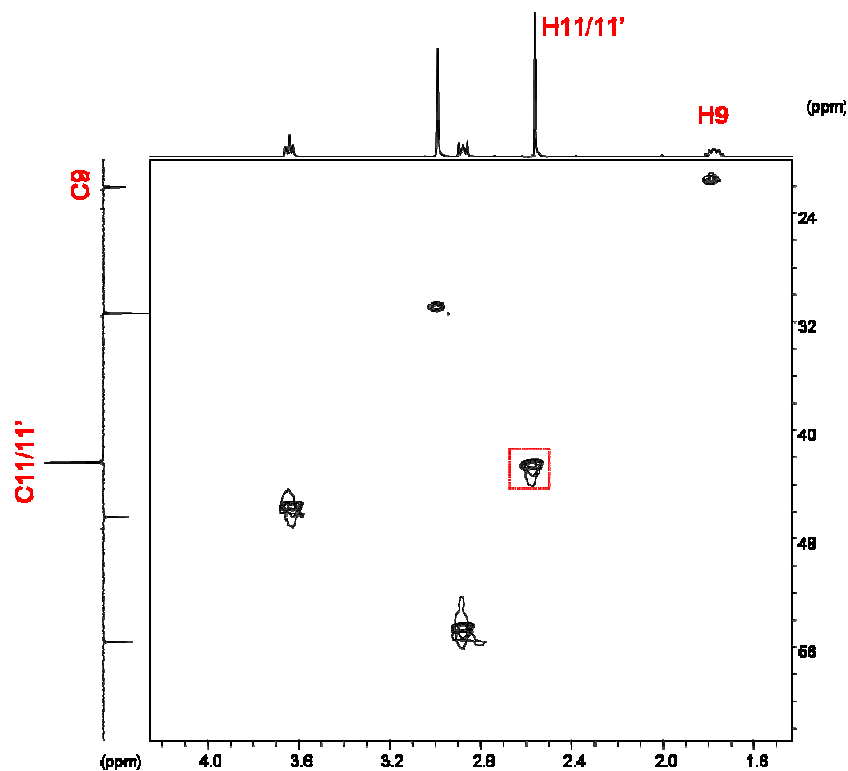


Figura 4.21: Expansão do mapa de contorno HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para a Imipramina a 400 MHz em D_2O .

O experimento decisivo para determinar o deslocamento químico, tanto dos hidrogênios alifáticos H8, H9 e H10 (-CH₂) quanto dos hidrogênios aromáticos (-CH), foi o HMBC ¹H/¹³C, Figuras 4.22 e 4.23.

A partir da expansão do mapa de contorno HMBC ¹H/¹³C, Figura 4.22, podem ser observadas correlações heteronucleares (H-C) a longa distância entre os hidrogênios: H1 e os carbonos C3 e C5, H2 com os carbonos C6 e C4, entre os hidrogênios H6/6' com os carbonos C2 e C4 e por último, correlações entre os hidrogênios H3/3' com C1 e C5.

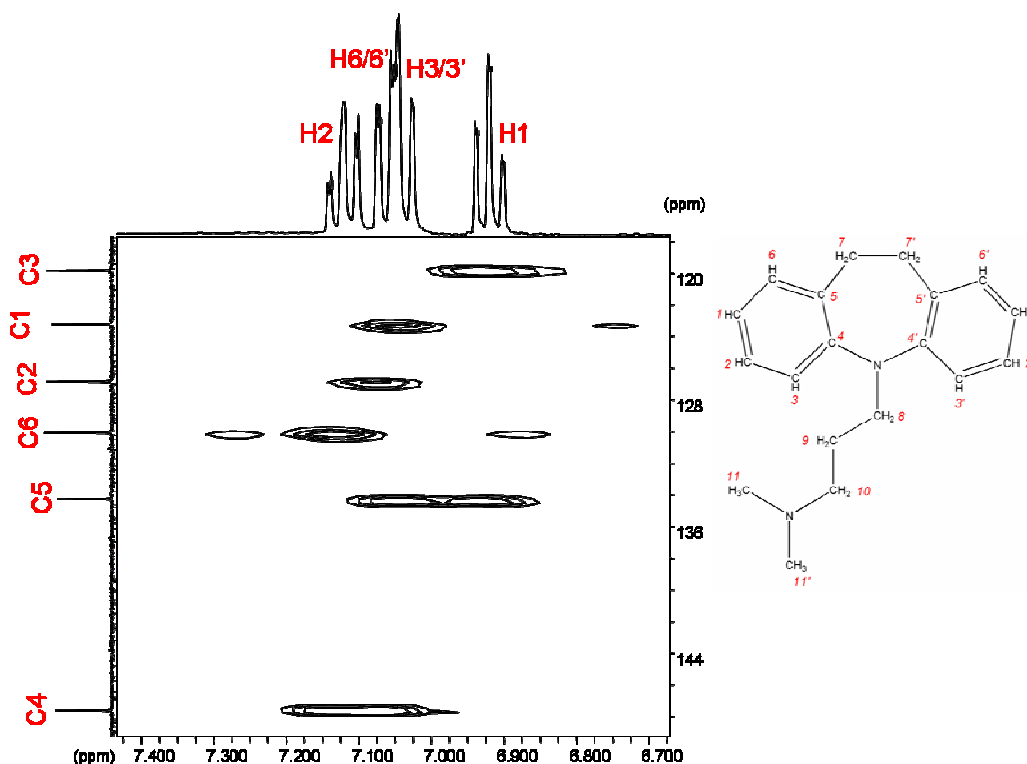


Figura 4.22: Expansão do mapa de contorno HMBC ¹H/¹³C para a Imipramina a 400 MHz em D₂O.

Na expansão apresentada na Figura 4.23, nenhuma correlação entre o hidrogênio atribuído H10 é observada com carbonos da região aromática, confirmando assim sua atribuição. Para confirmar o deslocamento químico dos

hidrogênios H7/7' foram observadas correlações entre estes hidrogênios e os carbonos aromáticos C4/4',C5/5' e C6/6'. Para o hidrogênio H8 foi observada uma única correlação com carbonos da região aromática, com o C4.

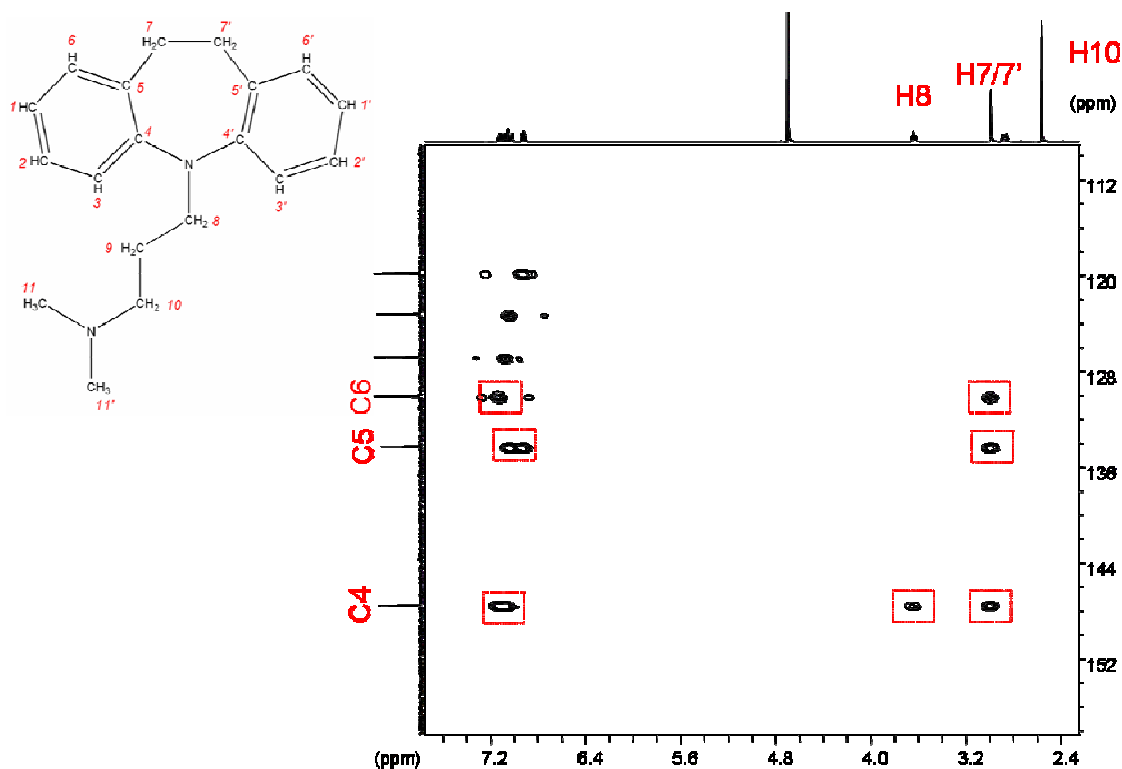


Figura 4.23: Expansão do mapa de contorno HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a Imipramina a 400 MHz em D_2O .

Com a utilização de todos os experimentos de RMN foi possível fazer uma atribuição completa dos hidrogênios da molécula de Imipramina, como apresentado na Tabela 4.2, corrigindo àquela já descrita na literatura [7].

Além disso, foi possível fazer também a atribuição completa dos carbonos da molécula e a assinalação de seus valores de deslocamento, os quais se encontram apresentados no próprio espectro de RMN de ^{13}C , Figura 4.24.

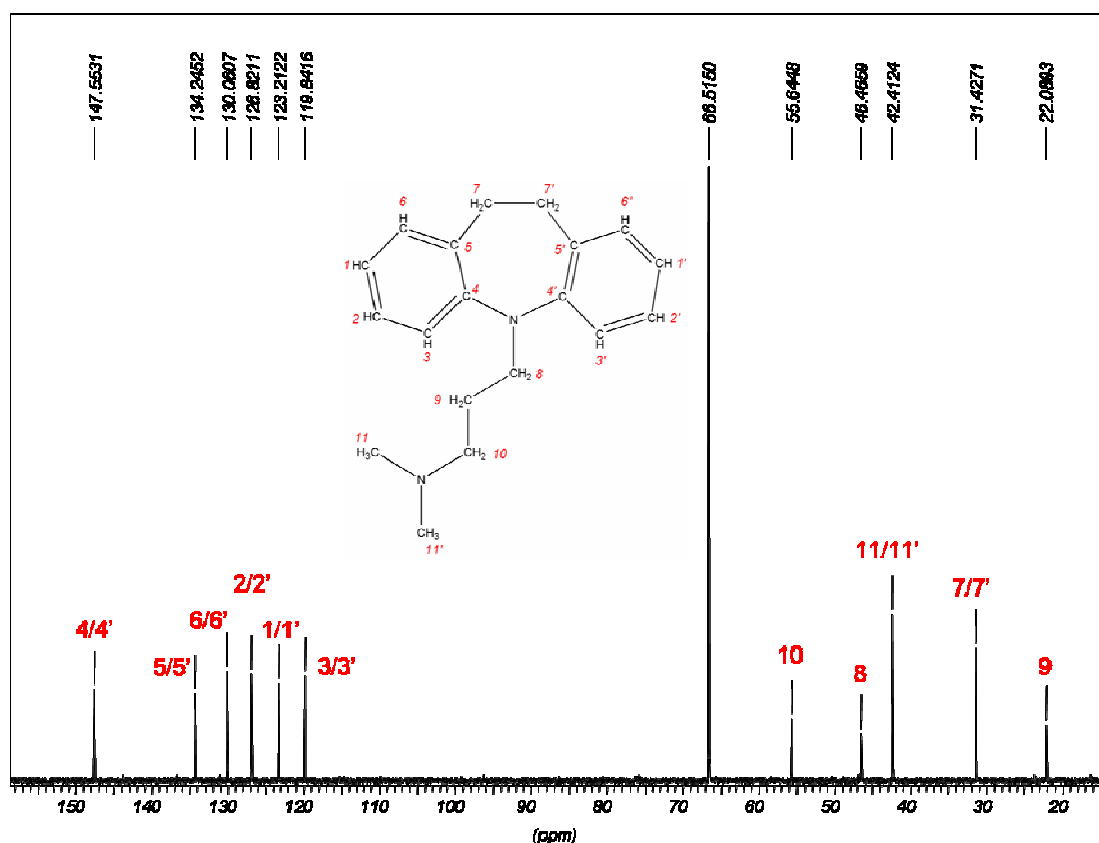


Figura 4.24: Espectro de RMN de ^{13}C para a Imipramina a 400 MHz em D_2O .

Uma vez realizada a atribuição completa dos sinais de RMN de hidrogênio e carbono para a molécula de Imipramina, a preparação e caracterização estrutural, por RMN dos complexos de inclusão 1:1 e 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ foi executada.

Para os sistemas supramoleculares $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ 1:1 e 2:1, as principais mudanças nos sinais de RMN de ^1H ocorreram na região referente aos hidrogênios aromáticos, Figura 4.25a e 4.25b. Entretanto, não foi verificada uma variação de deslocamento gradativa para esses hidrogênios aromáticos, durante o processo de titulação conduzida por RMN, do mesmo modo como foi observado para o sistema $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ (Capítulo 3).

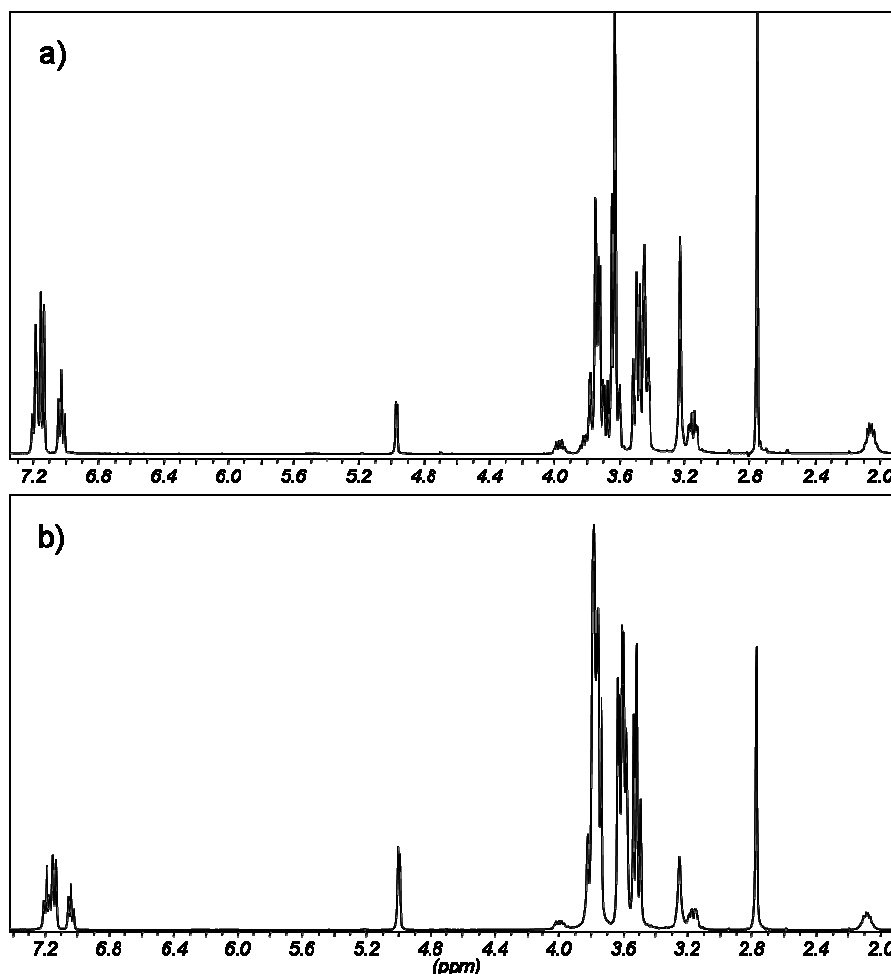


Figura 4.25: Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em D_2O : a) CI 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e b) CI 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$.

Na Figura 4.26 é apresentada a região aromática do espectro de RMN de ^1H para a Imipramina livre e complexada com βCD , nas razões molares de 1:1 e 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$. Analisando as expansões dos espectros de RMN de ^1H é possível verificar um afinamento das linhas espectrais de ressonância para todos os hidrogênios aromáticos da Imipramina na presença de βCD . Isso sugere que o antidepressivo tricíclico complexado com βCD apresenta uma menor mobilidade de seus hidrogênios em solução [8]. Além disso, uma variação no deslocamento químico, para esses hidrogênios da região

aromática é observada, sugerindo sua interação com a cavidade da β -ciclodextrina. Todas essas modificações nas linhas espectrais de ressonância para os compostos de inclusão estão relacionadas às mudanças de densidade eletrônica desta região da molécula de Imipramina, indicando esta região da molécula do antidepressivo como sítio preferencial para a inclusão na cavidade da β CD [9-11].

Uma vez que o número de sinais de ressonância, para esta região da molécula, não foi alterado, embora tenha ocorrido uma sobreposição desses sinais, pode-se dizer que a equivalência desses hidrogênios não foi modificada, indicando uma interação da ciclodextrina com ambos anéis aromáticos da Imipramina. Este resultado está de acordo com aquele obtido através do experimento de Job, conduzidos por FTIR-HATR, onde sistemas do tipo 2:1 β CD/IMI foram observados quando a concentração de ciclodextrina na solução é superior à concentração de Imipramina.

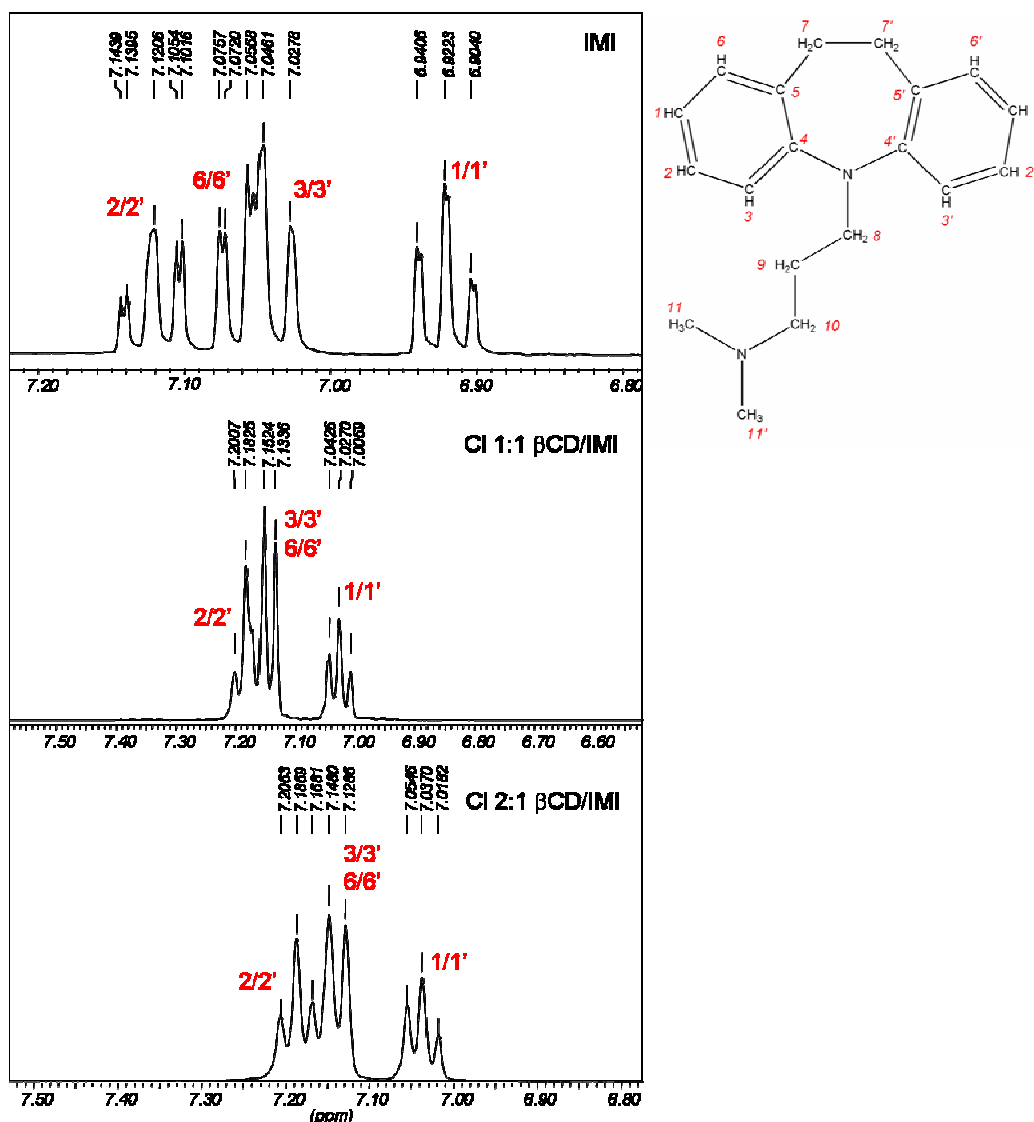


Figura 4.26: Expansão do espectro de RMN de ^1H , a 400 MHz em D_2O para a IMI, CI 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ e CI 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ na região de $\delta = 6,60 - 7,50$.

De modo a comparar quantitativamente as variações de deslocamento químico observadas para todos os hidrogênios da IMI em presença de βCD , nas razões molares de 1:1 e 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, a Tabela 4.3 foi criada, na qual as $\Delta\delta$ são apresentadas.

Analisando as variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) apresentadas na Tabela 4.3, é verificada uma maior variação no deslocamento químico para os

hidrogênios alifáticos do que para os aromáticos, independente da razão molar do sistema. Esta constatação pode ser explicada pela possível interação entre a parte alifática da molécula de IMI com a ciclodextrina. Entretanto um afilamento das linhas de ressonância para esses hidrogênios alifáticos não foi observado no espectro de RMN de ^1H para os compostos de inclusão e sim, um alargamento dessas linhas espectrais foi verificado. Este alargamento de sinais de ressonância está relacionado com a maior mobilidade da cadeia alifática, o que é esperado uma vez que ligações simples, do tipo sp^3 , possuem rotações mais livres do que os anéis aromáticos.

Tabela 4.3: Valores de deslocamento químico para os hidrogênios da IMI, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/IMI, a 400 MHz em D_2O .

| Hidrogênios | δ IMI | δ IC 1:1 | $\Delta\delta^a$ IC 1:1 | δ IC 2:1 | $\Delta\delta^b$ IC 2:1 |
|-------------|--------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| 1/1' | 6,92 | 7,03 | -0,11 | 7,04 | -0,12 |
| 2/2' | 7,12 | 7,19 | -0,07 | 7,19 | -0,07 |
| 3/3' | 7,04 | 7,16 | -0,12 | 7,14 | -0,10 |
| 6/6' | 7,06 | 7,16 | -0,10 | 7,14 | -0,08 |
| 7/7' | 2,99 | 3,23 | -0,24 | 3,25 | -0,26 |
| 8 | 3,64 | 3,97 | -0,30 | 4,00 | -0,36 |
| 9 | 1,78 | 2,06 | -0,28 | 2,08 | -0,30 |
| 10 | 2,88 | 3,15 | -0,27 | 3,17 | -0,29 |
| 11/11' | 2,56 | 2,75 | -0,19 | 2,77 | -0,21 |

$$^a\Delta\delta = \delta \text{IMI} - \delta \text{1:1 } \beta\text{CD/IMI}$$

$$^b\Delta\delta = \delta \text{IMI} - \delta \text{2:1 } \beta\text{CD/IMI}$$

Com a finalidade de verificar esta mobilidade apresentada pelos hidrogênios da molécula de Imipramina, tanto na presença de β CD quando em sua ausência, os experimentos de tempo de relaxação longitudinal foram

conduzidos, para a IMI e os sistemas supramoleculares 1:1 e 2:1 β CD/IMI. Os valores de T_1 , assim como as ΔT_1 para cada sistema estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Valores de T_1 para a IMI, composto de inclusão 1:1 e 2:1 β CD/IMI e a variação de T_1 (ΔT_1) para cada sistema.

| Hidrogênios | T_1/s IMI | T_1/s IC 1:1 | $\Delta T_1/s^a$ | T_1/s IC 2:1 | $\Delta T_1/s^b$ |
|-------------|-------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1/1' | 1,76 | --- | | --- | |
| 2/2' | 1,67 | 1,03 | 0,64 | 1,09 | 0,58 |
| 3/3' | --- | --- | | --- | |
| 6/6' | --- | --- | | --- | |
| 7/7' | 0,62 | 0,38 | 0,24 | 0,38 | 0,24 |
| 8 | 0,37 | 0,23 | 0,14 | 0,24 | 0,13 |
| 9 | 0,50 | 0,33 | 0,17 | 0,32 | 0,18 |
| 10 | 0,64 | 0,41 | 0,23 | 0,40 | 0,24 |
| 11/11' | 0,91 | 0,68 | 0,23 | 0,76 | 0,15 |

^a $\Delta T_1/s = T_1/s$ IMI - T_1/s IC 1:1

^b $\Delta T_1/s = T_1/s$ IMI - T_1/s IC 2:1

--- sobreposição dos sinais

Os dados obtidos para os experimentos de T_1 evidenciam uma maior redução do tempo de relaxação para os hidrogênios H2/2' pertencentes aos anéis aromáticos, para os dois sistemas 1:1 e 2:1 β CD/IMI investigados. A sobreposição dos sinais de hidrogênio H1/1', H3/3' e H6/6', presentes nos anéis aromáticos, inviabiliza suas medidas de T_1 . Entretanto, para os demais hidrogênios da molécula de Imipramina, a medida de T_1 foi possível.

Analisando a Tabela 4.4 é observada uma menor variação de T_1 para os demais hidrogênios da IMI, na presença de β CD, do que aquela verificada para

os hidrogênios H2/2'. Essa redução no tempo de relaxação evidencia, mais uma vez, a preferência da ciclodextrina pela região aromática da molécula de Imipramina. Essas observações referentes à menor mobilidade aos hidrogênios aromáticos H2/2', corrobora os dados visualizados através do espectro de ^1H para o composto de inclusão, onde um afilamento dos sinais de ressonância, no espectro de ^1H para esses hidrogênios, foi observado.

Além disso, a redução menos expressiva de T_1 observada para os hidrogênios alifáticos, indica que essa região da molécula possui maior mobilidade do que a aromática e por isso um afilamento dos sinais de ressonância para esses hidrogênios não é observado no espectro de ^1H . Entretanto os dados de T_1 indicam que essa região da molécula de IMI também é perturbada pela presença da ciclodextrina em solução.

Para confirmar as interações intermoleculares que ocorrem entre a Imipramina e a β -ciclodextrina em solução, a utilização da técnica de NOESY é imprescindível, e foi aplicada para os sistemas nas razões molares de 1:1 e 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ utilizando o D_2O como solvente.

Para o sistema supramolecular 1:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, Figura 4.27, foram observadas manchas de correlação dipolar a curta distância (inferiores a 5 Å) entre os hidrogênios dos anéis aromáticos da IMI (H1/1', H2/2', H3/3' e H6/6' $\delta = 6,90$ a $7,30$) com os hidrogênios da região externa da βCD (H2 e H4 $\delta = 3,30$ a $3,50$) e também com os hidrogênios na cavidade da βCD (H3, H5 e H6 $\delta = 3,50$ a $3,70$). Essas múltiplas correlações dipolares observadas sugerem que um sistema de alta massa molecular pode se formar e também que complexos do tipo 2:1 $\beta\text{CD}/\text{IMI}$ podem ser favoráveis em solução. Além disso, como correlações a curta distância entre os hidrogênios da βCD e os hidrogênios

H7/7' da IMI não foram observadas, isso indica que a inclusão dos anéis aromáticos da IMI na cavidade da β CD não deve ser tão profunda. Este fato pode ser realmente provável, uma vez que a estrutura dos três anéis da Imipramina não é plana, devido à presença dos carbonos C7 e C7', que possuem hibridação do tipo sp^3 [7].

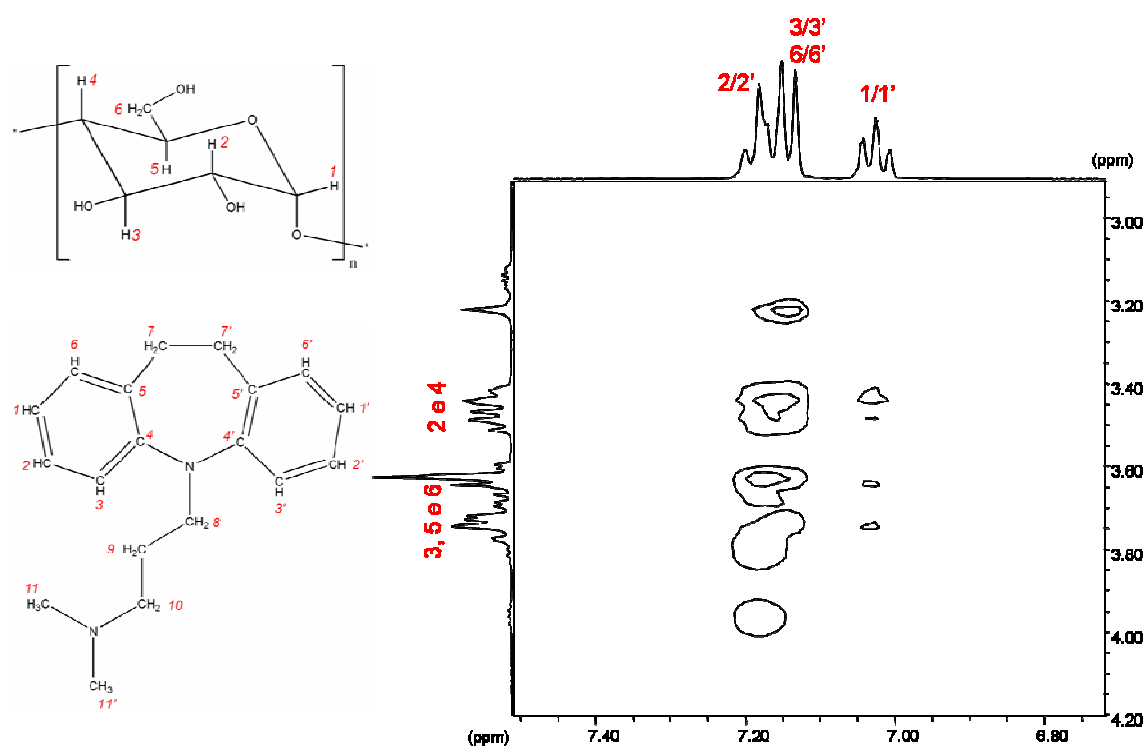


Figura 4.27: Expansão do mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 1:1 β CD/IMI.

De forma a avaliar as correlações dipolares entre a β CD e a IMI, através do efeito NOE para sistemas com maior concentração de β CD, o complexo de inclusão na razão molar 2:1 β CD/IMI foi utilizado e seu respectivo mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ está apresentado a seguir na Figura 4.28. As

correlações observadas para este sistema supramolecular 2:1 β CD/IMI foram semelhantes àsquelas observadas para o sistema de razão molar 1:1.

Entretanto as manchas de correlações dipolares observadas entre os hidrogênios aromáticos da IMI e os hidrogênios internos e externos para a β CD apresentaram uma maior intensidade (volume). Uma vez que as intensidades das manchas de correlação indicam uma maior proximidade, logo uma maior interação entre as espécies ocorre em solução [6]. Isso sugere que os anéis aromáticos da IMI possam estar mais profundamente incluídos na cavidade da β CD. Ou ainda, que devido à maior concentração de β CD presente em solução, os hidrogênios de ambos os anéis aromáticos estariam efetivamente interagindo de forma simultânea com a β CD, favorecendo assim a intensidade das manchas de correlações dipolares observadas no mapa de contorno.

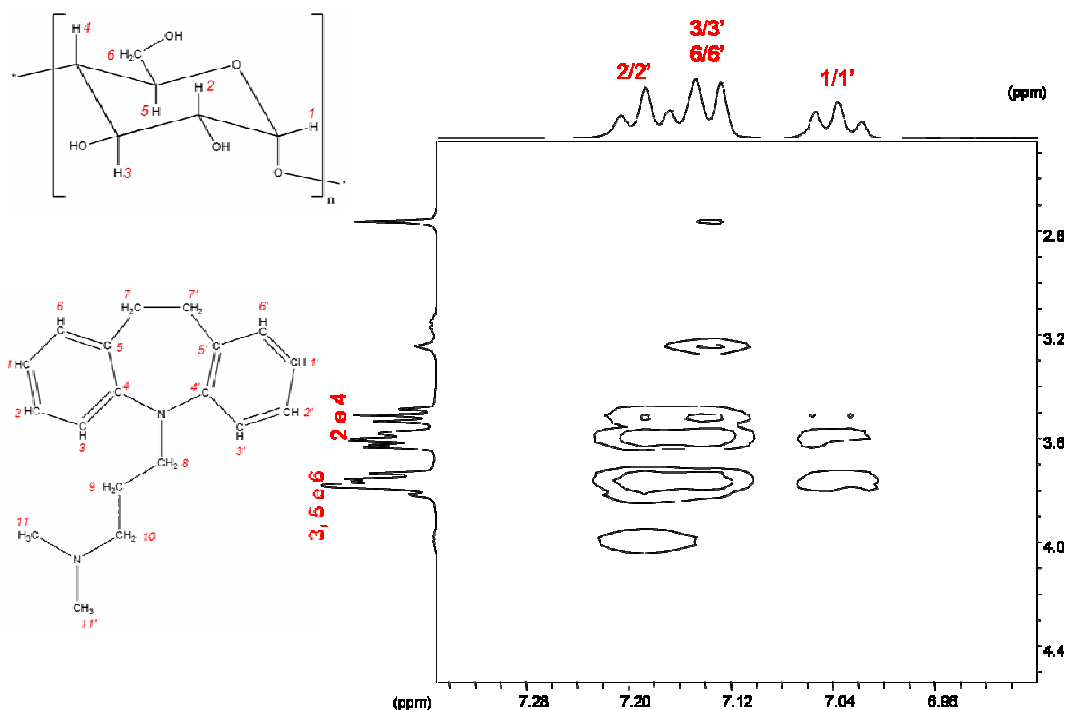


Figura 4.28: Expansão do mapa de contorno 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 2:1 β CD/IMI.

4.4 – Calorimetria Isotérmica de Titulação:

ITC

Na Figura 4.29a estão apresentadas as curvas de titulação calorimétrica para a Imipramina em água e em solução de β -ciclodextrina e na Figura 4.29b está apresentada a subtração da curva do processo de diluição da IMI pela sua curva de titulação com a β CD. Da mesma forma como procedido para o sistema β CD/FLU, a subtração das curvas tem como objetivo excluir os efeitos de diluição do titulante (Imipramina) no solvente, explicitando assim, apenas as interações entre a molécula de IMI e a β CD.

Para a curva de diluição da IMI em água (Figura 4.28a) foi observada uma variação de entalpia próxima de zero, indicando que essa molécula não tende a se associar em solução, para a faixa de concentração utilizada na titulação. Essa variação de entalpia seria esperada uma vez que durante os processos de diluição, necessariamente as moléculas do titulante seriam afastadas umas das outras, levando a uma modificação na forma de interação entre os sistemas soluto-soluto, soluto-solvente e ainda solvente-solvente, fato este que não foi observado para o sistema da Imipramina.

Através da curva de titulação entre a Imipramina e a ciclodextrina, um perfil de curva sigmóide pôde ser ajustado, permitindo assim determinar um ponto de inflexão na curva, que representa a estequiometria do sistema supramolecular formado [12]. Para o complexo β CD/IMI uma estequiometria de $N = 0,73$ foi obtida através do ajuste não linear da curva de titulação [13, 14]. Este valor de N sugere que sistemas de alta massa molecular poderiam ser observados em solução, ou ainda, mais de um tipo de complexo poderia existir

em solução simultaneamente. Este valor de estequiometria pode explicar a estequiometria obtida em solução através do experimento de Job, conduzido por FTIR-HATR, na qual pelo menos duas formas do complexo de inclusão foram observadas em solução, quando a concentração de β CD varia no meio reacional, explicando o valor não inteiro obtido por ITC ($N = 0,73$).

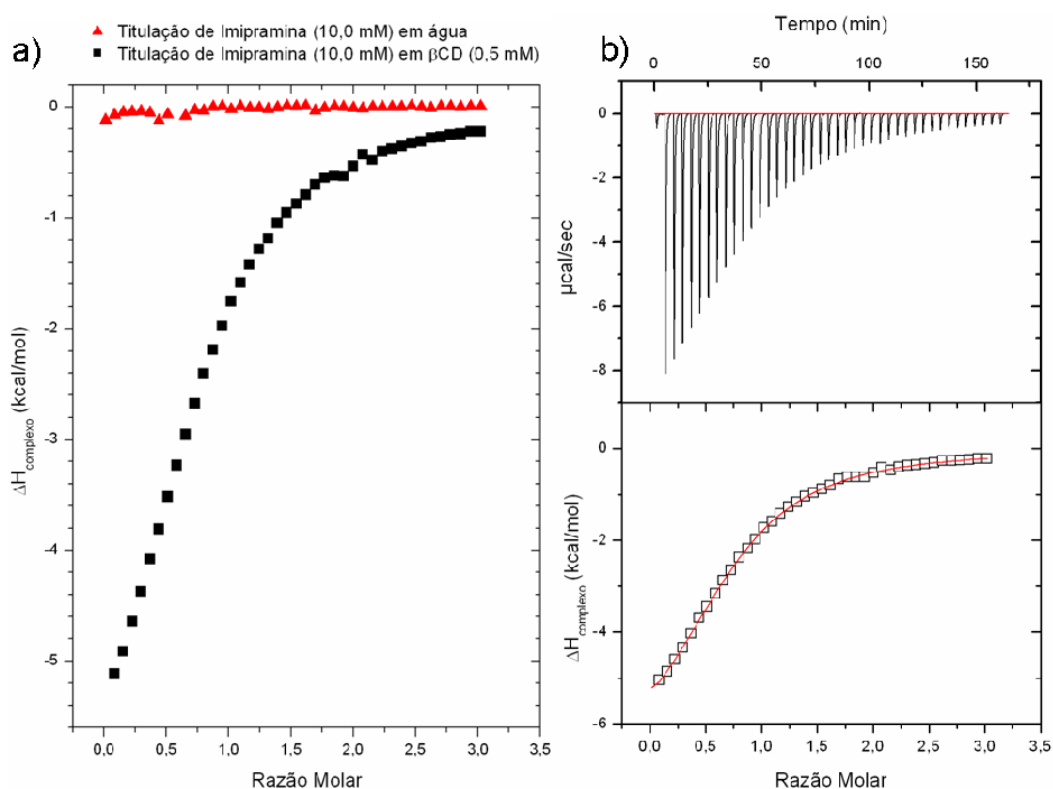


Figura 4.29: Curvas de titulação calorimétrica: a) Imipramina (10,0 mM) em água e da Imipramina (10,0 mM) em β CD (0,5 mM) b) curva final após subtração e seu ajuste não linear.

Através do ajuste não linear da curva de titulação [12, 13] para o sistema β CD/IMI foi possível obter a constante de equilíbrio global (K), e ainda as variações: de energia de Gibbs (ΔG^0), de entalpia (ΔH^0) e o termo entrópico ($T\Delta S^0$) para a reação de complexação. Estes parâmetros termodinâmicos se

encontram apresentados na Tabela 4.5 e são de extrema importância para conhecer de modo mais completo a termodinâmica de formação do sistema supramolecular obtido pela interação não-covalente entre a β CD e a IMI.

Tabela 4.5: Parâmetros termodinâmicos obtidos através do experimento de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema β CD/IMI.

| N | K | $\Delta G/\text{kJ.mol}^{-1}$ | $\Delta H/\text{kJ.mol}^{-1}$ | $T\Delta S/\text{kJ.mol}^{-1}$ |
|------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0,73 | 6832 ± 138 | -21,9 | -30,6 | -8,7 |

O valor da constante de equilíbrio encontrado para o sistema supramolecular β CD/IMI indica que uma forte interação entre as espécies ocorre em solução ($K = 6832 \pm 138$). Esse valor da constante de equilíbrio global para o sistema é alto quando comparado com outros sistemas envolvendo ciclodextrinas [3, 8, 9], entretanto é bem próximo do valor obtido para o sistema β CD/FLU. Essa alta constante de formação do complexo pode ser explicada pela possibilidade das interações entre ambos os anéis aromáticos da IMI, que não apresentam impedimento espacial para interagir com a cavidade hidrofóbica da β CD. Essas interações seriam ainda mais efetivas quando a concentração de β CD é maior e, isso foi comprovado não só pelos resultados de RMN obtidos através da comparação dos mapas de contorno NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$, mas também pelo experimento de Job que apresentou o máximo de sua curva de titulação para sistemas na qual a concentração de β CD é superior a de IMI.

O processo de formação do composto de inclusão entre as moléculas hóspede e hospedeira (IMI e β CD) é espontâneo, ($\Delta G = -21,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Para

esse sistema (β CD/IMI) a formação do complexo de inclusão apresentou ainda um caráter exotérmico ($\Delta H = -30,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$) e este fenômeno está relacionado com a interrupção das interações entre o soluto e o solvente e à formações de novas interações intermoleculares favoráveis à formação do sistema β CD/IMI, como o efeito hidrofóbico e a interação eletrostática.

A redução no termo entrópico ($T\Delta S = -8,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$) está relacionada à diminuição no número de espécies em solução, mesmo que exista um equilíbrio entre mais de um tipo de complexo ocorra. Neste caso é importante lembrar que um desses complexos de inclusão, o de razão molar 2:1 β CD/IMI, ocorre de forma preferencial em solução, conforme observado pelo experimento de Job conduzido através do FTIR-HATR.

4.5 – Referências:

1. Abu-Eittah, R.H. and L.T. Kamel, *Kinetics and Thermodynamic Parameters of the Thermal Decomposition of Imipramine Hydrochloride and Trimipramine Maleate*. International Journal of Chemical Kinetics, 2002. **35**(4): p. 166 - 179.
2. Rekharsky, M.V. and Y. Inoue, *Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1875-1918.
3. Denadai, Â.M.L., et al., *A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity*. Biodrugs, 2006. **20**(5): p. 283-291.
4. Denadai, A.M.L., et al., *Supramolecular Self-Assembly of [β]-Cyclodextrin: An Effective Carrier of the Anti-microbial Agent Chlorhexidine*. Carbohydrate Research. 2007. **342**(15): p. 2286-2296.
5. Jullian, C., et al., *Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007. **15**(9): p. 3217-3224.
6. Claridge, T.D.W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* Vol. 19. 1999, London: Elsevier Ltda.
7. Gaggelli, E., N. Marchettini, and G. Valensin, *Conformational features of imipramine hydrochloride in aqueous solution as detected by ^1H NMR relaxation analysis*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1991. **29**(9): p. 933-935.
8. Denadai, A.M.L., et al., *Novel pharmaceutical composition of bradykinin potentiating penta peptide with [β]-cyclodextrin: Physical-chemical*

- characterization and anti-hypertensive evaluation*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **336**(1): p. 90-98.
9. Denadai, Â.M.L., et al., *Self-assembly Characterization of the β -Cyclodextrin and Hydrochlorothiazide System: NMR, Phase Solubility, ITC and QELS*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2006. **55**(1-2): p. 41-49.
 10. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
 11. Schneider, H.J., et al., *NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1755-1786.
 12. Turnbull, W.B. and A.H. Daranas, *On the value of c : Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(48): p. 14859-14866.
 13. Rekharsky, M. and Y. Inoue, *1:1 and 1:2 Complexation Thermodynamics of β -Cyclodextrin with *N*-Carbobenzyloxy Aromatic Amino Acids and *o*-Phenylalkanoic Acids*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(44): p. 10949-10955.
 14. Rekharsky, M., et al., *Ion-Pairing Molecular Recognition in Water: Aggregation at Low Concentrations That Is Entropy-Driven*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **126**(50): p. 14959-14967.

CAPÍTULO 5
Conclusões

5 – Conclusões:

Os resultados obtidos neste estudo para a caracterização estrutural e termodinâmica formaram um conjunto de informações imprescindíveis para a determinação da topologia e das interações intermoleculares envolvidas no processo de formação dos dois sistemas, β CD/FLU e β CD/IMI.

As técnicas de análise térmica (TG e DSC), para os dois sistemas supramoleculares, evidenciaram uma maior estabilidade térmica para os compostos de inclusão, β CD/FLU e β CD/IMI, do que para as moléculas livres.

A espectroscopia FT-IR evidenciou supressões de alguns modos vibracionais para os dois fármacos quando estes se encontravam complexados com a β CD. Para os dois sistemas, β CD/FLU e β CD/IMI, as alterações nos modos vibracionais observadas nos espectros de FT-IR indicaram uma interação preferencial da β CD com a região aromática dos antidepressivos.

O presente trabalho definiu ainda a utilização da técnica de FTIR-HATR em solução aquosa, como uma nova sonda para estudar os processos de complexação entre CDs e fármacos, até então não descrita na literatura. Assim foi possível avaliar de forma quantitativa as modificações observadas nos modos vibracionais das moléculas do sistema. Esses resultados obtidos por FTIR-HATR evidenciaram uma redução na intensidade do estiramento (C-O-C) da β CD, que é equivalente ao afinamento observado por FT-IR. Além disso, foram observadas alterações nas bandas referentes aos anéis aromáticos dos dois fármacos, confirmando as interações constatadas por FT-IR.

A técnica em solução de FTIR-HATR permitiu ainda que fossem conduzidos os experimentos de Job, o que possibilitou determinar a

estequiometria dos complexos em solução. Para os dois sistemas foi verificada a possibilidade de mais de um tipo de complexo coexistir em solução.

Os experimentos de RMN de ^1H permitiram verificar variações de deslocamento químico dos hidrogênios da βCD e dos antidepressivos que são os sítios de interação entre as moléculas. Os resultados de T_1 , para os complexos $\beta\text{CD}/\text{FLU}$ e $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, indicaram uma redução na mobilidade principalmente para os hidrogênios presentes nos anéis aromáticos, os quais são os principais sítios de interação com a βCD . Além disso, os experimentos NOESY permitiram verificar manchas de correlação dipolar entre os anéis aromáticos da FLU e da IMI com os hidrogênios internos e externos da βCD .

Para os dois sistemas estudados, o processo de complexação se mostrou espontâneo e entalpicamente favorável. Para o complexo formado com a FLU, a estequiometria de 1:1 foi encontrada e para o sistema $\beta\text{CD}/\text{IMI}$, a estequiometria de 0,75 foi verificada pela curva de titulação, o que indica a formação de mais de uma espécie em solução.

Espera-se que esses complexos supramoleculares, preparados, através da associação da βCD com FLU e IMI sejam eficazes como dispositivos de liberação sustentada em futuras formulações farmacêuticas, demonstrando a eficácia das ciclodextrinas para esse tipo de formulação farmacêutica. Além disso, a utilização desses dispositivos em testes biológicos poderá favorecer a redução na dose administrada por via oral, com uma conseqüente minimização dos diversos efeitos colaterais que esses fármacos apresentam.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)