

UFMG/ICEx/DQ. 840^a

T. 359^a

FREDERICO BARROS DE SOUSA

Estudo e Caracterização Físico-Química de Sistemas Supramoleculares
Nanoagregados e de Matrizes Poliméricas Associadas à Ciclodextrina

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto
de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciências – Química.

Belo Horizonte

2010

S725e Sousa, Frederico Barros,
2010 Estudo e caracterização físico-química de sistemas
T supramoleculares nanoagregados e de matrizes
poliméricas associadas à ciclodextrina / Frederico
Barros de Sousa. 2010.

xvi, 126 f. : il.

Orientador: Rubén Dario Sinisterra Millán.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.

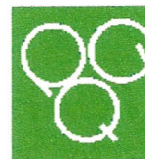
Bibliografia: f. 117-126.

1. Química inorgânica - Teses 2. Ciclodextrina -
Teses 3. Polímeros - Teses 4. Termodinâmica I.
Sinisterra, Rubén Dario, Orientador II. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br




**"Estudo e Caracterização Físico-Química de Sistemas Supramoleculares
Nanoagregados e de Matrizes Poliméricas Associadas à Ciclodextrina"**

Frederico Barros de Sousa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador
UFMG


Prof. Oswaldo Luiz Alves
UNICAMP


Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira
UFJF


Prof. Humberto Osório Stumpf
UFMG


Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão
UFMG

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2010.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu pai que sempre me apoiou durante meu doutorado e a todas as minhas escolhas.

À minha mãe, que mesmo não estando mais entre nós, sempre foi fonte de inspiração por sua força e determinação.

À Juliana, porque sem o seu apoio durante esse período nada disso seria possível. Te amo!

Aos meus queridos irmãos, Luciana e Leandro.

À Lenise, aos meus avós, tios e primos.

Aos meus sogros.

À minha cunhada Daniele e ao meu cunhado Arnaldo.

Ao mais recente membro da família, meu querido sobrinho Tiago.

Ao Professor Rubén, pela orientação.

Aos meus grandes amigos de uma vida inteira, Igor, Gustavo, Fabrício, Fábio, Rafael e Eudes.

Ao meu amigo Joel que sempre esteve junto, nos melhores momentos e nas horas mais difíceis. Joel, um dia a gente sai dessa vida e arruma um emprego!

Aos meus amigos Clebio e Luciana, o casal “*fineira*”, pelos ótimos momentos juntos.

À todos os meus amigos da química teórica.

À Ivana, que mesmo de muito longe sempre me ajudou prontamente.

Ao Ângelo, que sempre foi um grande amigo e sempre esteve disposto a ajudar.

A todos os amigos do laboratório – LEMB.

To Prof Langer and all lab mates from his lab (Langer Lab), for all support during my doctoral stage, specially to Chester, Levins, Alabi, João, Minglin, Shan, Nathan, Marshall, Matthias and Jojo.

Aos meus amigos de Boston: André, Bianca e Nakédia.

A todos os funcionários da secretaria da pós-graduação que sempre me ajudaram prontamente.

Aos Professores: Robson A. S. Santos, Cláudio Donnici, Maria Esperanza, Wagner B. de Almeida, Willian Rocha e ao Prof. Hélio F. dos Santos que tem sido um grande amigo e colaborador.

Ao COINFAR pelo peptídeo BPP10c gentilmente cedido.

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas no país e no exterior.

Sumário

<i>Índice de Figuras</i>	vi
<i>Índice de Tabelas</i>	xii
<i>Lista de Abreviações</i>	xiii
<i>Resumo e palavras-chave</i>	xv
<i>Abstract and key words</i>	xvi
<i>Capítulo 1: Introdução</i>	1
1.1 <i>A Auto-organização e a Química Supramolecular</i>	2
1.2 <i>As Ciclodextrinas e Suas Aplicações</i>	7
1.3 <i>Eletrofiação</i>	12
1.4 <i>Objetivos</i>	18
1.4.1 <i>Objetivos Gerais</i>	18
1.4.2 <i>Objetivos Específicos</i>	18
<i>Capítulo 2: Materiais e Métodos</i>	20
2.1 <i>Reagentes</i>	21
2.2 <i>Descrição dos Experimentos</i>	22
2.2.1 <i>Preparo do complexo de inclusão</i>	22
2.2.2 <i>Síntese das moléculas SP, βCD_{SP}, PMAAβCD_{SP} e PMAA_{SP}</i>	23
2.2.3 <i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	25
2.2.4 <i>Espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada</i>	26
2.2.5 <i>Calorimetria de Titulação Isotérmica</i>	28
2.2.6 <i>Dicroísmo Circular</i>	29
2.2.7 <i>Espalhamento de Luz</i>	29
2.2.8 <i>Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível</i>	31
2.2.9 <i>Microscopia de Força Atômica</i>	32
2.2.10 <i>Espectrometria de Massa</i>	32
2.2.11 <i>Eletrofiação</i>	33
2.2.12 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	33
2.2.13 <i>Ângulo de Contato</i>	34

<i>Capítulo 3: Sistema Hóspede-Hospedeiro Formado pela β-ciclodextrina e o BPP10c.....</i>	36
3.1 <i>Sistema Hóspede-Hospedeiro formado pela β-ciclodextrina e o BPP10c.....</i>	37
3.1.1 <i>Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	37
3.1.2 <i>Calorimetria de Titulação Isotérmica.....</i>	48
3.1.3 <i>Espectroscopia de Infravermelho – FTIR-ATR.....</i>	50
3.1.4 <i>Dicroísmo Circular.....</i>	57
<i>Capítulo 4: Agregação da β-ciclodextrina e seu Complexo Supramolecular.....</i>	60
4.1 <i>Auto-organização e Agregação da β-ciclodextrina e seu Complexo Supramolecular.....</i>	61
4.1.1 <i>Espalhamento de Luz Dinâmica e Estático.....</i>	61
4.1.2 <i>Medidas Espectroscópicas e Termodinâmicas para o Sistema β-CD:Ampicilina.....</i>	75
4.1.3 <i>Microscopia de Força Atômica para o Sistema β-CD:Ampicilina.....</i>	83
<i>Capítulo 5: Sistemas Poliméricos a Base de β-ciclodextrina Modificada.....</i>	89
5.1 <i>Síntese da β-ciclodextrina com Espiropirano e dos Polímeros: PMAAβCD_{SP} e PMAA_{SP}....</i>	90
5.1.1 <i>Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	90
5.1.2 <i>Espectroscopia de Infravermelho – FTIR-ATR.....</i>	98
5.1.3 <i>Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível.....</i>	100
5.2 <i>Nanofibras a Base do Ácido Polimetacrílico e PMAACD_{SP}.....</i>	105
5.2.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura.....</i>	105
5.2.2 <i>Ângulo de Contato da Água.....</i>	108
5.2.3 <i>Espectroscopia de Infravermelho – FTIR-ATR.....</i>	111
<i>Capítulo 6: Conclusões.....</i>	113
<i>Capítulo 7: Referências.....</i>	116

Índice de Figuras

Capítulo 1: Introdução.....	1
Figura 1.1 Representação esquemática entre a dependência da concentração e algumas propriedades físico-químicas para sistemas auto-agregados.....	3
Figura 1.2 Fórmula estrutural do peptídeo BPP10c.....	5
Figura 1.3 Representação esquemática do processo de auto-agregação dos complexos supramoleculares.....	7
Figura 1.4 Fórmula estrutural do sal de sódio da Ampicilina.....	7
Figura 1.5 Representação estrutural da: a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina e c) γ -ciclodextrina.....	8
Figura 1.6 a) Fórmula estrutural da unidade glicosídica da ciclodextrina na conformação cadeira e b) representação esquemática da estrutura da β -ciclodextrina.....	9
Figura 1.7 Representação esquemática da estrutura em cone da ciclodextrina.....	10
Figura 1.8 a) representação esquemática do aparelho de eletrofiação b) formação do cone de Taylor para a solução de óxido de polietileno a 5 % após diferentes voltagens aplicadas c) nanofibras obtidas por eletrofiação de: (1) polivinilpirrolidona com nanopartículas de óxido de ferro, (2) óxido de polietileno com nanotubos de carbono, (3) nanofibras concêntricas do copolímero poliestireno- β -dimetilsilixano com ácido polimetacrílico, (4) copolímero fluoreno-trifenilamina com zeólita fluorescente, (5) polivinilpirrolidona e AgS e (6) poliuretano.....	13
Figura 1.9 Comparação de tamanho entre fibras obtidas por eletrofiação e outros materiais.....	15
Figura 1.10 Fibras obtidas por eletrofiação a base de a) poliestireno em dimetilformamida a 10 % e b) poliestireno em dimetilformamida 10 % em presença de β -ciclodextrina.....	15
Figura 1.11 Nanofibras obtidas por eletrofiação: a) ácido poli láctico em THF, b) ácido poli (metacrílico) em DMF e óxido polietileno em c) água e d) água destilada.....	16
Figura 1.12 Estruturas da molécula de espiro (SP) e merocianina (MC) que são obtidas pela irradiação por luz ultravioleta e visível.....	17
Capítulo 2: Materiais e Métodos.....	20
Figura 2.1 Fórmula estrutural dos isômeros da molécula de espiropirano.....	23

Figura 2.2	<i>Ilustração das etapas utilizadas na metodologia para determinar a estruturação secundária do peptídeo.....</i>	27
<i>Capítulo 3: Sistema Hóspede-Hospedeiro Formado pela β-ciclodextrina e o BPP10c.....</i>		36
Figura 3.1	<i>Fórmula estrutural do peptídeo BPP10c.....</i>	37
Figura 3.2	<i>Espectros de RMN de ^1H para a βCD, a 400 MHz e a 25 °C, com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio utilizando-se como solvente a) D_2O e b) DMSO_{d6}.....</i>	38
Figura 3.3	<i>Espectro de RMN de ^{13}C para a βCD, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}.....</i>	39
Figura 3.4	<i>Espectros de RMN de ^1H para o peptídeo BPP10c em a) $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 500 MHz e b) D_2O a 400 MHz.....</i>	40
Figura 3.5	<i>Mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY para o peptídeo BPP10c a 500 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 20 °C.....</i>	41
Figura 3.6	<i>Mapa de contorno $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC para o peptídeo BPP10c a 400 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 20 °C.....</i>	42
Figura 3.7	<i>Espectro de RMN de ^1H para o sistema $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 400 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 5 % a 20 °C. Figura inserida: comparação entre a região aromática do espectro de hidrogênio do BPP10c e de seu complexo supramolecular.....</i>	44
Figura 3.8	<i>Espectro de RMN de ^1H para o sistema $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 400 MHz em D_2O a 5 % a 20 °C. Figura inserida: comparação entre a região aromática do espectro de hidrogênio do BPP10c e de seu complexo supramolecular.....</i>	44
Figura 3.9	<i>Mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY para o sistema supramolecular $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 500 MHz a 20 °C em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 5 %.....</i>	46
Figura 3.10	<i>Espectro de RMN de difusão para o sistema $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 400 MHz a 20 °C em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 5 %.....</i>	47
Figura 3.11	<i>Curva calorimétrica para a) o BPP10c 60,0 mmol.L⁻¹ em água (■) e em solução aquosa de βCD 4,0 mmol.L⁻¹ (▲) e b) figura final (___) curva após a subtração e regressão não-linear (isoterma de Wiseman) (---).....</i>	48
Figura 3.12	<i>Espectro de FTIR-ATR na região de ν/cm^{-1} 1750 a 1550 para o BPP10c em DMSO a) na ausência de βCD, b) em presença de βCD com o ajuste não-linear (gaussiana) (--) e c) comparação entre BPP10c puro, complexo $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ e βCD pura.....</i>	52
Figura 3.13	<i>Representação esquemática das interações não covalentes para o sistema em equilíbrio entre peptídeo-peptídeo, peptídeo-solvente e peptídeo-ciclodextrina.</i>	53

Figura 3.14	<i>Espectro de FTIR-ATR na região de ν/cm^{-1} 1750 a 1550 para o BPP10c em H₂O a) na ausência de βCD, b) em presença de βCD com o ajuste não-linear (gaussiana) (---) e c) comparação entre BPP10c puro, complexo βCD/BPP10c e βCD pura.....</i>	55
Figura 3.15	<i>Espectro de FTIR-ATR na região de ν/cm^{-1} 1750 a 1550 para o BPP10c em D₂O a) na ausência de βCD, b) em presença de βCD com o ajuste não-linear (gaussiana) (---) e c) comparação entre BPP10c puro, complexo βCD/BPP10c e βCD pura.....</i>	57
Figura 3.16	<i>Espectro de dicróismo circular para o BPP10c (0,1 mmol.L⁻¹) e para o complexo supramolecular βCD/BPP10c (0,1 mmol.L⁻¹) em tampão K₂HPO₄/H₃PO₄ (pH 4,0)...</i>	58
Figura 3.17	<i>Representação esquemática da estrutura molecular para a região de ligação peptídica com os respectivos ângulos de torção.....</i>	59
<i>Capítulo 4: Agregação da β-ciclodextrina e seu Complexo Supramolecular.....</i>		60
Figura 4.1	<i>Curva de concentração de agregação crítica para a βCD em água a 293,15 K.....</i>	61
Figura 4.2	<i>Curva de concentração de agregação crítica para a βCD em água a 298,15 K.....</i>	62
Figura 4.3	<i>Curva de concentração de agregação crítica para a βCD em água a 303,15 K.....</i>	62
Figura 4.4	<i>Distribuição da população de agregação para a βCD na concentração de 0,9 mmol.L⁻¹ em água a 298,15 K, representando a região 1.....</i>	63
Figura 4.5	<i>Representação esquemática de alguns possíveis sistemas antes da cac a) diâmetro da molécula de βCD, b) possíveis agregados formados pela interação frontal entre monômeros de βCD e c) agregado formado de estrutura em ziguezague.....</i>	64
Figura 4.6	<i>Distribuição da população de agregação para a βCD na concentração de 2,0 mmol.L⁻¹ em água a 298,15 K, representando a região 2.....</i>	65
Figura 4.7	<i>Curva de $\ln_{cac} \times 1/T$ e ajuste linear para a determinação da $\Delta_{ag}H^0$ para a βCD.....</i>	68
Figura 4.8	<i>Curva de Debye para determinar o número de moléculas de βCD por unidade de agregado em água a 293,15 K para a região 1.....</i>	69
Figura 4.9	<i>Curva de Debye para determinar o número de moléculas de βCD por unidade de agregado em água a 298,15 K para a região 1.....</i>	69
Figura 4.10	<i>Curva de Debye para determinar o número de moléculas de βCD por unidade de agregado em água a 303,15 K para a região 1.....</i>	70

Figura 4.11	<i>Nomenclatura das estruturas de βCD usadas nas simulações de dinâmica molecular.....</i>	72
Figura 4.12	<i>Varição do tamanho do agregado em função do tempo de simulação em solução aquosa a 298,15 K.....</i>	73
Figura 4.13	<i>Estruturas obtidas por dinâmica molecular para os agregados de βCD após tempo de 5000 os.....</i>	74
Figura 4.14	<i>Curvas de titulação e ajuste não-linear para a βCD a 12 mmol.L⁻¹ em AMP a 6,7 x 10⁻² mM e água em AMP a 6,7 x 10⁻² mmol.L⁻¹.....</i>	75
Figura 4.15	<i>Varição da absorvância da AMP ($\Delta_{abs} = \Delta_{abs_{AMP}} - \Delta_{abs_{\beta CD:AMP}}$) a 215 nm</i>	76
Figura 4.16	<i>Espectros de RMN de ¹H a 600 MHz e a 30 °C em D₂O para: a) AMP, b) complexo de inclusão βCD:AMP na razão molar de 1:1 e c) βCD pura.....</i>	77
Figura 4.17	<i>Mapa de contorno ¹H/¹H ROESY para o sistema supramolecular βCD:AMP a 400 MHz e a 30 °C em D₂O.....</i>	79
Figura 4.18	<i>Curvas de titulação calorimétrica para: a) (■) AMP 20,0 mmol.L⁻¹ em água e (■) AMP 20,0 mM em solução aquosa de βCD a 1,0 mmol.L⁻¹ e b) (---) dado original, (■) curva após subtração da diluição de AMP com água e (---) regressão não-linear para o ajuste dos dados (isoterma de Wiseman).....</i>	80
Figura 4.19	<i>Estruturas iniciais (esquerda) e finais (direita) das trajetórias da dinâmica molecular para os arranjos moleculares na razão molar 1:1 quando a AMP é incluída pela (a) cavidade maior e (b) cavidade menor da βCD.....</i>	81
Figura 4.20	<i>Estruturas iniciais e finais das trajetórias da dinâmica molecular para os arranjos moleculares na razão molar (a) 2:1 βCD:AMP e (b) 2:2 βCD:AMP, nos quais a AMP é incluída pela cavidade menor.....</i>	82
Figura 4.21	<i>a) imagem de AFM para a βCD a 0,9 mmol.L⁻¹ b) análise da altura da nanopartícula.....</i>	83
Figura 4.22	<i>a) imagem de AFM para o sistema βCD:AMP a 0,9:6,7 x 10⁻² mmol.L⁻¹ b) análise da altura da nanopartícula.....</i>	84
Figura 4.23	<i>Imagem de AFM para a βCD a 2,0 mmol.L⁻¹.....</i>	85
Figura 4.24	<i>a) imagem de AFM para o sistema βCD:AMP a 2,0:6,7 x 10⁻² mmol.L⁻¹ b) análise da altura da nanopartícula.....</i>	85
Figura 4.25	<i>a) energia potencial normalizada em função do tempo de simulação e b) estruturas iniciais e finais para o complexo supramolecular 4:4 βCD:AMP.....</i>	87

<i>Capítulo 5: Sistemas Poliméricos a Base de β-ciclodextrina Modificada.....</i>	89
Figura 5.1 <i>Representação esquemática da molécula de βCD_{SP}.....</i>	91
Figura 5.2 <i>Espectro de RMN de ¹H para a SP, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}.....</i>	91
Figura 5.3 <i>Mapa de contorno ¹H/¹H COSY para a SP, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}.....</i>	92
Figura 5.4 <i>Expansão do mapa de contorno ¹H/¹H COSY para a SP, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}.....</i>	93
Figura 5.5 <i>Espectro de RMN de ¹H para a βCD_{SP}, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} (*sinais da molécula de SP).....</i>	94
Figura 5.6 <i>Espectro de massa (MALDI-TOF) para a molécula de βCD_{SP}.....</i>	95
Figura 5.7 <i>Fórmula estrutural do monômero do ácido polimetacrílico.....</i>	95
Figura 5.8 <i>Espectro de RMN de ¹H para o polímero PMAA, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}</i>	96
Figura 5.9 <i>Espectro de RMN de ¹H para o polímero PMAAβCD_{SP}, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}.....</i>	96
Figura 5.10 <i>Espectro de RMN de ¹H para o polímero PMAA_{SP}, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6}.....</i>	97
Figura 5.11 <i>Espectros de infravermelho para a βCD, SP e βCD_{SP}: a) aproximação da região de 4000 a 2000 cm⁻¹ e b) região de 2000 a 500 cm⁻¹.....</i>	98
Figura 5.12 <i>Espectros de infravermelho para os polímeros PMAA e PMAAβCD_{SP}: a) região de 4000 a 500 cm⁻¹ e b) região de 2000 a 1000 cm⁻¹.....</i>	99
Figura 5.13 <i>Espectros de absorvância na região do ultravioleta visível em metanol para o sistema SP-MC.....</i>	100
Figura 5.14 <i>a) espectros de absorvância de ultravioleta visível em água para o sistema βCD_{SP-MC} e b) reversibilidade do processo de isomerização para o sistema βCD_{SP-MC} alternando ciclos de luz visível e ultravioleta.....</i>	101
Figura 5.15 <i>a) espectros de absorvância de ultravioleta visível em água para o sistema PMAAβCD_{SP-MC} e b) reversibilidade do processo de isomerização para o sistema PMAAβCD_{SP-MC} alternando ciclos de luz visível e ultravioleta.....</i>	102
Figura 5.16 <i>a) espectros de absorvância de ultravioleta visível em água para o sistema PMAA_{SP-MC} e b) reversibilidade do processo de isomerização para o sistema PMAA_{SP-MC} alternando ciclos de luz visível e ultravioleta.....</i>	103
Figura 5.17 <i>Curvas de coloração para as moléculas de βCD_{SP}, PMAA_{SP} e PMAAβCD_{SP} obtidas a 25 °C.....</i>	104

Figura 5.18	<i>Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fibras obtidas por eletrofiação do polímero PMAAβCD_{SP} aproximação de (a) 950 X (b) 5000 X e para o polímero PMAA (c) 950 X e (d) 5000 X.....</i>	106
Figura 5.19	<i>Nanofibras obtidas por eletrofiação: a) aquecidas a 80 °C e iluminada por luz visível através de um molde e então b) expostas a luz ultravioleta.....</i>	107
Figura 5.20	<i>Gotas de água em nanofibras a base de PMAAβCD_{SP} (à esquerda) e PMAA (à direita) após o tempo de: a) zero s, b) 180 s, c) 360 s, d) 370 s, e) 420 s e f) 480 s.</i>	108
Figura 5.21	<i>Medidas de ângulo de contato da água com a superfície das nanofibras de PMAAβCD_{SP} após 24 horas sob irradiação de: a) luz visível, PAMMβCD_{SP} e b) luz UV, PAMMβCD_{MC}.....</i>	109
Figura 5.22	<i>Filmes a base de PMAAβCD_{SP} obtidos por recobrimento por rotação e irradiados durante 24 horas por: a) luz UV e b) luz visível.....</i>	110
Figura 5.23	<i>Espectros de infravermelho para as nanofibras de PMAA e PMAAβCD_{SP}: a) região de 4000 a 500 cm⁻¹ e b) região de 2000 a 1000 cm⁻¹.....</i>	111

Índice de Tabelas

<i>Capítulo 3: Sistema Hóspede-Hospedeiro Formado pela β-ciclodextrina e o BPP10c.....</i>	36
Tabela 3.1 <i>Deslocamento químico para os sinais de hidrogênio e carbono para a β-ciclodextrina em D_2O e $DMSO_{d6}$ a 25 °C.....</i>	39
Tabela 3.2 <i>Deslocamento químico para os hidrogênios do peptídeo BPP10c a 500 MHz em D_2O/H_2O a 20 °C, utilizando o sinal da água como referência em δ4,8.....</i>	43
Tabela 3.3 <i>Posição e porcentagem das bandas de FTIR-ATR (ν/cm^{-1}) determinadas pela derivada segunda para as região de amida I do BPP10c e seus complexos em $DMSO$, H_2O e D_2O.....</i>	54
<i>Capítulo 4: Agregação da β-ciclodextrina e seu Complexo Supramolecular.....</i>	60
Tabela 4.1 <i>Parâmetros termodinâmicos de agregação obtidos por espalhamento de luz para a βCD.....</i>	66
Tabela 4.2 <i>Deslocamento químico para os sinais de hidrogênio para a Ampicilina em D_2O a 30 °C.....</i>	78
<i>Capítulo 5: Sistemas Poliméricos a Base de β-ciclodextrina Modificada.....</i>	89
Tabela 5.1 <i>Deslocamento químico para os hidrogênios da Espiropirano, a 400 MHz e 25 °C, em $DMSO_{d6}$.....</i>	92
Tabela 5.2 <i>Parâmetros obtidos pelos ajustes biexponenciais para as curvas cinéticas para os sistemas βCD_{SP} PMAA_{SP} e PMAA-βCD_{SP}.....</i>	104

Lista de Abreviações

Δ_{Abs}	<i>Varição de Absorbância</i>
αCD	<i>α-ciclodextrina</i>
βCD	<i>β-ciclodextrina</i>
γCD	<i>γ-ciclodextrina</i>
βCD_{SP}	<i>β-ciclodextrina monosubstituída com Espiropirano</i>
ΔG°	<i>Varição da Energia Livre de Gibbs Padrão</i>
ΔH°	<i>Varição de Entalpia Padrão</i>
λ_o	<i>Comprimento de Onda do Laser</i>
ΔS°	<i>Varição de Entropia Padrão</i>
^{13}C	<i>Espectro de Carbono</i>
1H	<i>Espectro de Hidrogênio</i>
$^1H/^{13}C$ HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
$^1H/^{13}C$ HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
$^1H/^1H$ 2D NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
$^1H/^1H$ ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
$^1H/^1H$ TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
2,5-DHB	<i>Ácido 2,5 dihidroxibenzóico</i>
A_2	<i>Segundo Coeficiente do Virial</i>
$Abs_{\beta CD:AMP}$	<i>Absorbância do Complexo β-ciclodextrina:Ampicilina</i>
Abs_{AMP}	<i>Absorbância da Ampicilina</i>
AFM	<i>Microscopia de Força Atômica</i>
AMP	<i>Ampicilina</i>
BPP	<i>Peptídeo Potencializador de Bradicinina</i>
C	<i>Concentração</i>
Cac	<i>Concentração de Agregação Crítica</i>
CDs	<i>Ciclodextrinas</i>
CGTase	<i>Ciclodextrina Glicosil Transferase</i>
CHCA	<i>Ácido α-ciano-4-hidrocínâmico</i>
Cmc	<i>Concentração Micelar Crítica</i>
D_2O	<i>Óxido de Deutério</i>
DCC	<i>1,3-Diciclo-hexilcarbodiimida</i>
DCU	<i>Diciclohexilureia</i>

<i>DEPT</i>	<i>Distortionless Enhancement By Polarization Transfer</i>
<i>DLS</i>	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico</i>
<i>DMF</i>	<i>Dimetilformamida</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<i>DMSO_{d6}</i>	<i>Dimetilsulfóxido Deuterado</i>
<i>dn/dc</i>	<i>Incremento do Índice de Refração em Função da Concentração de Solute</i>
<i>DOSY</i>	<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>
<i>FTIR-ATR</i>	<i>Reflectância Total Atenuada</i>
<i>I_A</i>	<i>Intensidade Residual Espalhada</i>
<i>I_T</i>	<i>Intensidade de Espalhamento do Padrão</i>
<i>ITC</i>	<i>Calorimetria De Titulação Isotérmica</i>
<i>K_{eq}</i>	<i>Constante de Equilíbrio</i>
<i>K</i>	<i>Constante Óptica</i>
<i>Kcps</i>	<i>Contagem em Kilo por segundo</i>
<i>M</i>	<i>Massa Molecular</i>
<i>MALDI-TOF</i>	<i>Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção de Matriz Assistida a Laser</i>
<i>MC</i>	<i>Merocianina</i>
<i>MEV</i>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>
<i>N_A</i>	<i>Número de Avogadro</i>
<i>n_o</i>	<i>Índice de Refração do Solvente</i>
<i>n_T</i>	<i>Índice de Refração do Padrão</i>
<i>PMAA</i>	<i>Ácido poli (metacrílico)</i>
<i>PMAA_{βCDSP}</i>	<i>Ácido poli (metacrílico) modificado com βCDSP</i>
<i>PMAA_{SP}</i>	<i>Ácido poli (metacrílico) substituído com Espiropirano</i>
<i>R_θ</i>	<i>Razão de Rayleigh</i>
<i>RMN</i>	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>
<i>R_T</i>	<i>Razão de Rayleigh do Padrão</i>
<i>SLS</i>	<i>Espalhamento de Luz Estático</i>
<i>SP</i>	<i>Espiropirano</i>
<i>THF</i>	<i>Tetrahidrofurano</i>
<i>Uv-visível</i>	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta Visível</i>

Resumo

No presente trabalho foram preparados e caracterizados sistemas supramoleculares e poliméricos envolvendo a β -ciclodextrina. Mais especificamente, foi estudado o sistema hóspede:hospedeiro entre a β -ciclodextrina e o BPP10c, peptídeo potencializador de bradicinina, com atividade anti-hipertensiva. Envolveu ainda o estudo da auto-agregação da β -ciclodextrina, bem como a influência de uma molécula modelo solúvel em água, a Ampicilina (AMP) um antibiótico de amplo espectro de ação, sobre esse fenômeno de agregação. Finalmente foram estudadas as propriedades fotocromicas da β -ciclodextrina e do polímero (PMAA) modificados com a espiropirano, visando à aplicação desses materiais como suporte celular.

Os estudos de ressonância magnética nuclear com o auxílio dos resultados obtidos por calorimetria de titulação isotérmica permitiram propor o modo de interação entre essas moléculas de BPP10c e AMP com a β CD. Os parâmetros termodinâmicos de interação para esses sistemas supramoleculares indicaram a espontaneidade do processo de formação dos complexos de inclusão, indicando para a molécula de AMP que diferentes estequiometrias poderiam co-existir em solução, resultado que não foi observado para o BPP10c que apresentou um sítio de interação preferencial.

Os experimentos de FTIR-ATR e dicroísmo circular demonstraram que a interação da β CD com o peptídeo não alterou de forma significativa a estruturação secundária do BPP10c. Porém, para o sistema formado pela auto-agregação da β CD, a presença da molécula hóspede (AMP) demonstrou uma dependência entre a concentração de β CD e a forma do agregado. Os cálculos de dinâmica molecular permitiram propor os arranjos espaciais dos agregados de β CD, corroborando os resultados experimentais.

O estudo dos materiais fotocromicos sintetizados nesse trabalho demonstram que esses apresentam fotocromismo reverso e que o processo de isomerização dos materiais é dependente da vizinhança da molécula de espiropirano, demonstrando uma maior velocidade de isomerização para a β CD_{sp}. As nanofibras obtidas por eletrofiação à base do polímero PMAA β CD_{sp} apresentaram uma maior característica hidrofóbica, quando esse material é comparado com as nanofibras de PMAA. Além disso, foi determinada a dependência das características hidrofóbicas da superfície do material após a irradiação de luz UV ou visível.

Palavras-chave: ciclodextrina, química supramolecular, complexo de inclusão, auto-agregação, polímeros, fotocromismo, parâmetros termodinâmicos.

Abstract

Herein, supramolecular systems involving β -cyclodextrin and polymer matrix were prepared and characterized. More specifically, the host-guest system formed between β -cyclodextrin and BPP10c, a bradykinin potentiating peptide with antihypertensive action, was studied. Additionally, the β -cyclodextrin self-assembly was investigated, as well as, the influence of the Ampicillin (AMP), a broad spectrum antibiotic highly water soluble, in the self-assembly process. Moreover, the photochromic properties of the modified β -cyclodextrin and the PMAA polymer with spiropyran were studied looking forward their application as support for cellular growth.

Combining the nuclear resonance magnetic and isothermal titration calorimetry results, the supramolecular interactions between BPP10c and AMP with β CD were obtained. The thermodynamic inclusion parameters for these supramolecular systems indicated the spontaneity of the inclusion process. In addition, for the β CD:AMP supramolecular system, these results indicated that different stoichiometries can exist simultaneously in solution, which was not observed for the β CD:BPP10 system, since only one binding site was observed between these molecules.

The FTIR-ATR and circular dichroism results demonstrated that the β CD:BPP10c interaction was not able to modify significantly the peptide secondary structure, however, the AMP molecule was capable to change the supramolecular arrange of the β CD aggregates, indicating the dependence between β CD concentration and the aggregate arrange. Molecular dynamics simulation allowed proposing the tridimensional structure for the β CD aggregates and these complexes, are in agreement with the experimental finds.

The photochromic materials synthesized in this work based on spiropyran molecule presented reverse photochromism and it was also observed that their isomerization rates depend on the microenvironment around the spiropyran molecule. In this sense, the β CD_{SP} molecule presented the fastest isomerization rate comparing to the other materials synthesized, PMAA_{SP} and PMAA β CD_{SP}. The PMAA β CD_{SP} electrospun nanofibers surface was more hydrophobic than those nanofibers obtained from PMAA polymer. Moreover, this hydrophobicity observed for the PMAA β CD_{SP} was light dependent, indicating the presence of the spiropyran on the mats surface.

Key words: cyclodextrin, supramolecular chemistry, inclusion complex, self-aggregation, polymers, photochromism, thermodynamic parameters

Capítulo 1

Introdução

*“Choices have to be made. Chance and circumstance
also play a part in what went in and what had to be left out.”*

Steven A. Edwards

1. Introdução

1.1. A Auto-organização e a Química Supramolecular

A automontagem é a associação espontânea de diversos componentes moleculares para formar um agregado discreto, não covalente ligado e com uma estrutura definida, além de envolver processos de reconhecimento molecular.¹ Neste sentido, a auto-organização de átomos, moléculas ou mesmo nanoestruturas é considerada uma técnica eficiente para a construção de nanomateriais com propriedades específicas, sob condições termodinâmicas apropriadas.²⁻⁴ Entretanto, projetar essas estruturas em escala nanométrica com forma e tamanho uniformes, controlando sua composição, com propriedades de superfície características e ainda organizá-las em uma, duas e três dimensões com estrutura espacial previsível é um grande desafio para os cientistas que trabalham com química supramolecular. Essa dificuldade se deve ao fato da dificuldade em se obter informações sobre o(s) mecanismo(s) de interação entre as moléculas, fator que é indispensável para compreensão do sistema, principalmente para que futuras aplicações práticas destes nanomateriais possam ser alcançadas de maneira eficaz.⁵

A auto-organização é tradicionalmente definida como a associação espontânea e reversível de estruturas dispostas em uma geometria tri-dimensional sob condições específicas.^{6,7} Existem duas formas principais para a definição da auto-organização, a estática e a dinâmica. Na auto-organização estática os átomos, as moléculas ou as estruturas monoméricas encontram-se em equilíbrio com os agregados formados. Neste sistema, as forças intermoleculares tais como, forças eletrostáticas, de van der Waals ou ainda ligações de hidrogênio favorecem a formação espontânea das estruturas supramoleculares. Por outro lado, a auto-organização dinâmica é definida pelo processo no qual as estruturas de partida não se encontram em equilíbrio com os nanoagregados e a energia que estabiliza e mantém essas estruturas organizadas é fornecida pelo sistema.⁷⁻⁹

Os nanoagregados formados a partir da interação entre os monômeros são estabilizados por um balanço de forças atrativas e repulsivas. Esse fenômeno pode ser observado, por exemplo, para as micelas formadas pela associação de moléculas de surfactante, na qual um balanço entre forças atrativas (efeito hidrofóbico) e forças repulsivas (repulsão eletrostática e/ou hidratação) estabiliza o sistema sem nenhum tipo de ligação covalente. Como não há formação de ligações covalentes, os monômeros estão em equilíbrio com aquelas moléculas de surfactante que formam as micelas em solução e a concentração necessária para a formação da primeira micela é chamada de concentração micelar crítica, *cmc*.⁶ Os agregados formados por moléculas de surfactante não são os únicos sistemas que se enquadram nos processos de auto-organização e auto-agregação. Sistemas formados por suspensões coloidais e emulsões também apresentam um balanço de forças atrativas

e repulsivas que irão determinar a estabilidade dos agregados. Porém, as forças atrativas e repulsivas para esses sistemas podem ser diferentes daquelas observadas para a formação de micelas.^{6,10}

Dois modelos termodinâmicos são utilizados para explicar o processo de formação das micelas em solução: o modelo de ação das massas e o modelo da separação da pseudofase. O modelo de ação das massas trata a formação da micela como sendo a reação de um certo número de monômeros para que haja a formação do agregado. Já no modelo da separação da pseudofase, o processo de micelização é tratado como uma transição de fase, entre a fase monomérica e a micelar. Essa abordagem é muito útil para explicar a variação de concentração do monômero e da micela em função da concentração de surfactante. Ambos os modelos apresentam vantagens e desvantagens, porém os dois são capazes de descrever o processo de micelização de forma satisfatória.⁶

Para as entidades formadoras de agregados antes da concentração de agregação crítica, *cac*, a maioria de suas propriedades são equivalentes às aquelas observadas para os monômeros. Entretanto, para concentrações mais elevadas (acima da *cac*) algumas propriedades podem variar quando comparadas com aquelas verificadas para os monômeros, como por exemplo, a tensão superficial e a pressão osmótica podem tornar-se constantes, enquanto que a intensidade de luz espalhada pode aumentar e o coeficiente de difusão diminuir. A Figura 1.1 apresenta a variação de algumas dessas propriedades dos monômeros em solução em função de sua concentração.¹¹

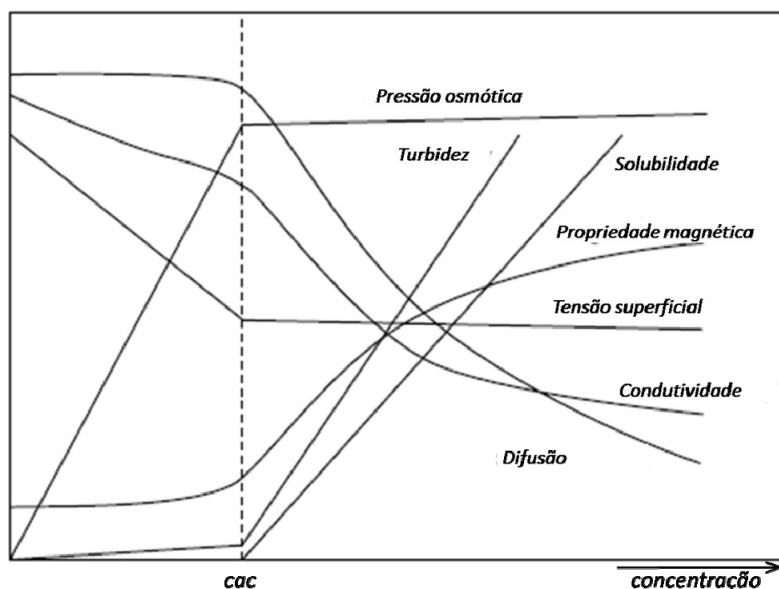


Figura 1.1: Representação esquemática entre a dependência da concentração e algumas propriedades físico-químicas para sistemas auto-agregados.

O fato de algumas propriedades físico-químicas dos nanoagregados serem diferentes daquelas observadas para os monômeros isolados pode favorecer a aplicação dessas nanoestruturas para diversas áreas da ciência, dentre as quais podemos ressaltar a liberação controlada de fármacos. Esses nanoagregados quando utilizados como carreadores de fármacos são capazes de vetorizar o fármaco a um ponto específico do organismo, aumentando sua especificidade, reduzindo assim a toxicidade e, conseqüentemente, melhorando a eficácia do mesmo.¹²⁻¹⁴ Além das propriedades mencionadas acima para os sistemas supramoleculares e nanoagregados, esses podem apresentar uma melhor permeabilidade nos sítios de ação, permitindo assim diferentes rotas de administração do medicamento, como por exemplo, oral, intravenosa, transdérmica e a ainda a nasal.^{15,16}

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento e estudo de diferentes sistemas para a liberação controlada de fármacos para algumas classes de macromoléculas com potencial ação terapêutica, como é o caso dos peptídeos e das proteínas, a administração por via oral não é favorável, devido as diferentes barreiras apresentadas no sistema gastrointestinal.¹⁷ Dentre os problemas na administração por via oral podem ser mencionadas a sua baixa biodisponibilidade, devido ao grande tamanho e solubilidade característica.¹⁸ A alta solubilidade em solventes polares da maioria dos peptídeos e para as proteínas influenciam de forma determinante na biodisponibilidade dessas moléculas, uma vez que um mínimo de hidrofobia é necessária para que essas moléculas sejam absorvidas de forma passiva.¹⁹ Como a maioria dos peptídeos e proteínas estudados²⁰⁻²³ ou aprovados¹⁷ como medicamentos apresentam um alto caráter hidrofílico, a biodisponibilidade dessas moléculas fica limitada, fazendo com que essas necessitem ser associadas à algum tipo de sistema de liberação modificada. Outro obstáculo na administração dos peptídeos e das proteínas por via oral está relacionado à vulnerabilidade destas moléculas no trato gastrointestinal, à degradação enzimática ou química, o que resulta em uma baixa biodisponibilidade.¹⁶

Desta forma, diversas alternativas para sistemas de liberação, visando à administração oral de peptídeos e de proteínas têm sido estudadas. Dentre esses sistemas a utilização de polímeros naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou não, representam grande parte das alternativas utilizadas.²⁴ Adicionalmente aos polímeros, a *Química Supramolecular* também tem sido amplamente empregada no desenvolvimento de sistemas carreadores de moléculas bioativas.²⁵⁻²⁷

Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa tem utilizado tal estratégia que envolve ciclodextrinas como carreadores de peptídeos, principalmente, daqueles com ação hipotensora com o intuito de suprir as limitações descritas anteriormente para essa classe de macromoléculas.²⁰⁻²³ Dentre os diferentes peptídeos estudados com potencial atividade hipotensora pode ser destacada a

classe dos BPPs, os peptídeos potencializadores de bradicinina, que são oriundos do veneno de *Brothops jararaca*. A associação dessas moléculas com ciclodextrinas está baseada em estudos prévios dos peptídeos que demonstram a potencial aplicação dessas moléculas como fármacos com atividade anti-hipertensiva.^{20,28-31} Dentre esses peptídeos podemos destacar o BPP10c, cuja estrutura é apresentada na Figura 1.2 que possui a seguinte sequência primária: Pyr-Asn-Trp-Pro-His-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH.

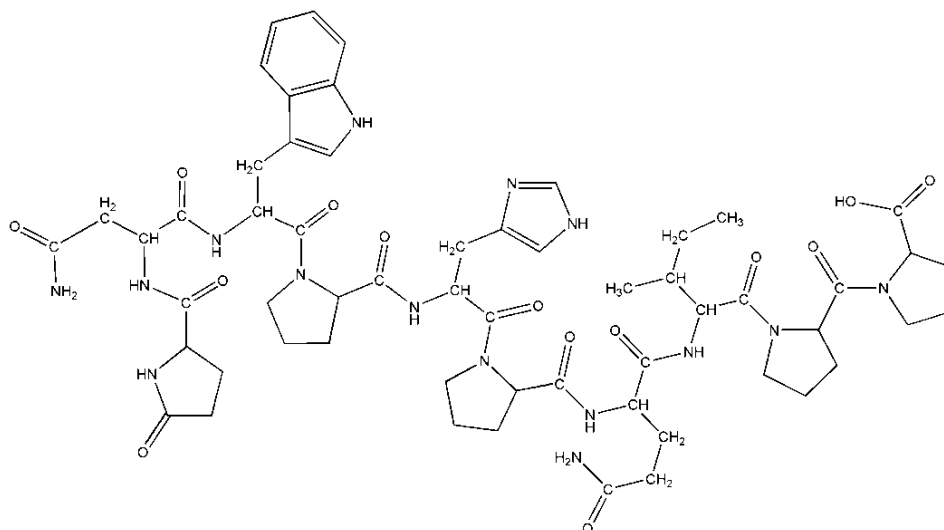


Figura 1.2: Fórmula estrutural do peptídeo BPP10c.

A área de pesquisa conhecida como química supramolecular pode ser definida como “*a química que vai além da molécula*”. Essa definição surgiu uma vez que essa área tem como objetivo principal investigar o modo como as moléculas ou as entidades isoladas se agrupam e interagem entre si, para formar sistemas ou agregados moleculares de diferentes tamanhos e com propriedades específicas.³² Estes agregados ou sistemas supramoleculares moleculares formados pela associação de duas ou mais moléculas, através de interações não covalentes, são conhecidos como supermoléculas.³³

A química supramolecular tem se difundido de forma rápida devido a sua grande contribuição em diversas áreas da ciência e da tecnologia, incluindo a nanociência e a nanotecnologia. Sendo assim, a química supramolecular pode ser dividida em três principais subáreas segundo alguns autores: (i) a química relacionada ao reconhecimento molecular, (ii) aos sistemas do tipo hóspede-hospedeiro e (iii) aos sistemas auto-organizados e aos agregados moleculares. Sistemas como os lipossomas, os surfactantes, os capsídeos, os polímeros supramoleculares e ainda as ciclodextrinas podem ser considerados sistemas supramoleculares, os quais têm sido amplamente aplicados como sistemas de liberação de fármacos.³⁴⁻³⁷ Neste contexto,

as ciclodextrinas têm desempenhado um papel importante como sistemas de liberação, principalmente por suas características multifuncionais e a sua biocompatibilidade.³⁸

Embora as ciclodextrinas tenham sido descobertas há mais de 100 anos, período no qual esta classe de moléculas foi estudada por diversas áreas da ciência e da tecnologia, a investigação dos processos de auto-organização e de auto-agregação em solução só tem sido descrita na literatura recentemente, devido ao avanço das técnicas de caracterização tanto em solução quanto no estado sólido.^{4,39-41} Para as ciclodextrinas naturais (α CD, β CD e γ CD) agregados moleculares com tamanho entre 150 a 300 nm, dependendo da concentração de ciclodextrina, do pH da solução, do modo de preparo da solução e ainda do tipo de ciclodextrina são reportados.^{4,41}

A estabilidade dos agregados moleculares formados por ciclodextrinas, considerando-as como surfactante,⁴² pode ser descrita como o balanço de forças atrativas e forças repulsivas.^{40,43,44} Além desse balanço entre forças atrativas e repulsivas, o processo de agregação ou associação dependerá também do meio no qual esse processo ocorrerá, particularmente do solvente. Sendo assim, se esse meio for alterado a estrutura supramolecular formada poderá ser quebrada.^{44,45} São descritos na literatura sistemas demonstrando a auto-organização e a auto-agregação de ciclodextrinas naturais e modificadas em solução.^{39-41,43,46,47}

Com o objetivo de caracterizar esses agregados moleculares, técnicas de microscopia têm sido amplamente utilizadas na determinação do arranjo estrutural formado, enquanto que as técnicas de espalhamento de luz têm auxiliado de forma significativa na identificação do tamanho dos agregados formados em solução.^{39,40,43,46-49} Entretanto, ainda não é bem descrita na literatura para os sistemas envolvendo as ciclodextrinas a correlação entre a forma do agregado, o número de moléculas de ciclodextrina por agregado e seu tamanho. Além disso, mesmo com o grande número de resultados disponíveis na literatura, os parâmetros termodinâmicos que comprovam o processo de auto-agregação das ciclodextrinas naturais ainda não são descritos.

No contexto dos sistemas de liberação modificada, a formação dos agregados moleculares formados pela associação de diversas moléculas de ciclodextrina pode ser um fator adicional que explicaria o perfil sustentado de liberação das moléculas hóspedes da cavidade da ciclodextrina. Isso porque, não somente um sistema do tipo hóspede-hospedeiro precisaria ser dissociado, mas sim um grande número de ligações de hidrogênio e outras forças atrativas necessitariam ser rompidas para que a molécula ativa fosse liberada para o meio, como apresentado na Figura 1.3. Outro ponto importante relacionado à auto-agregação diz respeito à formação do complexo de inclusão, para moléculas que apresentam baixa constante de afinidade com a cavidade das ciclodextrinas. Uma vez formado os agregados formados por moléculas de ciclodextrina, tais moléculas hóspedes não seriam

capazes de quebrar os agregados supramoleculares formados e desta forma não haveria a formação dos complexos de inclusão.⁵⁰

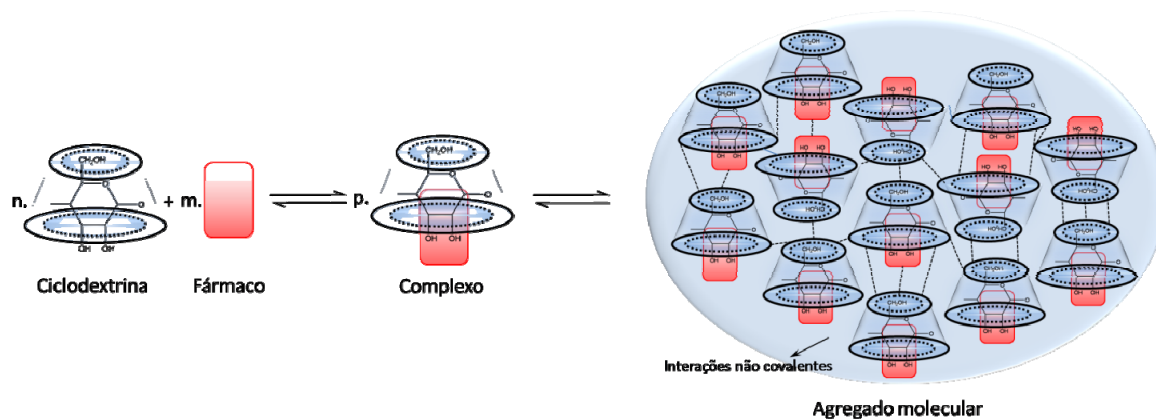


Figure 1.3: Representação esquemática do processo de auto-agregação dos complexos supramoleculares.

Diferentes sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrinas têm sido estudados pelo grupo de pesquisa, demonstrando a formação de agregados moleculares e o equilíbrio entre diferentes formas de inclusão das moléculas hóspedes na cavidade das ciclodextrinas.⁵¹⁻⁵⁵ Neste contexto, diferentes classes de fármacos foram estudadas, dentre essas os antimicrobianos (clorexidina e hidroclorotiazida), anti-depressivos (fluoxetina e imipramina) e ainda os antibióticos como a ampicilina^{56,57}, apresentada na Figura 1.4. Esses trabalhos têm demonstrado a dependência da atividade biológica do fármaco em função da concentração de ciclodextrina utilizada no preparo do complexo de inclusão.

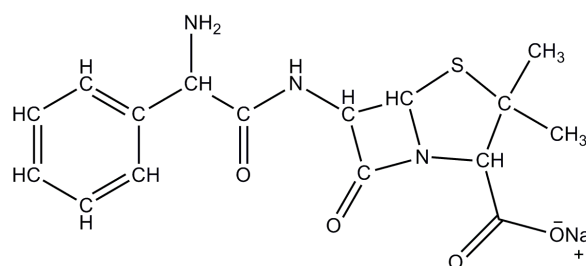


Figura 1.4: Fórmula estrutural do sal de sódio da Ampicilina.

1.2. As Ciclodextrinas e Suas Aplicações

As ciclodextrinas pertencem à classe dos oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades glicosídicas, na qual cada monômero apresenta-se na conformação do tipo cadeira e suas unidades

são unidas por ligações do tipo α -1,4.²⁷ Durante o período de descoberta das ciclodextrinas, de 1891 a meados de 1930, as três principais ciclodextrinas naturais (α -, β - e γ -ciclodextrina) foram obtidas através da hidrólise enzimática do amido. Porém, as respectivas massas moleculares e estruturas químicas foram conhecidas somente em 1938, durante o período de investigação dessas moléculas.^{27,36} Atualmente, as ciclodextrinas naturais são obtidas através da digestão enzimática do amido pela enzima *ciclodextrina glicosil transferase (CGTase)* que apresenta como vantagem ser mais ativa e específica para a produção de α CD, β CD e γ CD, Figura 1.5.²⁷

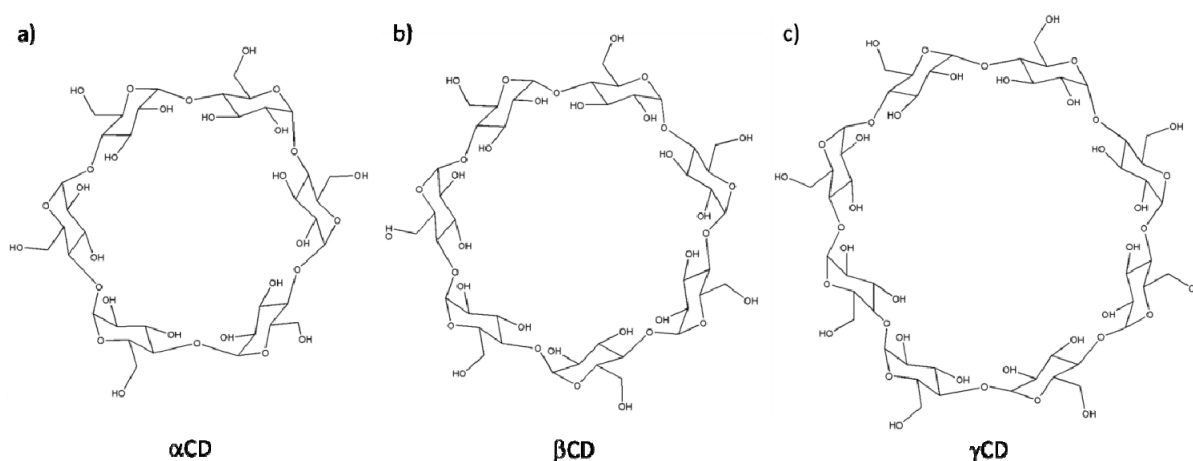


Figura 1.5: Representação estrutural da: a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina e c) γ -ciclodextrina.

Estas três ciclodextrinas, α CD, β CD e γ CD, são as principais ciclodextrinas naturais que apresentam maior interesse do ponto de vista tecnológico. Esses três macrociclos possuem respectivamente 6, 7 e 8 unidades glicosídicas. No estado sólido estas ciclodextrinas encontram-se hidratadas com uma média de 6, 11 e 17 moléculas de água, as quais podem estar localizadas tanto no interior da cavidade, quanto entre as moléculas das ciclodextrinas.⁵⁸

Além das ciclodextrinas obtidas naturalmente, macrociclos modificados podem ser sintetizados utilizando diferentes rotas sintéticas. Essas macromoléculas podem ser modificadas por diversas razões como, por exemplo, obter uma ciclodextrina com a solubilidade desejada em um solvente específico. Logo, a estratégia de síntese depende do produto final desejado; se o objetivo é uma ciclodextrina altamente solúvel em água então a substituição das hidroxilas presentes nas bordas do cone em grupos sulfatos pode ser facilmente realizada. Entretanto, se o produto de interesse é uma ciclodextrina solúvel em solventes orgânicos a substituição dos grupos hidroxila por grupos éteres deve ser realizada. Porém, em ambos os casos relatados acima, o produto final não apresentará uma substituição homogênea, dificultando a caracterização.⁵⁹ Além desses exemplos mais simples, as ciclodextrinas têm sido modificadas com diferentes grupos funcionais, formando

bis-ciclodextrinas, ciclodextrinas ligadas à cadeia lateral de polímeros e polímeros formados por diversas moléculas de ciclodextrinas entre outros exemplos.⁶⁰⁻⁶⁷

As ciclodextrinas modificadas são obtidas através da substituição das hidroxilas primárias (OH **6**) ou das hidroxilas secundárias (OH **2** e **3**), Figura 1.6. Dois fatores importantes devem ser considerados na síntese das ciclodextrinas modificadas: a nucleofilicidade das hidroxilas e a habilidade das ciclodextrinas em formarem complexos de inclusão com os reagentes utilizados na síntese. Dentre as três hidroxilas presentes nas ciclodextrinas, aquelas localizadas na posição **6** são as menos ácidas. Os grupos localizados nas posições **2** são os mais ácidos e os grupos na posição **3** os mais inacessíveis.^{68,69} Desta forma, sob condições normais, um reagente eletrofílico irá atacar as hidroxilas nas posições **6**, entretanto, reagentes mais reativos atacam as hidroxilas da ciclodextrina de forma menos seletiva, levando a mistura de produtos mono-, di- ou trissubstituídos reagindo ainda com as hidroxilas primárias e/ou secundárias localizadas nas duas faces da molécula de ciclodextrina.⁵⁹

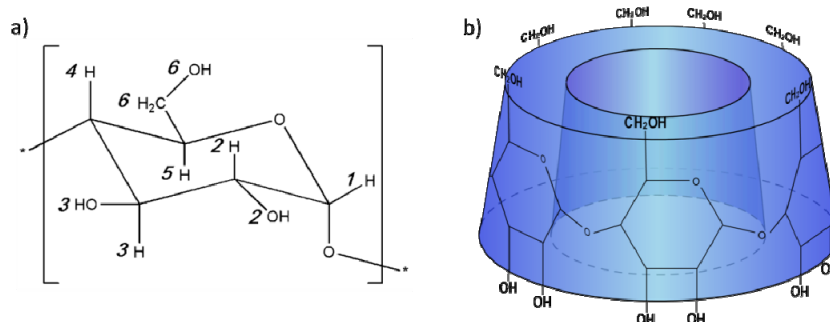


Figura 1.6: a) Fórmula estrutural da unidade glicosídica da ciclodextrina na conformação cadeira e b) representação esquemática da estrutura da β -ciclodextrina.

As propriedades físicas e químicas das ciclodextrinas estão diretamente relacionadas à estrutura das mesmas. As ligações glicosídicas ($C_1-O_1-C_4$) presentes na ciclodextrina, fazem com que a estrutura seja relativamente rígida e não perfeitamente simétrica. A geometria das ciclodextrinas é comumente descrita como sendo a de um cone truncado e como consequência da conformação de cadeira dos monômeros, as hidroxilas primárias encontram-se situadas na borda de menor diâmetro do cone, enquanto que as hidroxilas secundárias estão localizadas na borda de maior diâmetro da molécula, como apresentado na Figura 1.7.⁵⁸

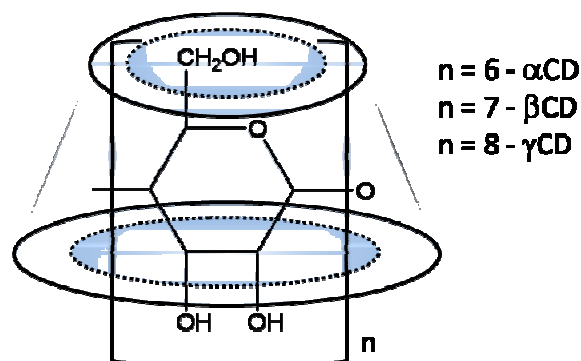


Figura 1.7: Representação esquemática da estrutura em cone da ciclodextrina.

Embora as ciclodextrinas sejam relativamente solúveis em água, uma diferença de solubilidade é observada entre a αCD ($145,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a βCD ($18,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a γCD ($232,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta diferença é explicada pela formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias (OH 2 e 3). A estrutura mais rígida observada para a βCD é consequência da formação de ligações de hidrogênio entre todas as hidroxilas secundárias, conferindo a βCD uma menor solubilidade em água do que a αCD e a γCD . Como a αCD apresenta uma unidade glicosídica distorcida, as seis possíveis ligações de hidrogênio intramoleculares não ocorrem, favorecendo assim a sua alta solubilidade em água. Já a maior solubilidade observada para a γCD deve-se ao fato desta apresentar uma estrutura mais flexível, desfavorecendo as interações intramoleculares, levando a sua maior solubilidade em água.⁵⁸ Alguns autores atribuem ainda que as diferentes de solubilidades observadas para a α -, β - e γCD estão relacionadas com a formação de agregados moleculares em solução, diminuindo a solubilidade das ciclodextrinas.⁴¹

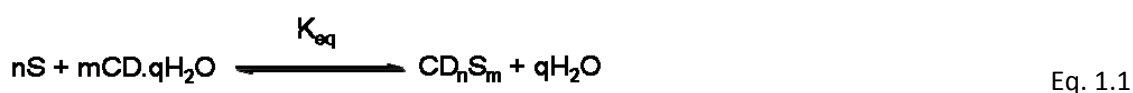
Embora algumas hidroxilas localizadas na parte externa do cone estejam comprometidas efetuando ligações de hidrogênio intramoleculares, as ciclodextrinas possuem uma capacidade de serem solvatadas, o que confere um caráter hidrofílico a esta parte da molécula. No interior da cavidade das ciclodextrinas encontram-se presentes os hidrogênios dos grupos CH 3 e 5 e ainda os grupos $\text{C}_1\text{-O}_1\text{-C}_4$, os quais fazem ligações de hidrogênio com as moléculas de água presentes na cavidade. Essas ligações de hidrogênio apresentam um alto caráter energético, quando comparadas com ligações de hidrogênio convencionais presentes em solução. Desta forma, esse aspecto contrário a presença das moléculas de água no interior da cavidade confere a esta parte da molécula um caráter mais hidrofóbico.⁵⁸

Devido a essas propriedades citadas anteriormente sobre as ciclodextrinas, como a solubilidade, características anfífilas, sua biocompatibilidade e seu baixo custo, estas macromoléculas têm sido amplamente utilizadas com sistemas hospedeiros para outros tipos moléculas através da formação de complexos de inclusão ou complexos de associação.^{27,36,38,58,70,71}

As interações intermoleculares como as ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, efeito hidrofóbico e interações eletrostáticas são as principais forças que estabilizam esses sistemas supramoleculares.^{72,73} Esses sistemas do tipo hóspede-hospedeiro envolvendo ciclodextrinas têm sido extensivamente investigados para diversas classes de moléculas, orgânicas ou inorgânicas,^{26,73-80} com aplicações na indústria têxtil, de alimentos, de cosméticos e farmacêutica, nesta última tendo como principal foco a busca por sistemas modificados de liberação de fármacos.^{26,27,71,81}

As ciclodextrinas têm demonstrado um papel importante no contexto farmacêutico, uma vez que após a formação do complexo de inclusão, as ciclodextrinas são capazes de alterar propriedades físicas, químicas e biológicas das moléculas incluídas. Para alguns fármacos incluídos em ciclodextrinas, a solubilidade pode ser modificada, aumentando a sua biodisponibilidade e consequentemente reduzindo os efeitos colaterais pré-existentes.⁸² Além disso, um aumento na estabilidade física e química pode ser obtido com a complexação com a ciclodextrina, eliminando propriedades indesejadas.³⁸

O processo de formação dos complexos de inclusão em solução pode ser descrito pela saída das moléculas de água do interior da cavidade, com posterior inclusão da molécula hospede, ou parte desta na ciclodextrina, como descrito nas Equações 1.1 e 1.2. Na qual “S” é a molécula hóspede, “CD” a ciclodextrina “CD_nS_m” o complexo de inclusão. Os índices estequiométricos da reação são representados por “n”, “m”, “q” e “K_{eq}” a constante de equilíbrio.⁷⁶



Ou de forma simplificada



Entretanto, os parâmetros termodinâmicos para o processo de inclusão nem sempre são obtidos de forma simples e direta. Isso porque as técnicas de caracterização físico-químicas existentes e aplicadas aos sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrinas não são capazes de distinguir as espécies livres (a ciclodextrina e a molécula hospede não complexada) das espécies complexadas (complexos de inclusão).⁸³ Outra limitação dos modelos existentes para determinação dos parâmetros termodinâmicos de complexação é a impossibilidade de obtenção destes dados quando há a possibilidade de existirem diferentes estequiometrias em solução simultaneamente,

como por exemplo, sistemas envolvendo a interação de uma ciclodextrina com duas moléculas hóspedes, duas ciclodextrinas com uma única molécula hóspede ou ainda a presença de agregados moleculares.^{51,52,84,85} Isso porque os modelos matemáticos utilizados nos cálculos da constante de formação assumem que o complexo hóspede-hospedeiro formado é uma solução ideal, na qual esse complexo é individual e independente dos outros, não levando em consideração agregados moleculares formados ou existência de diferentes estequiometrias.⁸³

Aproveitando-se das propriedades relacionadas às interações não covalentes envolvendo as ciclodextrinas e as moléculas hóspedes, esses macrociclos têm sido aplicados em diferentes materiais.^{60,75,77} Dentre esses materiais a associação das ciclodextrinas com polímeros tem tido grande destaque. Essas associações podem acontecer através da síntese de polímeros à base de ciclodextrinas, nos quais as moléculas de ciclodextrina são ligadas covalentemente com a utilização de um ligante ponte entre os macrociclos, formando as poli-ciclodextrinas.^{60,62,86,87} A interação dessas poli-ciclodextrinas com outros polímeros podem levar a formação de hidrogéis devido a inclusão de parte da cadeia lateral do polímero hóspede nas cavidades das ciclodextrinas, favorecendo a utilização como sistema de liberação de fármaco.⁶⁰

Outra possibilidade de associação das ciclodextrinas com polímeros é através da modificação da cadeia lateral do polímero com a molécula de ciclodextrina.⁶¹ Logo, esse novo polímero apresentará propriedades oriundas das ciclodextrinas e ainda aquelas presentes no sistema polimérico, ampliando as aplicações dos materiais obtidos em áreas tais como a de sistemas de liberação de fármacos na forma de micro- e nanoesferas, hidrogéis, filmes finos e nanofibras.^{60,67,88,89}

Uma alternativa para ampliar a utilização dos materiais poliméricos modificados com ciclodextrinas seria o emprego de técnicas de produção de estruturas poliméricas com diferentes arranjos.⁹⁰ Dentre essas metodologias, a técnica de eletrofiação poderia ser uma alternativa, devido a sua grande versatilidade na obtenção de diferentes arranjos estruturais a base polimérica.

1.3. Eletrofiação

O processo que utiliza forças eletrostáticas para formar fibras sintéticas é chamado de eletrofiação. Essa metodologia é conhecida há mais de 100 anos e possui seus fundamentos baseados em estudos anteriores.^{91,92} A evolução do uso de corrente elétrica para a obtenção de fibras iniciou-se em 1745, quando Bose descreveu a formação de aerossol através da aplicação de um corrente elétrica alta em soluções. O primeiro equipamento que utilizou corrente elétrica para a obtenção de um jato líquido foi patenteado por Cooley e Morton em 1902 e 1903. Porém, somente

em 1934, Anton Formhals patenteou o primeiro equipamento no qual fibra polimérica a base de celulose utilizando-se como solvente acetona/álcool pôde ser obtida, demonstrando a viabilidade do processo de eletrofiação.⁹¹

Embora a invenção de Formhals apresenta grandes avanços comparados aos métodos descritos anteriormente, alguns problemas ainda eram observados em seu equipamento. Um desses problemas estava relacionado com a curta distância entre o bico injetor e a placa coletora. A pequena distância entre os eletrodos impossibilitava a evaporação completa do solvente durante o processo de obtenção das fibras, fazendo com que fossem obtidas fibras poliméricas com superfície irregular e de difícil remoção da placa coletora. Entretanto, em uma segunda patente, uma maior distância entre os eletrodos foi utilizada solucionando esse problema observado previamente. Adicionalmente a maior distância utilizada, múltiplos bicos injetores, bem como, as diferentes orientações entre os eletrodos também foram descritas nesse trabalho.⁹¹

Apesar dessas e de outras publicações sobre a técnica de eletrofiação, somente na década de 90 o processo de obtenção de fibras poliméricas recebeu atenção substancial pela comunidade acadêmica. Esse feito deve-se às pesquisas iniciadas pelo grupo de pesquisa do professor Darrel H. Reneker, da Universidade de Akron.^{92,93}

Em um típico experimento de eletrofiação em escala laboratorial, a solução de um polímero é bombeada através de uma agulha fina ou bico injetor com diâmetro na ordem de 100 μm , como representado na Figura 1.8a.

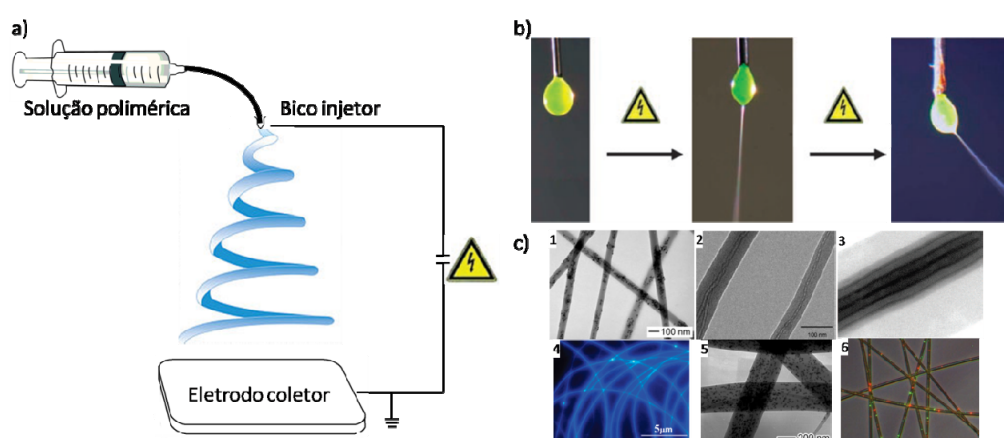


Figura 1.8: a) representação esquemática do aparelho de eletrofiação b) formação do cone de Taylor para a solução de oxido de polietileno a 5 % após diferentes voltagens aplicadas⁹² c) nanofibras obtidas por eletrofiação de: (1) polivinilpirrolidona com nanopartículas de óxido de ferro⁹⁴, (2) óxido de polietileno com nanotubos de carbono⁹⁵, (3) nanofibras concêntricas do copolímero poliestireno-β-dimetilsilixano com ácido polimetacrílico⁹⁶, (4) copolímero fluoreno-trifenilamina com zeólita fluorescente⁹⁷, (5) polivinilpirrolidona com AgS⁹⁸ e (6) poliuretano.⁹⁹

O bico injetor de metal irá servir como eletrodo, na qual uma corrente elétrica é aplicada. A uma distância aproximada de 10 a 25 cm é posicionado um eletrodo com polaridade contrária àquela aplicada no bico injetor ou ainda pode ser utilizada uma placa coletora aterrada, a qual servirá de placa suporte para as fibras formadas. O alinhamento entre os eletrodos, bico injetor e placa coletora, é significativo no processo de obtenção das fibras para favorecer o jato polimérico. Porém, esses dois eletrodos podem ser posicionados tanto horizontal quanto verticalmente, Neste último as fibras podem ser obtidas de baixo para cima.^{91,92,100-102}

A diferença de voltagem aplicada entre o bico injetor e a placa coletora é responsável por uma deformação em forma de cone na gota polimérica pendente presente no bico injetor, como demonstrado na Figura 1.8b. Para a obtenção da gota pendente pode ser utilizada bomba peristáltica, a força gravitacional ou mesmo um fluxo de gás. O cone formado durante a formação da fibra é conhecido como cone de Taylor, em homenagem às pesquisas de Geoffrey Taylor nos anos 60 que identificou esse fenômeno.¹⁰³ Durante o tempo no qual o jato de polímero é formado do bico injetor até placa coletora ocorre a evaporação do solvente, levando assim a deposição da fibra seca no coletor.

Uma razão para o crescente interesse na área das fibras obtidas por eletrofiação deve-se às suas aplicações práticas e acadêmicas em diferentes áreas da ciência, como demonstrado no exemplo da Figura 1.8c, na qual diferentes polímeros foram utilizados para a obtenção de fibras funcionalizadas com diferentes materiais. Esse aumento na pesquisa de fibras obtidas por eletrofiação pode ser confirmado também pelo crescimento exponencial no número de patentes e publicações na área no período de 1994 a 2006, além da possibilidade de obtenção de fibras poliméricas em condições laboratoriais e ainda em escala industrial.⁹²

A utilização da técnica de eletrofiação possibilita a obtenção de fibras únicas com diâmetros que podem variar entre 10 e 10.000 nanômetros.^{90,92,104} Essa capacidade de obtenção de fibras em uma escala compatível com a escala biológica tem renovado ainda mais o interesse pela técnica, levando a aplicações em áreas tais como a de engenharia de tecidos e sistemas de liberação de fármacos, além de aplicações em sistemas de filtração e purificação de materiais em solução, como apresentado na Figura 1.9.^{91,105}

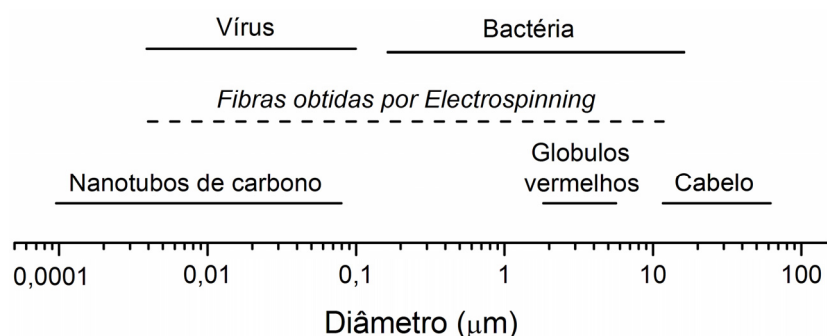


Figura 1.9: Comparação de tamanho entre fibras obtidas por eletrofiação e outros materiais.⁹¹

Embora a técnica de eletrofiação possibilite a obtenção de fibras com diferentes propriedades de superfície e diâmetros, existem alguns parâmetros que podem influenciar de forma significativa na formação desses materiais e em sua estrutura. Dentre esses parâmetros podemos destacar a diferença de voltagem aplicada entre o bico injetor e a placa coletora, fluxo de injeção da solução de polímero e a distância entre os eletrodos injetor e coletor.^{91,106}

Uma das principais diferenças observadas na morfologia das fibras é verificada quando a voltagem aplicada ao bico injetor é reduzida, originando gotas poliméricas no meio das fibras como demonstrado na Figura 1.10a, quando comparado com aquelas fibras que apresentam uma superfície regular, Figura 1.10b. A presença das gotas poliméricas na estrutura das nanofibras não é prejudicial para a estrutura do material, essas gotas muitas vezes são necessárias para que propriedades específicas de superfície sejam adquiridas.^{107,108} Dentre as propriedades mais afetadas destaca-se a alteração do caráter hidrofílico da superfície do material. Nesse sentido a presença de gotas poliméricas aumenta a hidrofobia da superfície devido ao aumento da rugosidade do material. Porém, é observada uma redução na propriedade mecânica das fibras, uma vez que grande parte do polímero encontra-se presente nas gotas poliméricas e não nas fibras.¹⁰⁹

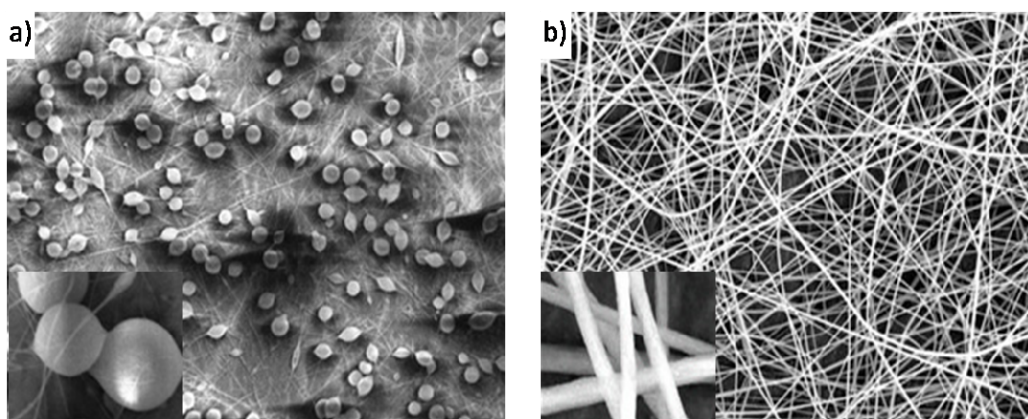


Figura 1.10: Fibras obtidas por eletrofiação a base de a) poliestireno em dimetilformamida a 10 % e b) poliestireno em dimetilformamida 10 % em presença de β -ciclodextrina.¹¹⁰

O parâmetro de fluxo de injeção influencia diretamente no diâmetro das fibras obtidas, desta forma, quanto maior o fluxo de injeção maior o diâmetro das fibras. Já a distância entre a placa coletora e o bico injetor irá influenciar na secagem das fibras, portanto quanto maior a distância utilizada maior a possibilidade de obtenção de fibras secas na placa coletora.⁹¹ A concentração do polímero também é um fator que influencia na obtenção das fibras, uma vez que soluções muito concentradas impedem a formação do jato de fibra. Além desses parâmetros, a volatilidade e a condutividade do solvente influenciam na presença de poros na estrutura da fibra e na estabilidade do jato polimérico, como mostrado respectivamente nas Figuras 1.11a, 1.11b, 1.11c e 1.11d.⁹¹ Embora, uma relação geral possa ser verificada entre os parâmetros de obtenção das fibras e sua morfologia, é importante ressaltar que essa relação pode variar para cada sistema polímero/solvente.

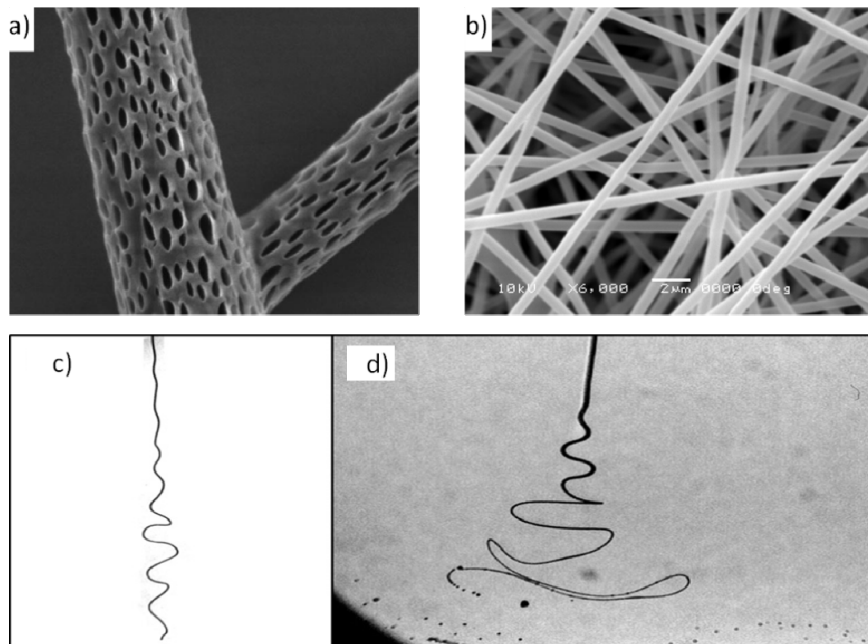


Figura 1.11: Nanofibras obtidas por eletrospinning: a) ácido poli lático em THF⁹², b) ácido poli (metacrílico) em DMF⁶⁷ e óxido polietileno em c) água e d) água destilada.¹¹¹

Com a ampla diversidade de fibras obtidas por eletrospinning nas mais diversas formas e com a utilização de diferentes polímeros, a aplicação desses materiais tem se expandido a cada dia, originando materiais com propriedade de filtração, sistemas de liberação de fármacos, matrizes para crescimento de tecidos e ainda com aplicação em equipamentos eletrônicos.¹¹² Dentre os diversos materiais que podem ser inseridos na matriz polimérica das fibras, aqueles materiais ou moléculas com propriedades fotocromáticas têm sido investigados para diversas aplicações.¹⁰⁰

Moléculas fotocromicas são aquelas que apresentam a capacidade de mudar de cor quando irradiadas por um comprimento de onda específico, cujo processo pode ser revertido pela irradiação com outro comprimento de onda. Geralmente, as moléculas fotocromicas apresentam propriedades solvatocromicas e termocromicas, onde o solvente ou temperatura também são capazes de isomerizar a molécula.¹¹³ A classe dos espiropiranos compreende um grupo de moléculas orgânicas que podem ser modificadas pela irradiação de luz, permitindo processos reversíveis entre a forma sem cor de cadeia fechada, forma espiro (SP), e a forma colorida de cadeia aberta, forma merocianina (MC), Figura 1.12.¹¹⁴ As moléculas de espiropiranos são moléculas que apresentam resposta fotocromica, solvatocromica e termocromica, as quais envolvem a quebra da ligação C-O da molécula e a ionização na dupla ligação.¹¹⁵

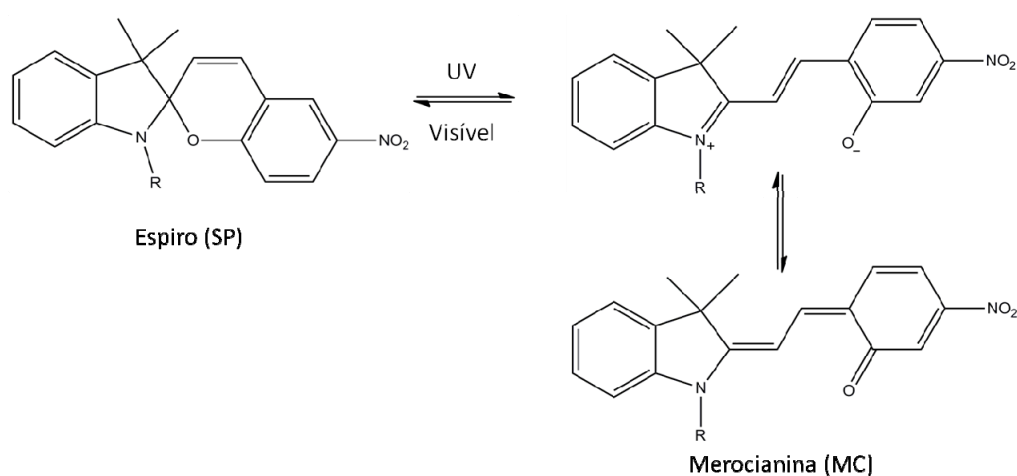


Figura 1.12: Estruturas da molécula de espiro (SP) e merocianina (MC) que são obtidas pela irradiação por luz ultravioleta e visível.

Enquanto a molécula de MC apresenta uma grande conjugação do sistema π e alto momento de dipolo devido à natureza zwitteriônica, a molécula na forma SP não é completamente conjugada, apresenta os anéis aromáticos perpendiculares, são neutras e possuem um pequeno momento de dipolo.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Assim como outros materiais dependentes de estímulos externos para serem utilizados, os materiais fotocromicos dependem da irradiação para que a isomerização ocorra.^{119,120}

Os espiropiranos foram caracterizados inicialmente na década de 50¹²¹ e desde então essas moléculas têm sido incorporadas em diferentes matrizes orgânicas ou inorgânicas com aplicações que vão de dispositivos ópticos a materiais biocompatíveis.^{100,114,116,122,123} O ambiente químico e físico ao redor dessas moléculas podem alterar significativamente suas propriedades fotocromicas como, o número de vezes que a molécula pode ser isomerizada ou mesmo determinar qual das formas isoméricas é a mais estável.¹¹⁶ Para os espiropiranos, dois tipos de fotocromismo têm sido

observados, o normal quando a forma fechada é observada em ambientes escuros (sem luz) e o fotocromismo reverso, quando a forma aberta e colorida, é a mais estável em solução na ausência de luz.^{124,125}

O fenômeno de fotocromismo reverso tem sido atribuído a estabilização da forma aberta via ligação de hidrogênio com o microambiente ao redor da molécula.^{124,126} Neste sentido, uma forma de manter ou mesmo adaptar as propriedades físicas e químicas dessa classe de moléculas pode ser através da encapsulação destas em uma matriz apropriada.¹²⁷ Isso tem sido feito tanto pela modificação química da molécula ou pela adição não covalente destas no interior de matrizes poliméricas^{119,128,129} ou na cavidade das ciclodextrinas utilizando-se dos princípios da química supramolecular e da nanotecnologia.^{116,125} Nesse sentido, a utilização de sistemas nanométricos com diferentes arranjos espaciais pode favorecer e viabilizar o emprego desses materiais fotocromicos e ainda direcionar a aplicação desses nanomateriais para diferentes sistemas, como por exemplo, sistemas de liberação de fármacos, dispositivos ópticos, eletrônicos e para biosensores.

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivos Gerais:

Face ao apresentado sobre o estado da arte para os sistemas envolvendo as ciclodextrinas e as suas aplicações, o presente trabalho tem como objetivo geral preparar e caracterizar os sistemas supramoleculares envolvendo a β -ciclodextrina e as moléculas hóspedes com potencial farmacêutico. Além de sintetizar materiais inteligentes através da associação da β CD com matrizes poliméricas.

1.4.2 Objetivos Específicos:

Preparar os complexos de inclusão entre a β -ciclodextrina e as moléculas hóspedes: BPP10c e a Ampicilina.

Caracterizar os sistemas supramoleculares formados pela interação entre a β -ciclodextrina e as moléculas hóspedes utilizando diferentes técnicas de caracterização em solução.

Investigar os parâmetros termodinâmicos de interação entre as moléculas hóspedes e a β -ciclodextrina com o objetivo de propor o arranjo espacial formado pelo complexo de inclusão.

Investigar o processo de auto-agregação da β -ciclodextrina tanto em solução aquosa quanto no estado sólido, determinando o ponto da concentração de agregação crítica, os parâmetros

termodinâmicos de interação entre as moléculas e o número de moléculas de ciclodextrina por unidade de agregado.

Avaliar a influência de um fármaco hidrossolúvel no processo de auto-agregação da β CD para inferir não somente sobre o arranjo espacial formado.

Sintetizar materiais poliméricos com propriedades fotocromicas a base de β -ciclodextrina.

Caracterizar o sistema polimérico e a β -ciclodextrina modificada para confirmar a estrutura das moléculas sintetizadas.

Investigar a cinética de isomerização para determinar a velocidade de interconversão dos isômeros da molécula fotocromica presente nos materiais sintetizados.

Determinar a reversibilidade da molécula fotocromica para conhecer o número de vezes que a molécula poderá ser isomerizada.

Preparar nanofibras a base desse polímero com o intuito de estudar as propriedades desse material, caracterizando esses materiais tanto por técnica de microscopia quando por técnica espectroscópica.

Caracterizar as propriedades de superfície, como a hidrofobia e a hidrofilia, em função do tipo de isômero por técnica de ângulo de contato da água com a superfície do material.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Todos os reagentes (solventes e matérias-primas) foram utilizados como recebidos sem purificação prévia. O peptídeo BPP10c foi gentilmente cedido pelo COINFAR, Consórcio das Indústrias Farmacêuticas – Pesquisa e Desenvolvimento Ltda.

Código	β CD
Fórmula molecular	$C_{42}H_{70}O_{35} \cdot 11H_2O$
Massa molecular média	$1135 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Solubilidade em água a 25 °C ⁵⁸	$15,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
Ponto de fusão ¹³⁰	311,31 °C
Fabricante	Xiamem Mchem Pharma LTD
Lote	20031210

Código	BPP10c
Seqüência primária	Pyr*-Asn-Trp-Pro-His-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH
Fórmula molecular	$C_{57}H_{77}N_{15}O_{14}$
Massa molecular média	$1196,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Solubilidade em água	Pelo menos $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
Fabricante	Bachem
Lote	B03264

*Pyr – Ácido Piroglutâmico.

Outros reagentes e solventes:

1. Água tipo 1: Milli-Q – Millipore.
2. Água tipo 1: Milli-Q – Millipore filtrada em membrana Durapore (Millipore) 0,1 μm .
3. Óxido de deutério (D_2O): Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 99,9 % de pureza.
4. Dimetil sulfóxido d_6 : Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 99,9 % de pureza.
5. 1,3-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC): Sigma-Aldrich.
6. 2,3,3 trimetil 3H indol: Sigma-Aldrich.
7. Ácido 3-iodo propiônico. Sigma-Aldrich.
8. 2-hidroxi 5-nitrobenzaldeído: Sigma-Aldrich.

9. Piperidina: Sigma-Aldrich.
10. 2-Butanona: Sigma-Aldrich.
11. 3-iodo 1-propanol: Sigma-Aldrich.
12. Tetrahidrofurano: Sigma-Aldrich.
13. N,N-dimetil formamida: Sigma-Aldrich.
14. Piridina: Sigma-Aldrich.
15. Diclometano: OmniSolv.
16. Triclorometano: OmniSolv.
17. Dimetilformamida: Sigma-Aldrich.
18. Ácido Poli (metacrílico): Polyscience, Inc.
19. Ampicilina: Sigma-Aldrich.
20. Ácido α -ciano-4-hidrocinâmico: Sigma-Aldrich.
21. 2,5-dihidroxibenzóico: Sigma-Aldrich.

2.2. Descrição dos Experimentos

2.2.1. Preparo do complexo de inclusão

Para o preparo dos complexos de inclusão entre as moléculas hóspede e a molécula hospedeira foi utilizado o método de liofilização.^{23,25,51,52} Este método de preparo consiste em solubilizar tanto a molécula hóspede quanto a β CD em solução aquosa, mantendo-os sob agitação por um tempo suficiente para que o equilíbrio entre as espécies livres e complexadas seja atingido, formando assim o complexo de inclusão. Para os dois sistemas estudados, a solução foi mantida sob agitação por pelo menos três horas. Após o período de agitação, a solução foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e então o material foi submetido ao processo de liofilização até que o sólido seco fosse obtido.

Para ambos os sistemas foram utilizadas uma razão molar de 1:1 entre a molécula hospedeira (β -ciclodextrina) e as moléculas hóspedes (BPP10c ou Ampicilina). Para o sistema supramolecular formado entre o peptídeo e a β CD, foram dissolvidos em aproximadamente 50 mL de água 47,4 e 50,0 mg de β -ciclodextrina e de BPP10c, respectivamente. Para o sistema formado entre a Ampicilina e a β -ciclodextrina foram utilizadas as massas de 152,8 e 50,0 mg, respectivamente, para a molécula hóspede e para a hospedeira.

2.2.2. Síntese das moléculas SP, β CD_{SP}, PMAA β CD_{SP} e PMAA_{SP}

Abaixo é descrita a síntese da molécula de espiropirano, Figura 2.1, segundo trabalhos previamente descritos na literatura.^{131,132} Foram sintetizadas duas moléculas de espiropirano diferentes, cuja a diferença entre estas moléculas encontra-se no grupo “R”, parte alifática da molécula, como apresentado na Figura 2.1. Logo, dois grupos funcionais foram posicionados na parte terminal da cadeia alifática: o ácido propílico (–CH₂CH₂COOH) e o álcool propílico (–CH₂CH₂CH₂OH). A síntese das duas moléculas, uma contendo o grupo ácido carboxílico (SPCOOH) e outra com o grupo álcool (SPCOH) na parte alifática da molécula, foi necessária para a síntese da β -ciclodextrina modifica (β CD_{SP}) e do polímero modificado (PMAA_{SP}), respectivamente.

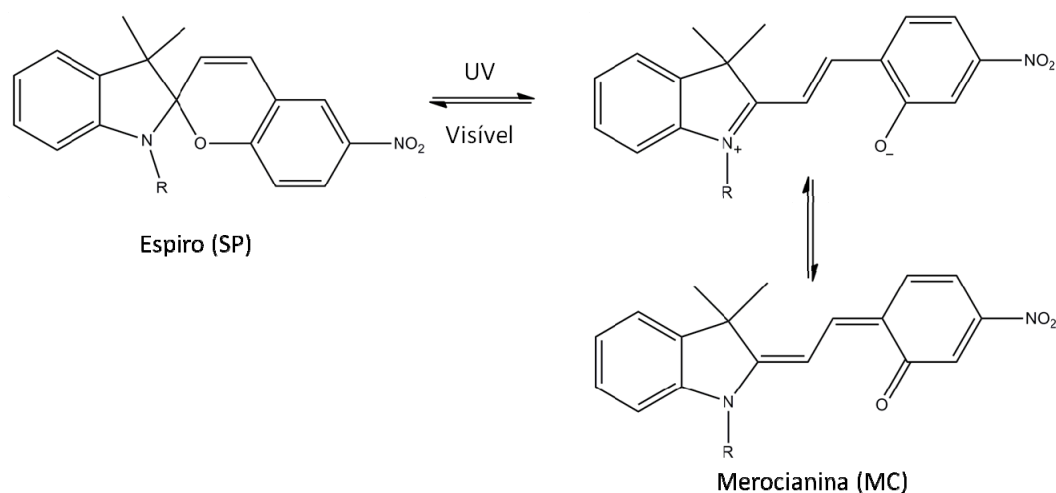


Figura 2.1: Fórmula estrutural dos isômeros da molécula de espiropirano.

A molécula de SPCOOH, aquela com o grupo ácido terminal, foi sintetizada de acordo com Fissi et. al. 1995. Para isso, foi feita a reação do 2,3,3-trimetil-3H-indol (10, 1 mL, 0,06 mol.L⁻¹) com o ácido 3-iodo-1-propiónico (12,6 g, 0,06 mol.L⁻¹) sob aquecimento a 100 °C (refluxo) em atmosfera de argônio durante três horas. O material sólido, iodeto de 1-(β -carboxietil)-2,3,3-trimetil-3H-indol, resultante da reação, foi dissolvido em água (aproximadamente 100 mL) e essa solução aquosa foi lavada com clorofórmio e a água removida a baixa pressão. O sólido obtido a partir da fase aquosa, após secagem em estufa, foi utilizado para a etapa seguinte da reação sem purificação prévia.

Desta forma, 14 g (0,04 mol.L⁻¹) do iodeto de 1-(β -carboxietil)-2,3,3-trimetil-3H-indol, 6,5 g (0,04 mol.L⁻¹) de 2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído e 3,8 mL (0,04 mol.L⁻¹) de piperidina foram dissolvidos em 2-butanona e a solução agitada por três horas sob refluxo a 78 °C em atmosfera de argônio. Após esse período, a temperatura e a agitação foram desligadas e o material foi mantido em repouso

durante 12 horas, para que um precipitado amarelo fosse obtido. Esse material foi filtrado, lavado com metanol e seco em estufa, originando o SPCOOH (75 % de rendimento).

A síntese da molécula com o grupo funcional álcool na parte terminal da cadeia alifática (SPCOH) foi realizada de forma semelhante àquela descrita anteriormente para a molécula de SPCOOH.¹³² Logo, 10 mL (0,06 M) do 2,3,3-trimetil-3H-indol foi adicionado ao álcool 3-iodo-1-propanol (11,7 g, 0,06 M) sob aquecimento a 100 °C sob refluxo, em atmosfera de argônio durante três horas. O material resultante da reação foi dissolvido em água (aproximadamente 100 mL) e essa solução aquosa foi lavada com clorofórmio e a água removida a baixa pressão, dando origem a um óleo amarelado, o qual foi utilizado na segunda etapa da reação.

Aproximadamente 14 g do material obtido anteriormente, 6,5 g (0,04 mol.L⁻¹) de 2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído e 3,8 mL (0,04 mol.L⁻¹) de piperidina foram dissolvidos em 2-butanona e a solução agitada por três horas (refluxo) a 78 °C em atmosfera de argônio. Após esse período, a temperatura foi desligada assim como a agitação e o material foi mantido em repouso durante 12 horas, para que um precipitado roxo escuro fosse obtido. O material foi filtrado, lavado com etanol e seco em estufa, originando o SPCOH (70 % de rendimento).

Para essa síntese foram dissolvidos em piridina (aproximadamente 40 mL), 0,76 g (2,0 mmol.L⁻¹) de SPCOOH (**1**) em presença de 1,03 g (5,0 mmol.L⁻¹) de 1,3-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) (**2**) e a solução mantida sob agitação durante 10 minutos em atmosfera de argônio, dando origem ao intermediário (**3**).

A essa solução foi adicionado 2,3 g (2,0 mmol.L⁻¹) de β-ciclodextrina (**4**) dissolvidos em aproximadamente 50 mL de piridina. Durante a adição da solução de βCD à solução de SPCOOH a reação foi resfriada com banho de gelo, permanecendo assim durante 12 horas. A agitação foi mantida por mais 24 horas a temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi filtrada para remover a diciclohexilureia (DCU) (**4**). O solvente (piridina) foi removido a baixa pressão e o sólido obtido lavado com diclorometano e filtrado.

Para a separação da ciclodextrinas di- e trissubstituídas com a molécula de SPCOOH o sólido resultante foi dissolvido em água (200 mL) a aproximadamente 50 °C e a solução filtrada. A solução aquosa resultante foi adicionada tetrahidrofurano para precipitar a β-ciclodextrina não modificada. O procedimento de recristalização foi repetido várias vezes para remover toda a β-ciclodextrina que não reagiu. O THF foi removido a baixa pressão e a solução aquosa resultante foi liofilizada para obtenção de um sólido roxo βCD_{SP} (**6**) (25 % de rendimento).¹³³⁻¹³⁵

A estratégia de síntese utilizando DCC e piridina como solvente foi utilizada para a síntese do polímero modificado com a βCD_{SP}, o PMAAβCD_{SP}. Desta forma, 1,5 g de do ácido poli (metacrílico) e 0,32 g de DCC foram dissolvidos em 20 mL de piridina. A solução de βCD_{SP}, 1,5 g em 30 mL de

piridina, foi adicionada a solução contendo o polímero. A solução resultante foi mantida sob agitação por três dias a temperatura ambiente em atmosfera de argônio. Foi adicionado aproximadamente 5 mL de solução de NaOH a 0,25 % p/v a essa solução para que o DCC precipitasse como DCU. Essa solução foi seca a baixa pressão, removendo a piridina, e o material sólido lavado com diclorometano para remover o DCC e o DCU. Para a purificação do material o sólido resultante foi dissolvido em água e essa solução dialisada em água durante cinco dias utilizando Slide-A-Lyzer dialysis cassettes MWCO 20 KDa, Pierce. O material resultante dentro da cela de diálise foi congelado e liofilizado para obtenção do polímero modificado, PMAA β CD_{SP} (70 % de rendimento).

Para a síntese do polímero com a molécula de SPCOH, o PMAA_{SP}, o mesmo procedimento acima foi utilizado. Porém, nesse caso 0,32 g DCC foram adicionados à solução do polímero 1,5 g com posterior adição da solução de SPCOH 0,32 g em piridina. O procedimento de secagem e purificação foi realizado da mesma forma como descrito para o polímero PMAA β CD_{SP}.

2.2.3. Ressonância Magnética Nuclear

Para o peptídeo, BPP10c, foram utilizadas soluções de D₂O e D₂O/H₂O a 10 % de solvente deuterado. Os experimentos foram obtidos a temperatura de 5 e 20 °C em espectrômetro Bruker DRX 400 AVANCE (400 MHz) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais e Varian INOVA – 500 AS (500 MHz), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS em Campinas, São Paulo.

Para a caracterização estrutural do BPP10c foram utilizados experimentos uni- e bidimensionais, dentre esses: experimentos hidrogênio (¹H), carbono (¹³C) e o método de intensificação da distorção por transferência de polarização, “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*”, (DEPT). Esse experimento permite a determinação dos carbonos hidrogenados e a distinção entre os grupos CH₃, CH₂ e CH.¹³⁶ Os experimentos bidimensionais homonucleares utilizados foram ¹H/¹H TOCSY “*Total Correlation Spectroscopy*” e ¹H/¹H 2D NOESY “*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*” e heteronucleares ¹H/¹³C HSQC “*Heteronuclear Single Quantum Coherence*”, ¹H/¹³C HMBC “*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*”. Os experimentos de ¹H/¹H TOCSY e ¹H/¹H NOESY permitem identificar correlações escalares e dipolares, respectivamente entre os hidrogênios. Os experimentos heteronucleares ¹H/¹³C HSQC permitem identificar correlações diretas entre carbonos e hidrogênios, enquanto que o experimento de ¹H/¹³C HMBC possibilita correlacionar a longa distância hidrogênios e carbonos (²J e ³J). A complementaridade desses experimentos faz possível a atribuição dos sinais de hidrogênio e carbono de macromoléculas.

Para a caracterização do complexo supramolecular preparado pelo método de liofilização descrito na *Seção 2.3.1*, a razão molar de 1:1 β CD/BPP10c, foram realizados experimentos de hidrogênio, $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY e DOSY “*Diffusion-Ordered Spectroscopy*”. Esses experimentos foram realizados para avaliar se o peptídeo interage com a ciclodextrina e de que modo esta interação ocorre.

Os espectros de RMN para o complexo de inclusão formado pela interação da β CD com a Ampicilina foram obtidos em um equipamento Bruker DRX 600 AVANCE (600 MHz). Esses experimentos foram realizados no *Department of Chemistry’s Instrumentation Facility* do *Massachusetts Institute of Technology* em Cambridge, Massachusetts, EUA. Desta forma, foram realizados experimentos uni- e bidimensionais para a caracterização dos sinais de hidrogênio para a molécula de AMP e β CD, utilizando D_2O como solvente. Para o complexo de inclusão foi realizado o experimento de $^1\text{H}/^1\text{H}$ ROESY “*Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy*”.

Os espectros de RMN para o sistema de β -ciclodextrina e do ácido poli (metacrílico) modificados com a molécula de espiropirano foram obtidos em espectrofotômetro Bruker DRX 400 AVANCE (400 MHz) e Bruker DRX 600 AVANCE (600 MHz) localizados no *Department of Chemistry’s Instrumentation Facility* do *Massachusetts Institute of Technology* em Cambridge, Massachusetts, EUA. Foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais para caracterizar as moléculas fotocromicas e também os produtos obtidos pelas sínteses descritas na *Seção 2.2.2*. Todos os espectros foram obtidos utilizando DMSO_{d6} como solvente.

2.2.4. Espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada

Os espectros de infravermelho obtidos por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum GX e Bruker Alpha-E, utilizando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os experimentos foram feitos a uma resolução de 4 cm^{-1} , em intervalos de 1 cm^{-1} com acumulações de 128 a 512 interferogramas por amostra, a temperatura ambiente. Todos os espectros foram obtidos para a região de $4000 - 590\text{ cm}^{-1}$.

Para o sistema BPP10c e β CD, a técnica de FTIR-ATR^{52,85,137-139} foi utilizada para investigar a estruturação secundária do peptídeo em solução em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum GX do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizadas soluções de $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o BPP10c puro e para seu respectivo complexo de inclusão na razão molar 1:1 nos solventes DMSO , D_2O e H_2O . Os espectros dos solventes puros foram obtidos sob as mesmas condições em presença e ausência de β CD e esses espectros subtraídos do espectro das amostras.

Para determinar a estrutura secundária do BPP10c foi utilizada a região do espectro de infravermelho referente a banda de amida I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$). Para identificar o número de bandas sobrepostas e suas respectivas posições, a derivada segunda do espectro foi obtida utilizando o programa Spectrum v5.0.1, Perkin Elmer Instruments LLC. A atribuição das bandas sobrepostas na região de amida I e a correlação com a estrutura secundária do BPP10c foram feitas com base em resultados da literatura.¹⁴⁰⁻¹⁴⁵ O deslocamento dessas bandas identificadas pela derivada segunda foi utilizado como parâmetro para o ajuste das curvas gaussianas. Cada curva gaussiana ajustada obtida foi atribuída a um tipo de estrutura secundária e sua área calculada pelo programa AutoCAD 2007 – Autodesk e a área relacionada com a porcentagem da contribuição de cada estrutura do BPP10c em solução.

A Figura 2.4 exemplifica a metodologia utilizada. Todos os espectros foram normalizados (Origin 7.0, OriginLab Corporation) para permitir a comparação direta.

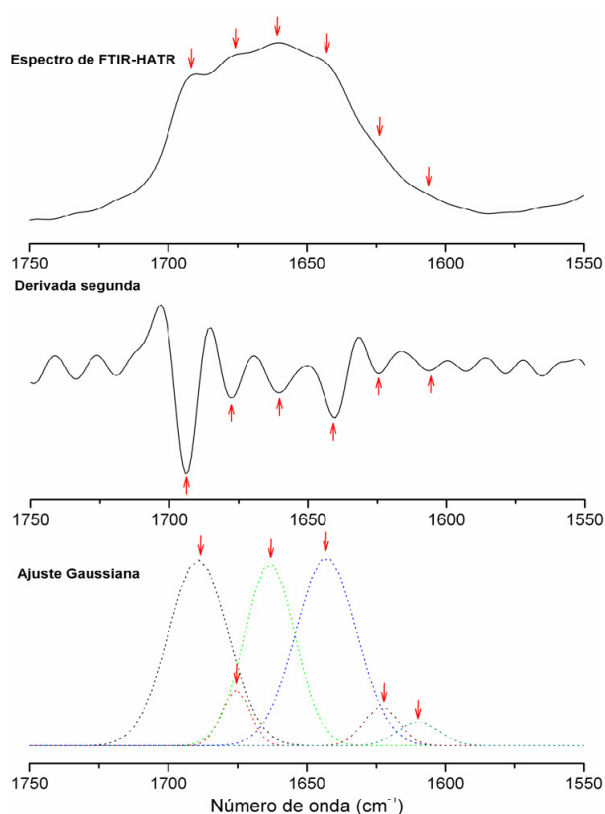


Figura 2.2: Ilustração das etapas utilizadas na metodologia para determinar a estrutura secundária do peptídeo

Para o sistema formado pela β -ciclodextrina e o ácido poli (metacrílico) modificados com a molécula de espiropirano a técnica de FTIR-ATR foi utilizada para caracterizar os materiais de partida, as moléculas sintetizadas, e principalmente, caracterizar a superfície das nanofibras obtidas por eletrofiação. Esses experimentos foram realizados em um espectrofotômetro Bruker Alpha-E do

Laboratório do Prof. Robert Langer (Langer Lab) do *Department of Chemical Engineering* do *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts, EUA.

Para a análises dos materiais no estado sólido, aproximadamente 1 mg, foram dispostos sobre a superfície do cristal de ZnSe e os espectros obtidos sem nenhum tratamento prévio das amostras. O espectro da cela vazia foi obtido e subtraído daquele espectro do material em questão, como branco. Os espectros foram processados pelo programa OPUS versão 6.5 e os espectros finais obtidas pelo programa Origin 7.0 da Microcal.

2.2.5. Calorimetria de Titulação Isotérmica

As curvas de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema formado pelo BPP10c e a β -ciclodextrina foram realizadas em duplicata em um microcalorímetro VP-ITC, Microcal Company, do laboratório do Prof. Marcelo Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Cada curva de titulação foi obtida pela injeção sucessiva de 41 pontos da solução aquosa do peptídeo (60 mmol.L^{-1}) em 1,5 mL de solução aquosa de β -ciclodextrina ($4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). Nesse experimento a concentração de β CD na cela variou de $4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $3,43 \text{ mmol.L}^{-1}$ e de peptídeo de $0,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $6,92 \text{ mmol.L}^{-1}$. Um intervalo de 260 segundos foi programado entre cada ponto de injeção nesses experimentos. Para eliminar efeitos de difusão da solução de peptídeo na cela calorimétrica o primeiro ponto de injeção ($1 \mu\text{L}$) foi descartado, após esse ponto injeções de $5 \mu\text{L}$ foram injetadas com um tempo de 2 segundos.

Os picos produzidos durante o processo de titulação são convertidos a fluxo de calor e a correção das concentrações das espécies em solução é realizada. Além da titulação do BPP10c em solução aquosa de β CD, a diluição do peptídeo foi feita em água e sua respectiva curva de titulação subtraída daquela curva titulação obtida para o BPP10c em β -ciclodextrina para eliminar efeitos de diluição do peptídeo em água. Os parâmetros termodinâmicos de interação para o processo de complexação entre as moléculas foram obtidos por ajuste não linear da curva de titulação, pelo programa Microcal Origin 5.0 para ITC, assumindo um único sítio de interação. Todas as titulações foram conduzidas a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a titulação da solução aquosa de Ampicilina (20 mmol.L^{-1}) em solução aquosa de β CD (1 mmol.L^{-1}) foram realizadas 51 injeções sucessivas. As concentrações das espécies na cela variaram de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $0,86 \text{ mmol.L}^{-1}$ para a β CD e de $0,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $2,81 \text{ mmol.L}^{-1}$ para a Ampicilina. Além dessa titulação de AMP em solução aquosa de β CD, foi conduzida a diluição da AMP em água e sua curva de titulação foi subtraída daquela curva obtida para o sistema AMP em β -ciclodextrina para

eliminar efeitos de diluição do peptídeo em água. Todos os experimentos foram realizados a temperatura de 30 °C e foi utilizado um intervalo de 300 segundos entre cada injeção. Assim como realizado no sistema anterior, para eliminar efeitos de difusão da solução de AMP na cela calorimétrica o primeiro ponto de injeção (1 µL) foi descartado e após esse ponto foram utilizadas injeções de 5 µL com um tempo de 2 segundos de injeção.

Os experimentos de calorimetria isotérmica de titulação para o sistema βCD:AMP foram realizados no *Computational and Systems Biology*, no *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts, EUA e os parâmetros termodinâmicos de interação para o processo de complexação entre as moléculas forma obtidos pelo ajuste não linear da curva de titulação, pelo programa Microcal Origin 7.0 para ITC.

2.2.6. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um espectrofotômetro JASCO modelo J-720 do Laboratório da Prof^a. Adelaide Faljoni-Alario, do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ponto isoelétrico para o peptídeo foi calculado utilizando o programa PI/M_w, publicado no site (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html - visitado em 23/09/2010). Os espectros foram obtidos para o intervalo de comprimento de onda de 190 a 320 nm, com um tempo de medida de 100 nm.min⁻¹, com resolução de 0,5 nm e 1 nm de largura de banda. Os espectros obtidos são curvas médias de quatro medidas realizadas com cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Todos os experimentos foram realizados a temperatura de 25 °C. Para o peptídeo BPP10c (0,1 mmol.L⁻¹) de solução em tampão K₂HPO₄/H₃PO₄ (pH 4,0) foi utilizada para a obtenção dos espectros. As mesmas condições de análise foram repetidas para o complexo de inclusão na razão molar 1:1 com a β-ciclodextrina, com o peptídeo na concentração de 0,1 mmol.L⁻¹.

2.2.7. Espalhamento de Luz

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS) foram realizadas em um Zetasizer ZS NanoSeries, Malvern Instruments, utilizando cubetas de poliestireno (DTS 0112) e quartzo (PCS8501), respectivamente. Para todos os experimentos de espalhamento de luz (DLS e SLS) água tipo 1 (Milli-Q) foi filtrada em membrana Durapore (Millipore) de 0,1 µm e essa água foi utilizada para preparar as soluções de β-ciclodextrina. As demais características da água, como viscosidade e índice de refração foram fornecidas pelo programa da Malvern Instruments.¹⁴⁶

As amostras foram submetidas a um feixe monocromático de laser He-Ne de 10 mW com comprimento de onda de 632,4 nm. Os experimentos de espalhamento de luz foram executados com o objetivo de obter informações sobre o processo de auto-agregação da β -ciclodextrina em solução aquosa. Mais especificamente, os experimentos de DLS tiveram como objetivo obter informações sobre o tamanho e a respectiva concentração de agregação crítica (*cac*) da β CD em solução. Para isso, a titulação de uma solução na concentração de 12,0 mmol.L⁻¹ de β CD em água foi realizada a três diferentes temperaturas, 20, 25 e 30 °C e os valores de intensidade de luz espalhada medidos. A titulação foi conduzida pelo menos 10 vezes e as curvas médias de intensidade de luz espalhada (Kcps – contagem em kilo por segundo)¹⁴⁷ plotadas em função da concentração de β CD. Para cada ponto da titulação foi feita a medida de tamanho do agregado formado em solução aquosa.

Os experimentos de SLS foram conduzidos para determinar o número de moléculas de β CD por unidade de agregado. Esses experimentos foram conduzidos nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, segundo as condições do experimento proposto por Debye, no qual a curva de KC/R_θ é plotada em função da concentração do soluto, a β -ciclodextrina. Para essa curva a interseção do ajuste linear com o eixo y fornece o inverso da massa molecular, neste caso a massa do agregado ou número de moléculas por agregado. O coeficiente angular do ajuste linear fornece o segundo coeficiente do virial, que irá determinar a afinidade, atração ou repulsão, entre as moléculas de β CD e a solução.

A Equação 2.1 é a equação de Debye que relaciona a massa molecular (M) com o segundo coeficiente do virial (A_2).⁴⁴

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2C \quad 2.1$$

Na qual C é a concentração, K é a constante óptica e R_θ a razão de Rayleigh, onde essas duas últimas são definidas por:

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_o^4 N_A} \left(n_o \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad 2.2$$

Na qual N_A é o número de Avogadro, λ_o o comprimento de onda do laser, n_o o índice de refração do solvente e dn/dc é o incremento do índice de refração em função da concentração do soluto.

$$R_\theta = \frac{I_A n_o^2}{I_T n_T^2} R_T \quad 2.3$$

Onde I_A é a intensidade residual espalhada, n_o o índice de refração do solvente, I_T a intensidade de espalhamento do padrão (tolueno), n_T o índice de refração do padrão e R_T a razão de Rayleigh do padrão.⁴⁴ O valor de dn/dc para a β -ciclodextrina foi obtido em dados da literatura.¹⁴⁸

2.2.8. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível

A espectroscopia de absorção na região do UV-visível foi utilizada para caracterizar o processo de auto-agregação da β -ciclodextrina em solução aquosa em presença de Ampicilina. Além disso, essa espectroscopia foi utilizada para caracterizar o processo de isomerização da molécula de espiropirano e das moléculas sintetizadas (β CD_{SP}, PMAA_{SP} e PMAA β CD_{SP}), bem como investigar a cinética de isomerização desses sistemas. Esses experimentos foram conduzidos no Laboratório do Prof. Robert Langer (Langer Lab) do *Department of Chemical Engineering* do *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts, EUA.

Os espectros de absorção na região do UV-visível para a auto-agregação da β -ciclodextrina foram obtidos em um espectrofotômetro de UV-visível Varian Cary 50 utilizando cubetas de quartzo. Soluções aquosas de AMP a $6,7 \times 10^{-2}$ mmol.L⁻¹ foram tituladas com água (branco) e com solução aquosa de β -ciclodextrina (12 mmol.L⁻¹) pela adição sucessiva de 10 μ L. As concentrações das espécies variaram de $6,7 \times 10^{-2}$ a $4,8 \times 10^{-2}$ mmol.L⁻¹ para a AMP e de 0,0 a 3,3 mmol.L⁻¹ para a β CD. As leituras foram feitas em 215 nm para a banda de absorção da Ampicilina. As curvas plotadas foram originadas pela diferença dos valores de absorbância entre a diluição da AMP com água e da titulação com a solução de β -ciclodextrina (Δ Abs = Abs_{AMP} - Abs_{AMP: β CD}) em função da concentração de β CD.

Para a caracterização das bandas de UV-visível dos sistemas contendo espiropirano foi utilizado o espectrofotômetro de UV-visível Varian Cary 50, utilizando cubetas de quartzo. Para a molécula de espiropirano foi utilizado tetrahydrofurano como solvente, e para as moléculas modificadas: β CD_{SP}, PMAA_{SP} e PMAA β CD_{SP} o solvente utilizado foi água. Para esses sistemas fotocromicos as soluções foram irradiadas por luz ultravioleta e luz visível, para que as duas formas das moléculas (a aberta e a fechada) pudessem ser identificadas.

Além da caracterização das espécies em solução, a interconversão entre as formas também foi testada. Para isso soluções aquosas de β CD_{SP} (0,2 mg.mL⁻¹) e dos polímeros modificados (20,0 mg.mL⁻¹) foram mantidas a 40 °C e irradiadas alternadamente por luz ultravioleta e visível para que a isomerização ocorresse. Esse teste foi feito pelo menos 10 vezes para demonstrar a capacidade de obtenção das formas SP e MC quando a molécula é conjugada a um ligante.

Para a molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e dos polímeros ($15,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram ainda realizados experimentos de cinética de coloração, demonstrando a espontaneidade de interconversão da forma fechada (SP) para a forma aberta (MC) em solução aquosa. Esses experimentos foram conduzidos a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em espectrofotômetro SpectraMax Plus³⁸⁴, Molecular Devices. As soluções foram previamente irradiadas por luz visível durante 10 minutos para garantir o máximo de moléculas na forma SP. Foram realizadas medidas com um intervalo de tempo de 2 minutos durante 14 horas para λ de 514 nm.

2.2.9. Microscopia de Força Atômica

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada para obter informações sobre a forma de agregação da β -ciclodextrina e seu complexo supramolecular com a Ampicilina no estado sólido. Os experimentos foram conduzidos no *Center for Materials Science and Engineering do Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts, EUA.

Para essas análises, foram preparadas soluções aquosas de β -ciclodextrina nas concentrações de $0,9$ e $2,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e dos respectivos complexos supramoleculares na qual a AMP foi adicionada ao sistema na concentração de $6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Alíquotas de cada uma dessas soluções ($100 \text{ }\mu\text{L}$) foram depositadas sobre folhas de mica e o solvente (água) removido a baixa pressão em estufa a vácuo. Uma vez obtido o material sólido sobre a mica os experimentos de microscopia de força atômica foram realizados. Foi utilizado um microscópio Veeco/Digital Instruments Nanoscope IIIa Scanned Probe Microscope Controller com Dimensoin 3000 SPM, operando no modo de contato intermitente com a utilização de sonda de silício. Para todas as análises foram obtidas imagens de contraste de fase simultaneamente com as imagens de topografia.

2.2.10. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa utilizando ionização e dessorção de matriz assistida a laser – (MALDI-TOF) foi utilizada para caracterizar o peso molecular da β -ciclodextrina modificada com a molécula de espiropirano. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker Daltonics Omnixflex, do *Department of Chemistry's Instrumentation Facility do Massachusetts Institute of Technology* em Cambridge, Massachusetts, EUA.

O espectro de massa de uma referência externa (ProteoMassTM Peptide MALDI-MS, Sigma – Aldrich) foi utilizada para a calibração do equipamento. Para a calibração foi utilizado o ácido α -

ciano-4-hidrocínâmico (CHCA) como matriz. Desta forma, 20 mg de CHCA foram adicionados em 1 mL, essa suspensão foi submetida a centrifugação e o sobrenadante retirado. Para o preparo do padrão, 100 µL dessa solução foram retirados e a esse volume foram adicionados a 1,0 µL de cada peptídeo padrão. Essa solução padrão foi adicionada ao disco de amostragem utilizando três volumes: (i) 0,5, (ii) 1,0 e (iii) 1,5 µL.

Para as análises 25 mg de ácido 2,5 dihidroxibenzóico (2,5-DHB) foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol:água (60:40). A solução estoque de β CD_{SP} foi preparada dissolvendo 1 – 2 mg do composto em 1,0 mL de metanol. Dessa solução estoque foram retirados 10 µL, os quais foram adicionados a 100 µL de solução estoque da matriz de 2,5-DHB. Dessa nova solução contendo a molécula de β CD_{SP} mais a matriz foram retiradas três alíquotas com diferentes volumes: (i) de 0,5 µL, (ii) de 1,0 µL e o (iii) de 1,5 µL, as quais foram colocadas no disco de amostragem.

2.2.11. Eletrofiação

As nanofibras poliméricas a base de PMAA e PMAA β CD_{SP} foram obtidas pela técnica de eletrofiação.^{92,98,111} As fibras foram obtidas no equipamento de eletrofiação do Laboratório do Prof. Robert Langer (Langer Lab) do *Department of Chemical Engineering* do *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts, EUA.

Foram preparadas soluções de PMAA e PMAA β CD_{SP} a 15 % do peso utilizando dimetilformamida como solvente. Essas soluções foram mantidas sob agitação por pelo menos 12 horas para que todo o polímero fosse dissolvido. O potencial elétrico aplicado no bico injetor foi próximo de 20 a 25 kV para as soluções poliméricas de PMAA e PMAA β CD_{SP}, utilizando um gerador de voltagem da Gamma High Voltage Research, Bench Unit - Series ES. As soluções poliméricas foram injetadas através da bico injetor com um fluxo de 0,02 mL.min⁻¹ utilizando uma bomba de injeção da Harvard Apparatus PHD 22/2000 e a distância utilizada entre o bico injetor e a placa coletora foi de aproximadamente 25 cm. Essa placa coletora de metal foi aterrada para que a diferença de potencial entre esta e o bico injetor fosse obtida. Após a obtenção das fibras com arranjo aleatório, esse material foi submetido ao tratamento térmico a aproximadamente 170 °C durante 12 horas, como objetivo de aumentar a resistência do material obtido.¹¹¹

2.2.12. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das fibras obtidas por eletrofiação foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e essas imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura

JEOL-JSM 6060, JEOL Ltda, 30 kV. As micrografias das nanofibras foram obtidas no *Institute for Soldier Nanotechnology*, no *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts.

As nanofibras obtidas utilizando os polímeros PMAA e PMAA β CD_{SP} foram aderidas com auxílio de fita dupla face a um suporte metálico, o qual foi colocado em um Desk II, Denton Vacuum LLC, para serem recobertas com uma camada de ouro de aproximadamente 5 – 8 nm, permitindo a análise da superfície do material. A análise do diâmetro das nanofibras obtidas para os dois polímeros foi realizada pelo programa AnalySIS, Software Imaging System Corp e para isso foram utilizadas pelo menos 10 medidas de fibras diferentes.

2.2.13. Ângulo de Contato

A análise de características de hidrofília e hidrofobia da superfície das nanofibras de PMAA e PMAA β CD_{SP} foram investigadas pela medida do ângulo de contato da água com o material. As medidas de ângulo de contato da água foram realizadas em um DAS 10, Krüss, no Laboratório do Prof. T. Alan Hatton (Hatton Group) do *Department of Chemical Engineering* do *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts.

Para comparar as características de hidrofobia entre as nanofibras de PMAA e àquelas obtidas com o polímero modificado foram colocadas 10 gotas de água (volume de 10 μ L) sobre cada uma das nanofibras e realizadas 6 medidas de ângulo de contato da água para cada uma dessas gotas. Os valores de ângulo de contato da água observados para cada um dos sistemas foi obtido como média dessas medidas e o desvio padrão calculado.

Para comparar as propriedades de superfície das nanofibras de PMAA β CD_{SP} em função da presença das formas isoméricas da molécula fotocromica na superfície do material, as nanofibras de polímero modificado foram irradiadas durante 24 horas com luz ultravioleta e luz visível. Após esse período gotas de água de 10 μ L foram colocadas sobre a superfície do material e o ângulo de contato da água medido.

Para comparar os resultados obtidos para o ângulo de contato da água com as fibras, as quais foram irradiadas por ultravioleta e luz visível, foram preparados filmes com o PMAA β CD_{SP}. Esses filmes poliméricos foram preparados utilizando a técnica de recobrimento por rotação¹⁴⁹ em um equipamento da Speedline Technologies – P6708, no Laboratório do Prof. Robert Langer (Langer Lab) do *Department of Chemical Engineering* do *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, Massachusetts.

Para a obtenção dos filmes 300 μ L de solução polimérica a 15 % do peso, utilizando DMF como solvente, foram colocados sobre lamina de vidro. A essa lamina contendo a solução de

PMAA β CD_{SP} foi aplicada uma rotação de 400 rpm durante 5 segundos com posterior rotação de 2300 rpm por mais 50 segundos. Os filmes poliméricos formados foram colocados em estufa para o tratamento térmico a 170 °C durante 12 horas, assim como realizado para as nanofibras. Após esse período, os filmes foram irradiados por luz ultravioleta e visível durante 24 horas e então o ângulo de contato da água com a superfície do material medido. Para confirmar a presença do filme sobre a superfície da lamina de vidro, medidas do ângulo de contato da água depositada diretamente sobre a superfície do vidro foram realizadas.

Capítulo 3

Sistema Hóspede-Hospedeiro formado pela β -ciclodextrina e o BPP10c

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados da preparação e caracterização o sistema supramolecular do tipo hóspede-hospedeiro formado pela interação entre a β -ciclodextrina e o decapeptídeo, BPP10c, cuja sequência primária é: Pyr-Asn-Trp-Pro-His-Pro-Gln-Ile-Pro-OH, Figura 3.1. Para a caracterização desse sistema supramolecular foram utilizadas técnicas físico-químicas de análise em solução, como ressonância magnética nuclear, calorimetria de titulação isotérmica, espectroscopia de infravermelho por reflectância total atenuada e dicroísmo circular.²³

3.1. Sistema Hóspede-Hospedeiro formado pela β -ciclodextrina e o BPP10c

3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear é uma das principais técnicas de análise envolvendo sistemas com ciclodextrinas, possibilitando propor a estrutura de sistema do tipo hóspede-hospedeiro formado em solução. Neste trabalho foram utilizadas técnicas uni- e bidimensionais e hetero- e homonucleares para a identificação e para a atribuição dos hidrogênios tanto para a molécula hóspede quanto para aqueles hidrogênios presentes na molécula hospedeira.

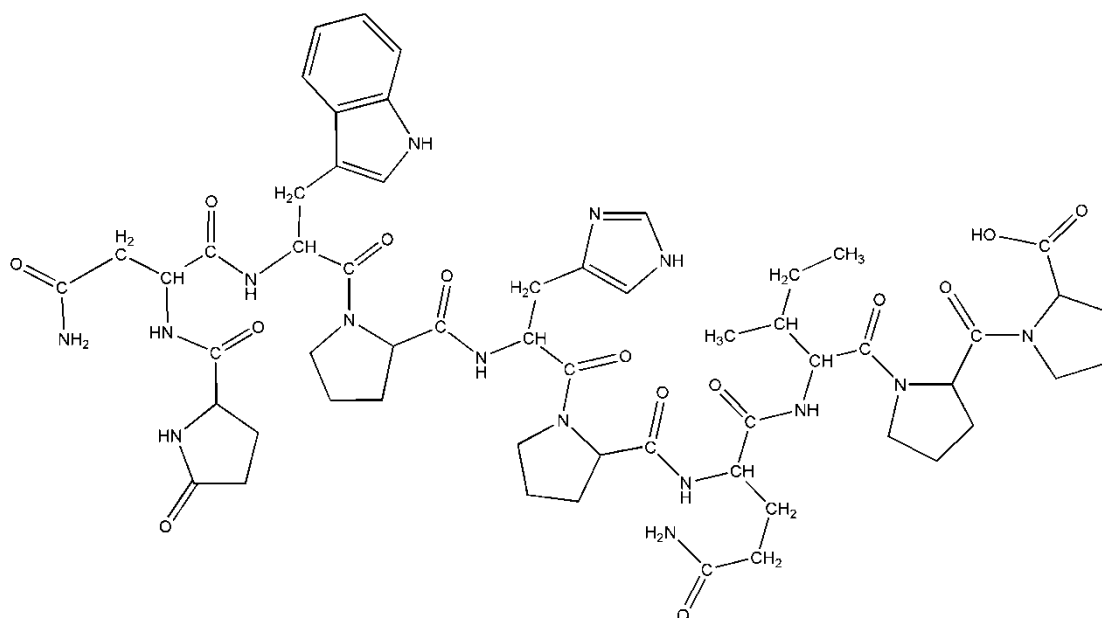


Figura 3.1: Fórmula estrutural do peptídeo BPP10c.

Primeiramente, foi realizada a atribuição dos sinais de ressonância para a β -ciclodextrina livre, utilizando como solvente tanto o D_2O quanto o $DMSO_{d6}$. Na Figura 3.2a é apresentada o

espectro de hidrogênio para a β -ciclodextrina em D_2O e na Figura 3.2b em $DMSO_{d6}$. O deslocamento químico para os sinais de hidrogênio da β CD estão de acordo com aqueles já reportados na literatura,¹⁵⁰ confirmando assim a estrutura e a ausência de sinais referentes a outras moléculas.

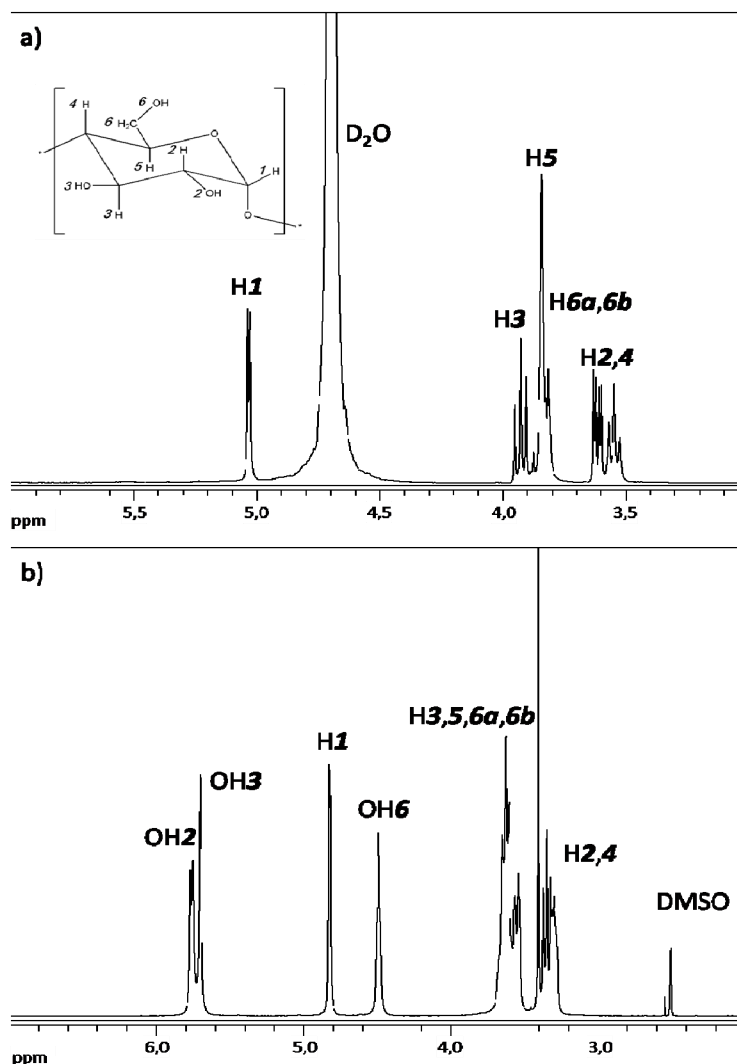


Figura 3.2: Espectros de RMN de 1H para a β CD, a 400 MHz e a 25 °C, com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio utilizando-se como solvente a) D_2O e b) $DMSO_{d6}$.

Na Figura 3.3 é apresentado o espectro de carbono (^{13}C) para a β -ciclodextrina em $DMSO_{d6}$, no qual os valores de deslocamento químico também estão de acordo com dados descritos na literatura.¹⁵⁰ Os valores de deslocamento químico dos sinais de hidrogênio e carbono são apresentados na Tabela 3.1.

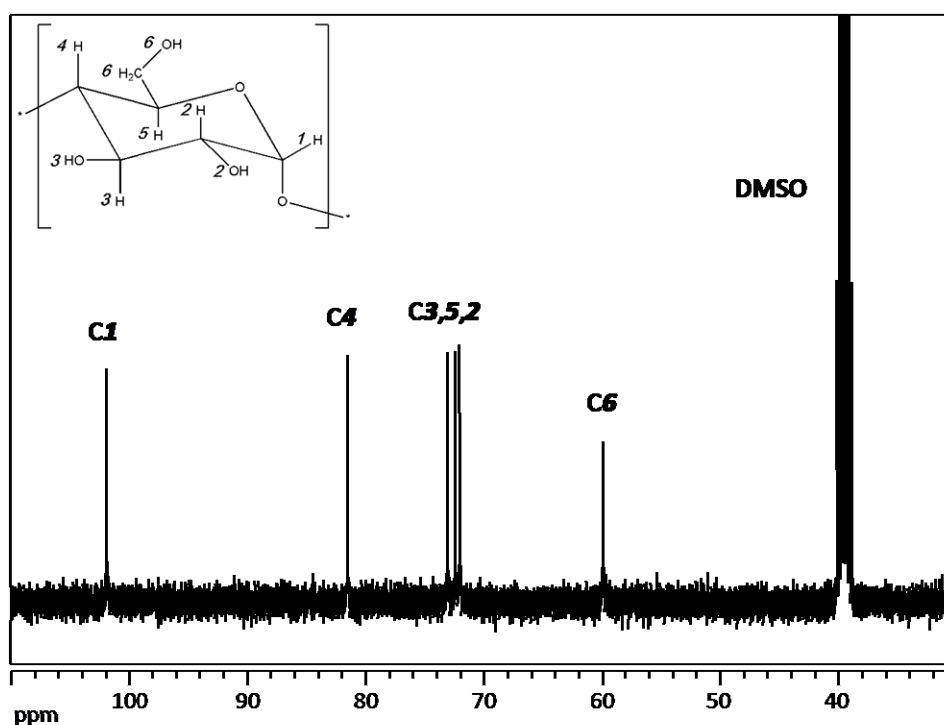


Figura 3.3: Espectro de RMN de ^{13}C para a βCD , a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} .

Tabela 3.1: Deslocamento químico para os sinais de hidrogênio e carbono para a β -ciclodextrina em D_2O e DMSO_{d6} a 25 °C.

βCD	H1	H2	H3	H4	H5	H6a,b	OH2	OH3	OH6
DMSO_{d6} (ppm)									
	4,82	3,36	3,64	3,30	3,60	3,54	5,75	5,70	4,49
D_2O (ppm)									
	5,03	3,61	3,93	3,55	3,84	3,81	---	---	---
βCD	C1	C2	C3	C4	C5	C6			
DMSO_{d6} (ppm)									
	101,92	72,02	73,04	81,50	72,39	59,88			

Com o intuito de caracterizar de forma mais precisa a estrutura do peptídeo BPP10c foram utilizadas técnicas uni- e bidimensionais, de correlação homo- e heteronucleares para uma atribuição mais precisa dos sinais de hidrogênio da molécula. Para isso foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear a 400 e 500 MHz, utilizando como solvente D_2O e também misturas a 5 % de D_2O em água. Nas Figuras 3.4a e 3.4b são apresentados os espectros de hidrogênio para o peptídeo BPP10c em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ e em D_2O , respectivamente.

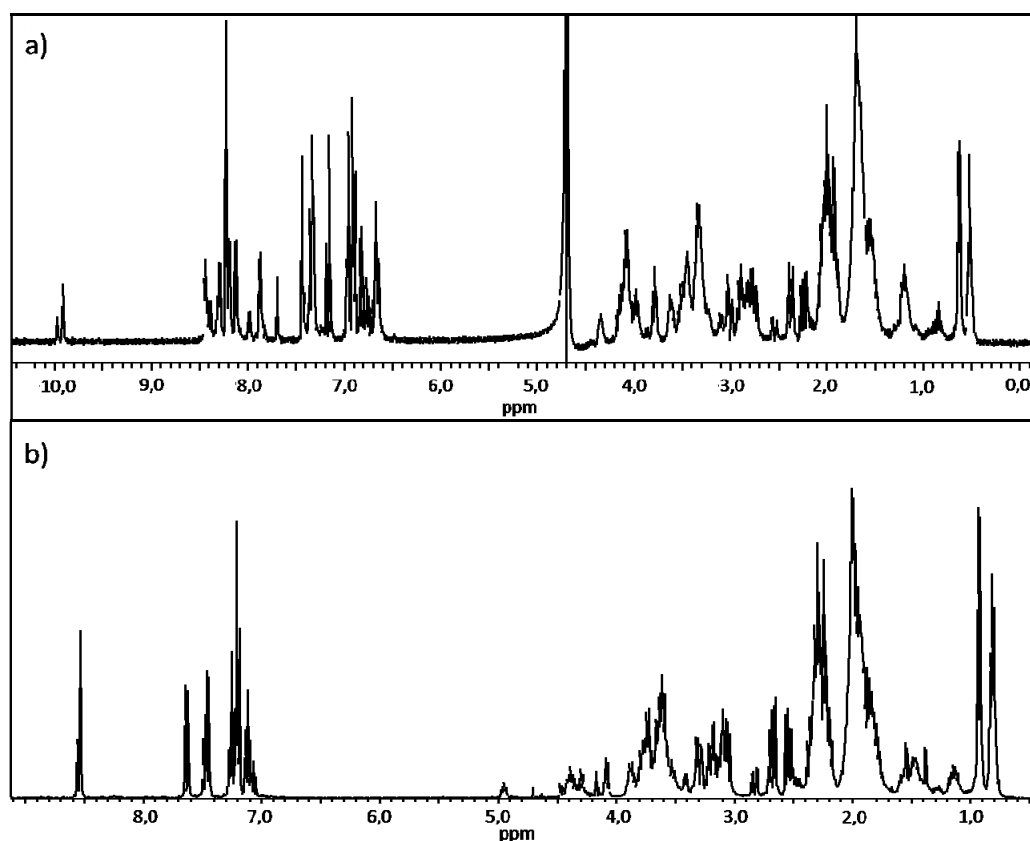


Figura 3.4: Espectros de RMN de ^1H para o peptídeo BPP10c em a) $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 500 MHz e b) D_2O a 400 MHz.

A comparação dos dois espectros permite observar os hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio ($-\text{NH}$) referentes às ligações peptídicas e também àqueles grupos ($-\text{NH}_2$) presentes na cadeia lateral do peptídeo, na região de δ 6,5 a 10,0. É importante ressaltar que em ambos os espectros podem ser observados um maior número de sinais de hidrogênio do que o esperado para o peptídeo, tais como o desdobramento do sinal de ($-\text{NH}$) referente ao resíduo de triptofano em δ 9,91 apresentado na Figura 3.4a e o hidrogênio ($-\text{CH}$) do resíduo de histidina em δ 8,51, Figura 3.4b. Esses resultados sugerem a presença de diferentes estruturas secundárias para o peptídeo em solução, como relatado na literatura para outros sistemas semelhantes envolvendo peptídeos.^{151,152}

A Figura 3.5 apresenta o mapa de contorno homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY, o qual foi utilizado para auxiliar na atribuição dos sinais de hidrogênio para os resíduos de aminoácido, uma vez que esse experimento possibilita identificar a conectividade sequencial entre os hidrogênios para cada resíduo de aminoácido. Foram destacadas nesse mapa de contorno algumas conectividades, como aquelas observadas para os hidrogênios dos resíduos de: triptofano (Trp), a isoleucina (Ile), uma das prolinas (Pro) e para a asparagina (Asn). Além disso, analisando esse espectro bidimensional pode ser verificada a correlação entre os hidrogênios da cadeia principal do peptídeo com os hidrogênios

(-NH) referentes à ligação peptídica. Entretanto, devido à complexidade do mapa de contorno fica inviável a atribuição inequívoca de todos os hidrogênios da molécula. Uma das razões para essa complexidade é a presença de mais de uma estrutura secundária do peptídeo em solução o que conseqüentemente leva a uma sobreposição dos sinais de hidrogênio, principalmente para os sinais da prolina, região de δ de 1,5 a 3,5.

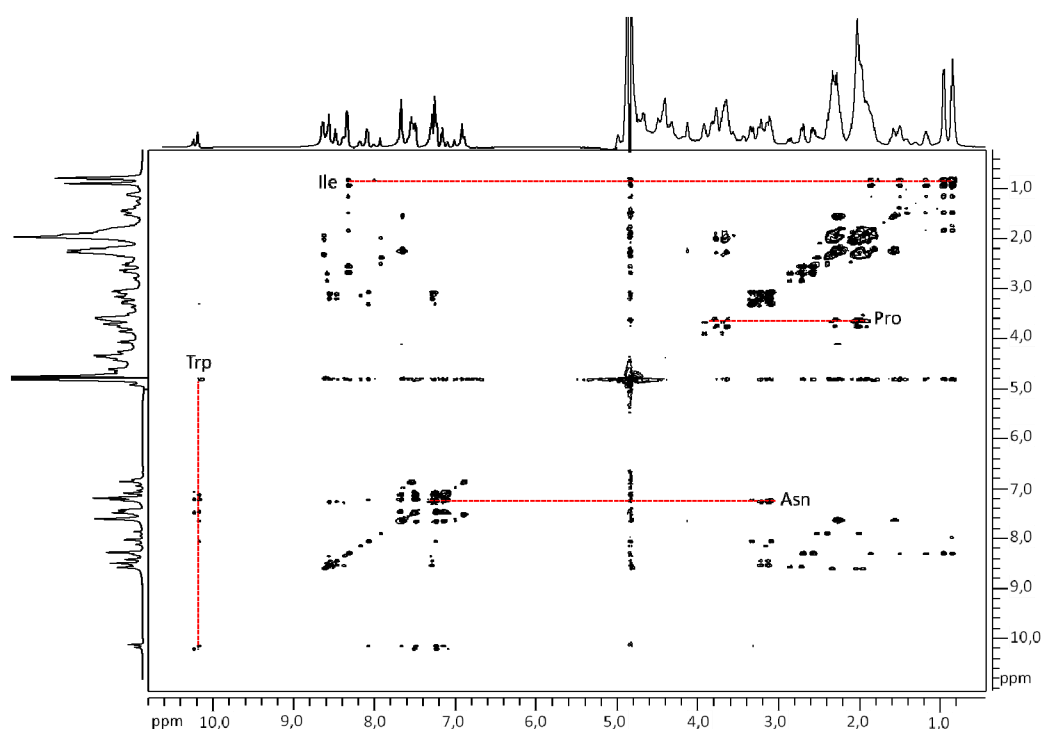


Figura 3.5: Mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY para o peptídeo BPP10c a 500 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 20 °C.

O experimento de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC, Figura 3.6, foi realizado para ajudar a identificar se o peptídeo BPP10c apresenta mais de uma estrutura secundária em solução. Analisando esse espectro podem ser destacados os hidrogênios alfa do BPP10c referentes à ligação peptídica, localizados na região entre δ 3,9 a 4,7. Para essa região do espectro pode ser observado um número maior de sinais do que o esperado para essa molécula, como destacado na Figura 3.6. Além disso, esse espectro ajudou a distinguir os hidrogênios primários e terciários (em azul) dos hidrogênios secundários (vermelho). Essa evidência pode ser observada para os hidrogênios γCH_3 e δCH_3 do resíduo de isoleucina em δ 0,62 a 0,52, respectivamente e para os hidrogênios da região aromática do espectro δ 6,50 a 8,50, dos aminoácidos de triptofano e histidina.

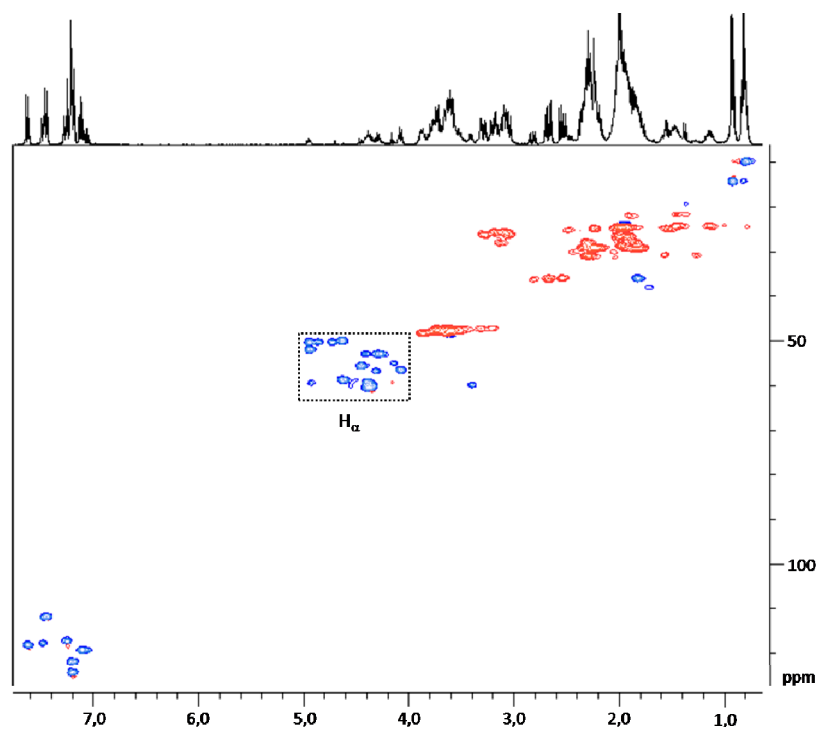


Figura 3.6: Mapa de contorno $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC para o peptídeo BPP10c a 400 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 20 °C.

Com base nos experimentos de RMN não foi possível fazer a atribuição completa dos sinais de hidrogênio para o peptídeo BPP10c. Isso porque, à sobreposição dos sinais de hidrogênio para os resíduos de prolina (região de δ de 1,5 a 3,5) e a existência de mais de uma estrutura em solução impossibilitam a distinção entre os sinais de RMN do peptídeo. Embora exista essa limitação experimental, um dos resíduos de prolina da cadeia do peptídeo teve seus sinais de hidrogênio atribuído como apresentado na Tabela 3.2. Porém, os valores de deslocamento químico dos hidrogênios dos resíduos que puderam ser identificados encontram-se apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Deslocamento químico para os hidrogênios do peptídeo BPP10c a 500 MHz em D₂O/H₂O a 20 °C, utilizando o sinal da água como referência em δ 4,8.

Aminoácido	δ NH ($J_{NH-H\alpha}$)	$\delta\alpha$ -H	$\delta\beta$ -H	δ outros
Pyr	8,43	3,98	1,62/1,77	γ (CH ₂) 2,03
Asn	8,13	4,36	2,35/2,24	
Trp	7,98	4,11	2,84/2,90	1(NH) 9,91 2(CH) 6,92 4(CH) 7,16 5(CH) 6,75 6(CH) 6,83 7(CH) 7,16
Pro ₁ ^a	8,42	4,04	1,66	γ (CH ₂) 2,07 δ (CH ₂) 3,34
His	7,87	4,68	3,03/2,79	2(CH) 8,24 4(CH) 6,97
Pro ^b				
Gln	8,45	3,98	1,63/1,20	γ (CH ₂) 2,01
Ile	8,19	4,15	1,54	γ (CH ₃) 0,62 γ (CH ₂) 1,18/0,85 δ (CH ₃) 0,52
Pro ^b				
Pro ^b				

^a Deslocamentos químicos obtidos pelos experimentos 1D e 2D de RMN.

^b Resíduos de Prolina não puderam ser distinguidos entre si e sobrepostos a Pro₁.

A caracterização do complexo supramolecular formado entre o BPP10c e a β -ciclodextrina foi feita utilizando experimentos de RMN homonucleares ¹H/¹H NOESY e a difusão (DOSY). Além disso, a comparação da variação de deslocamento químico dos sinais de hidrogênio do peptídeo foi utilizada como indicativo da(s) região(ões) de interação entre o peptídeo e a molécula hóspede. Esses dados auxiliaram na proposição da estrutura supramolecular formada em solução.^{51,52,85,150,153,154}

Os espectros de RMN de hidrogênio para o sistema β CD/BPP10c em D₂O/H₂O 5 % e em D₂O estão apresentados nas Figuras 3.7 e 3.8, respectivamente. As Figuras inseridas em cada um dos espectros apresentam a comparação dos sinais de RMN para os hidrogênios da região aromática do peptídeo em presença e na ausência de β -ciclodextrina, região de δ 6,0 a 10,0.

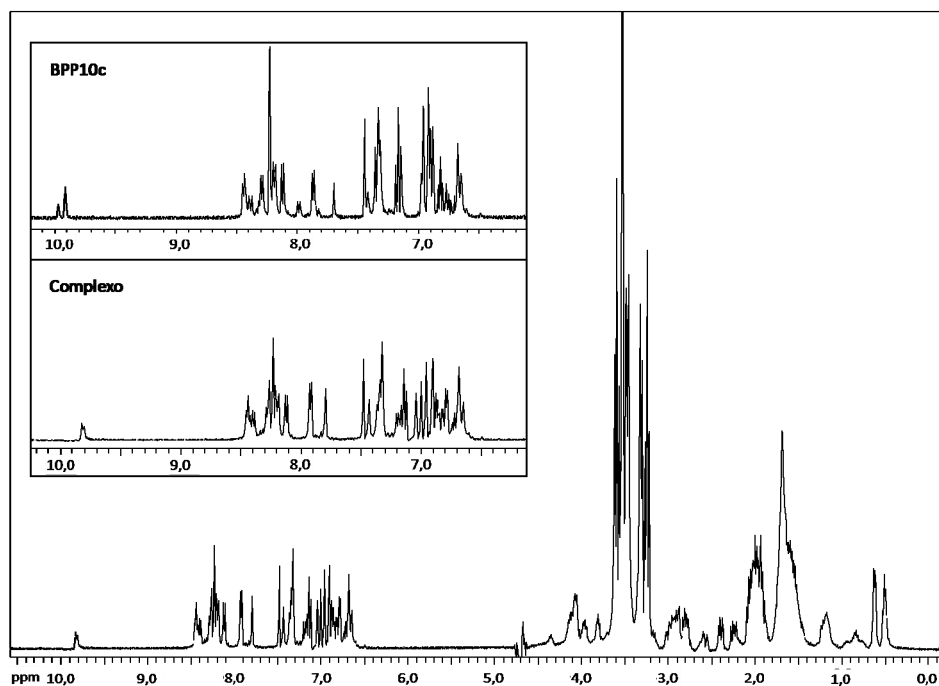


Figura 3.7: Espectro de RMN de ^1H para o sistema $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 400 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 5 % a 20°C .
Figura inserida: comparação entre a região aromática do espectro de hidrogênio do BPP10c e de seu complexo supramolecular.

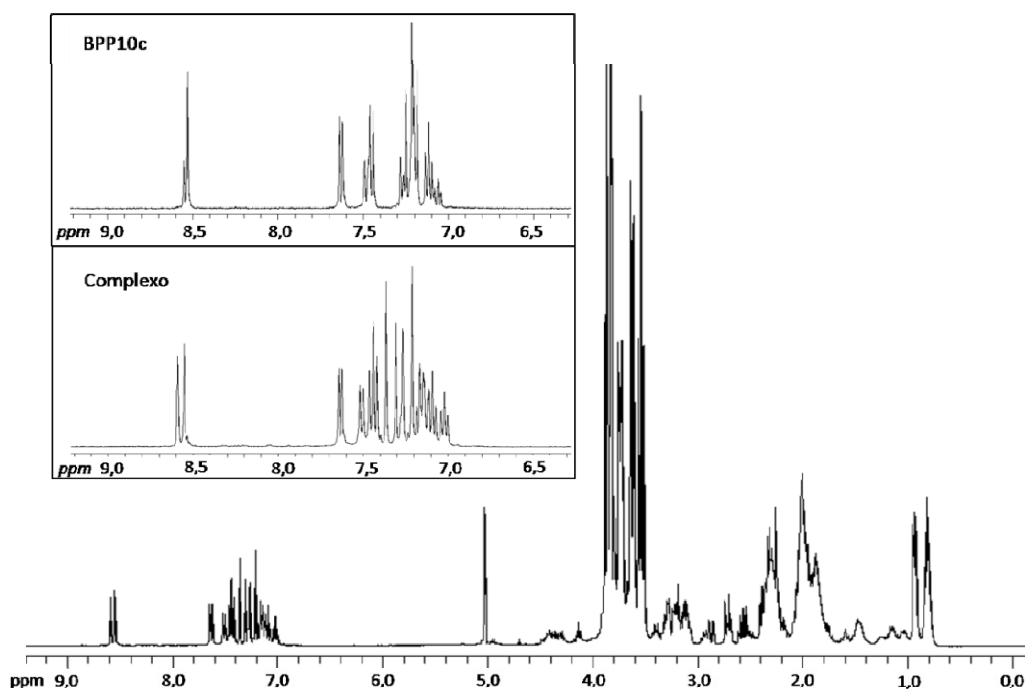


Figura 3.8: Espectro de RMN de ^1H para o sistema $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 400 MHz em D_2O a 5 % a 20°C .
Figura inserida: comparação entre a região aromática do espectro de hidrogênio do BPP10c e de seu complexo supramolecular.

É possível observar nos espectros de RMN de hidrogênio que em ambos os solventes utilizados (D_2O e D_2O/H_2O) há uma maior variação nos valores de deslocamento químico para a região referente aos hidrogênios aromáticos. Esse resultado pode ser verificado de forma mais evidente para aqueles hidrogênios do resíduo de triptofano, principalmente para o ($-NH$) que variou de δ 9,94 (BPP10c) para δ 10,1 (β CD:BPP10c) em D_2O/H_2O . Porém, a comparação da variação de deslocamento químico para cada hidrogênio não foi possível devido à sobreposição e ao desdobramento desses sinais na presença de β CD.

Além da maior variação no deslocamento químico para o resíduo de triptofano, foi verificado um desdobramento dos sinais de hidrogênio no espectro, principalmente para aqueles referentes à região aromática. Esses resultados estão de acordo com outros dados da literatura que demonstram uma afinidade preferencial dos anéis aromáticos com a cavidade de diferentes moléculas de ciclodextrina, que estão relacionadas principalmente ao efeito hidrofóbico.^{20,51,52,73,85,150}

Analisando ainda esse espectro, é possível verificar a presença de pelo menos duas estruturas secundárias para o BPP10c nos espectros para os complexos supramoleculares, através do desdobramento dos sinais de hidrogênio para o grupo ($-NH$) do resíduo de triptofano na região de δ 9,8 e para o grupo ($-CH$) da histidina na região de δ 8,6, Figuras 3.7 e 3.8 respectivamente. Esse resultado também foi verificado para o peptídeo puro, analisando esses mesmos sinais de hidrogênio. Porém, quando são comparadas às intensidades desses desdobramentos para os dois sinais de hidrogênio ($-NH$ do triptofano e $-CH$ da histidina) fica evidente uma diferença no perfil do espectro do BPP10c puro e em presença de β CD. Esse resultado sugere uma interação entre a molécula hóspede e hospedeira e ainda que esta interação intermolecular possa ser responsável por uma mudança sutil na estrutura secundária do peptídeo em solução.

Com o objetivo de determinar a interação intermolecular existente entre essas moléculas e ainda propor um arranjo supramolecular para o sistema, experimentos bidimensionais homonuclear $^1H/^1H$ NOESY foram realizados. A Figura 3.9 apresenta o mapa de contorno 2D NOESY para o sistema β CD/BPP10c.

Analisando esse mapa de contorno 2D NOESY é possível verificar correlações entre os hidrogênios $-NH$ do peptídeo (δ 6,0 a 9,0) com outros grupos da molécula do BPP10c (δ 1,0 a 5,0), demonstrando interações intra- e intermoleculares do BPP10c. Esse resultado demonstra que o peptídeo pode apresentar estruturação secundária em solução.

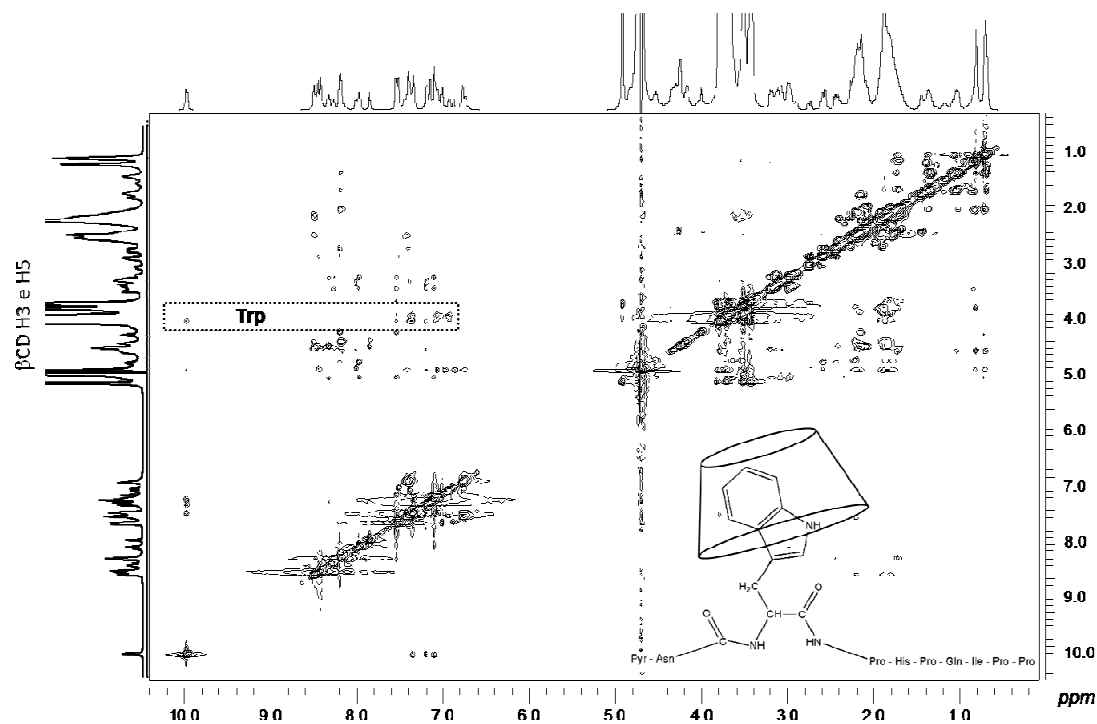


Figura 3.9: Mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY para o sistema supramolecular $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$ a 500 MHz a 20°C em $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ a 5 %.

Além de correlações dipolares entre os resíduos de aminoácido do peptídeo, o espectro de 2D NOESY também demonstrou correlações entre os hidrogênios internos da β -ciclodextrina, H3 e H5, e ainda o H6 (δ de 3,5 a 4,0) com aqueles hidrogênios aromáticos referentes ao resíduo de triptofano (δ de 6,5 a 7,5). Essa interação intermolecular de forma preferencial com o triptofano confirma a inclusão desse resíduo de aminoácido na cavidade da β -ciclodextrina e corrobora os resultados observados nos espectros de hidrogênio, que demonstram uma maior variação de deslocamento químico para esses sinais de hidrogênio em presença de βCD .

A afinidade preferencial da cavidade da β -ciclodextrina por anéis aromáticos tem sido observada para diferentes sistemas supramoleculares descritos na literatura.^{20,51-54,85,150} Mais ainda, a presença dessas correlações dipolares entre a βCD e o resíduo de triptofano sugere a formação de um complexo supramolecular com estequiometria do tipo 1:1 entre as moléculas de βCD e de BPP10c. Com o objetivo de confirmar a interação entre o peptídeo e a β -ciclodextrina, foi realizado o experimento de difusão na razão molar 1:1, razão essa sugerida pelo resultado do experimento de 2D NOESY. A Figura 3.10 apresenta o espectro de $^1\text{H}/^1\text{H}$ DOSY para o sistema $\beta\text{CD}/\text{BPP10c}$.

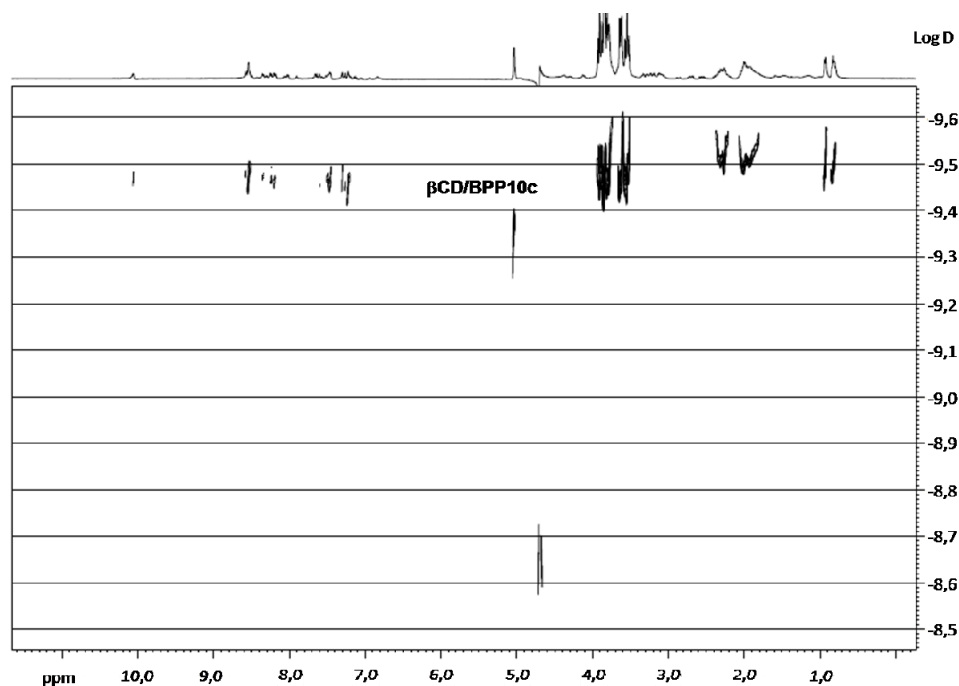


Figura 3.10: Espectro de RMN de difusão para o sistema β CD/BPP10c a 400 MHz a 20 °C em D_2O/H_2O a 5 %.

A técnica de difusão tem sido aplicada como uma ferramenta complementar para a caracterização de sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrina,^{21,52,155-157} principalmente quando há sobreposição de sinais da ciclodextrina e da molécula hóspede, impossibilitando identificar as correlações por $^1H/^1H$ NOESY. É possível verificar através desse experimento que as duas moléculas apresentam um mesmo coeficiente de difusão, com valor equivalente a $D \approx -9,48 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, o qual está relacionado como o tamanho, a forma e o peso molecular do sistema em solução.⁴⁴

Desta forma, macromoléculas que apresentam menores valores de “Log D” demonstram a existência de sistemas com maior peso molecular do que aquelas macromoléculas que apresentam valores de “Log D” maiores. Logo, quando esse valor de difusão para o complexo de inclusão é comparado com àquele observado para a β CD livre ($d \approx -6,7 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),¹⁵⁸ verifica-se que o sistema supramolecular apresenta maior peso molecular do que a β -ciclodextrina pura, indicando a interação entre as moléculas. Este resultado de difusão, no qual somente um valor de Log D foi observado, sugere a interação entre as moléculas em solução, resultado já observado pelos experimentos de RMN de hidrogênio e de $^1H/^1H$ NOESY, no qual foi verificada a correlação entre os hidrogênios do resíduo de triptofano e aqueles hidrogênios da cavidade da β CD.

3.1.2. Calorimetria de Titulação Isotérmica

A técnica de calorimetria de titulação isotérmica foi utilizada para determinar os parâmetros termodinâmicos do processo de formação do sistema supramolecular entre a β -ciclodextrina e o peptídeo BPP10c, além fornecer informações sobre o processo de agregação do peptídeo.¹⁵⁹ Embora, os parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC sejam um somatório dos efeitos de diferentes interações tais como, a agregação do complexo supramolecular formado, mudanças na estrutura do peptídeo e ainda dissociação do titulado ou titulante em solução, essa técnica permite determinar de forma direta a estequiometria do sistema, variação de entalpia e a constante de formação.¹⁰

Na Figura 3.11a estão apresentadas as curvas de diluição do peptídeo em água, assim como, a titulação do BPP10c em solução aquosa de β -ciclodextrina. Na Figura 3.11b é apresentada a curva final de titulação, na qual a diluição do peptídeo é subtraída da curva de titulação entre o BPP10c e a β CD.

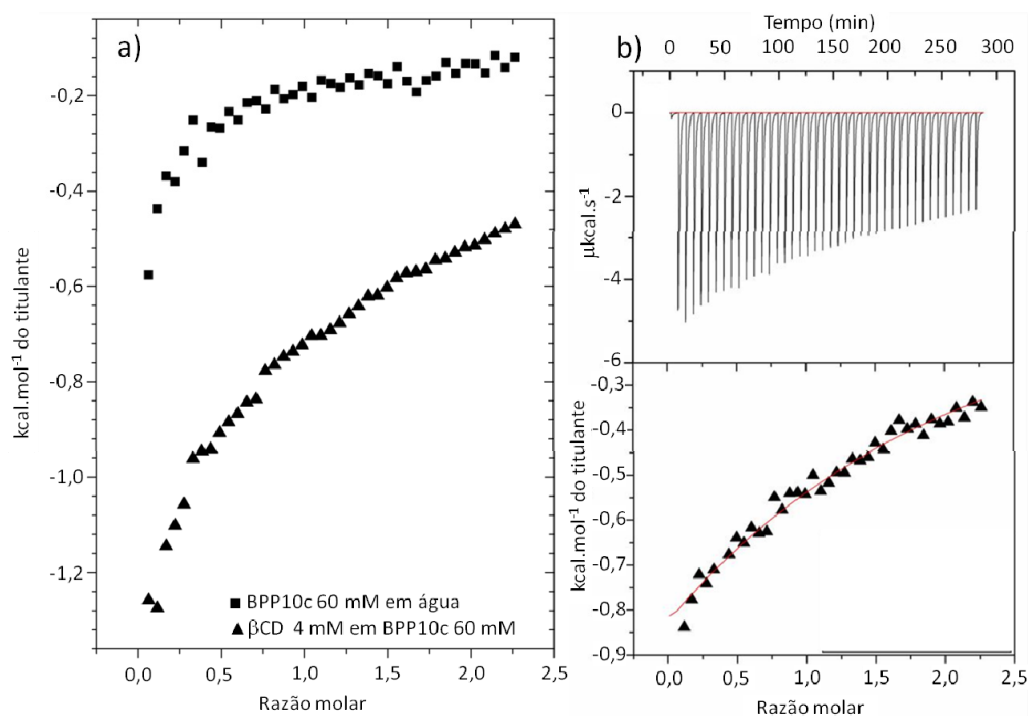


Figura 3.11: Curva calorimétrica para a) o BPP10c 60,0 mmol.L⁻¹ em água (■) e em solução aquosa de β CD 4,0 mmol.L⁻¹ (▲) e b) figura final (___) curva após a subtração e regressão não-linear (isoterma de Wiseman)¹⁶⁰ (---).

Analisando a curva de diluição do BPP10c em água verifica-se um caráter exotérmico, sugerindo um processo de auto-associação ou auto-agregação do peptídeo em solução.¹⁶¹ Esse mesmo comportamento exotérmico é observado no caso da titulação desse peptídeo em solução de β CD, Figura 3.11a, mesmo após a subtração da curva de diluição do peptídeo em água, Figura 3.11b. Esse resultado é característico de interações do tipo hóspede-hospedeiro e já foi observado para outros peptídeos da mesma família²⁰⁻²² e também para outros sistemas envolvendo ciclodextrinas com diferentes moléculas hóspedes.⁷⁶

A curva final de titulação da solução de β CD na solução do BPP10c não apresentou um ponto de inflexão referente ao ponto de equivalência do sistema. Embora este ponto de equivalência não tenha sido observado de forma evidente, os parâmetros termodinâmicos para o sistema β CD-BPP10c foram obtidos pelo ajuste não-linear da curva assumindo uma estequiometria do tipo 1:1, isoterma de Wiseman, Equação 3.1.¹⁶⁰

$$\frac{dQ}{d[X]_t} = \Delta H^\circ V_o \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R + r)^2 - 4X_R}} \right] \quad 3.1$$

A qual relaciona a variação de calor do sistema com o número de moles do titulante adicionado em cada injeção ($dQ/d[X]_t$) com a razão de concentração absoluta entre o titulado e o titulante em cada ponto durante o processo de titulação ($X_R = [X]_t/[M]_t$) para uma reação:



Onde,

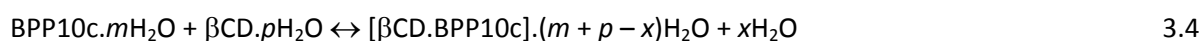
$$\frac{1}{r} = c = Ka[M]_t = \frac{[M]_t}{Kd} \quad 3.3$$

E V_o é o volume efetivo da cela calorimétrica, K_a a constante de associação e c a razão da concentração do titulado.

A escolha dessa razão molar para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos baseou-se nos resultados prévios obtidos pelos experimentos de ressonância magnética nuclear, os quais indicaram a interação preferencial entre a cavidade da β -ciclodextrina e o resíduo de aminoácido triptofano. Sendo assim, o valor da variação da energia de Gibbs padrão foi de $\Delta G^\circ = -10,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$, da variação

de entalpia padrão foi de $\Delta H^\circ = -15,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e a variação entrópica padrão foi de $T\Delta S^\circ = -5,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Porém, através da análise da curva de titulação isotérmica pode ser verificado que o sistema formado pela interação entre as moléculas de β CD e BPP10c exibe uma interação supramolecular fraca uma vez que um modelo sigmoideal não foi observado. Isso pode ser confirmado pelo valor da constante de equilíbrio de complexação (K_{eq}) obtido através do ajuste não-linear assumindo uma estequiometria do tipo 1:1, $K_{eq} = 71$. Esse valor de constante pode ser considerado baixo quando comparado a outros sistemas reportados na literatura, ($K_{eq} > 7000$)^{51,52} ou ainda para sistemas envolvendo interação entre enzimas e substratos ($K_{eq} > 20.000$)^{76,160}. A curva de titulação da β -ciclodextrina em água como descrito na literatura não apresentou nenhum perfil aparente, exotérmico ou endotérmico, o que sugere que nenhum efeito de agregação ou de dissociação possa ser quantificado por ITC.⁵⁴ O processo de interação entre as moléculas, BPP10c e β CD, pode ser descrito através da Equação 3.2.



De acordo com a Equação 3.1 acima, a complexação entre as espécies depende de dois processos simultâneos, a formação das interações não covalentes entre o peptídeo e a β -ciclodextrina e a reorganização do solvente. Do ponto de vista entálpico, a formação das interações não covalentes é um processo exotérmico ($\Delta H_{intrínseco} < 0$), enquanto que a quebra das interações do solvente é endotérmico ($\Delta H_{intrínseco} > 0$). Sendo assim, as interações são predominantes para a formação do complexo supramolecular β CD:BPP10c, uma vez que a variação entálpica observada para o sistema foi negativa. Tem sido proposto que durante o processo de formação das interações não covalentes, a reorganização do solvente conta para a contribuição da variação entálpica. Porém, a formação do complexo geralmente reduz a acessibilidade do solvente às moléculas do sistema. Consequentemente, a variação entálpica observada é o resultado compensatório da entalpia de dessolvatação e a entalpia intrínseca.^{76,161} A contribuição entrópica desfavorável observada para este sistema é atribuída a restrição conformacional dos resíduos de aminoácidos após a interação e complexação com a ciclodextrina.^{76,84,161-163}

3.1.3. Espectroscopia de Infravermelho – FTIR-ATR

A técnica de espectroscopia de infravermelho por reflectância total atenuada em solução, FTIR-ATR, foi utilizada para identificar as possíveis estruturas secundárias para o peptídeo, tanto na

presença como na ausência de β -ciclodextrina. Com esse objetivo, foram obtidos os espectros de infravermelho na região da banda de amida I de ν entre 1750 a 1550 cm^{-1} para o peptídeo e seu complexo com β CD em diferentes solventes.

Analisando o espectro do peptídeo livre em DMSO, é verificada uma única banda de infravermelho em ν 1663 cm^{-1} , referente aos grupos C=O da molécula, Figura 3.12a. Uma vez que os grupos carbonílicos presentes na cadeia do peptídeo são responsáveis pelas ligações de hidrogênio com os grupos (-NH) da estrutura da molécula, as ligações de hidrogênio intra- ou intermoleculares irão determinar a estruturação secundária dos peptídeos.¹⁶⁴ Logo, a existência de uma única banda referente ao grupo C=O na região de amida I para o BPP10c puro pode ser explicada pela quebra das interações intramoleculares do peptídeo pela molécula de DMSO, uma vez que grupos S=O do solvente irão competir com aqueles grupos C=O do peptídeo para formar ligações de hidrogênio com os grupos (-NH) da cadeia do peptídeo.^{140,145} Esse fenômeno é observado porque as ligações de hidrogênio entre os grupos S=O...H-N em solução são mais fortes do que as ligações intra- ou intermoleculares entre o peptídeo, ligações C=O...H-N peptídeo – peptídeo que serão rompidas, como representado na Figura 3.13. Como consequência da quebra das ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares do BPP10c, os grupos C=O estarão livres favorecendo a presença de uma única banda em ν 1663 cm^{-1} . Essa quebra nas interações intramoleculares do peptídeo indicam ainda a acessibilidade do solvente à estrutura da molécula, favorecendo uma estruturação estendida para o peptídeo, como já relatado na literatura para outros sistemas.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

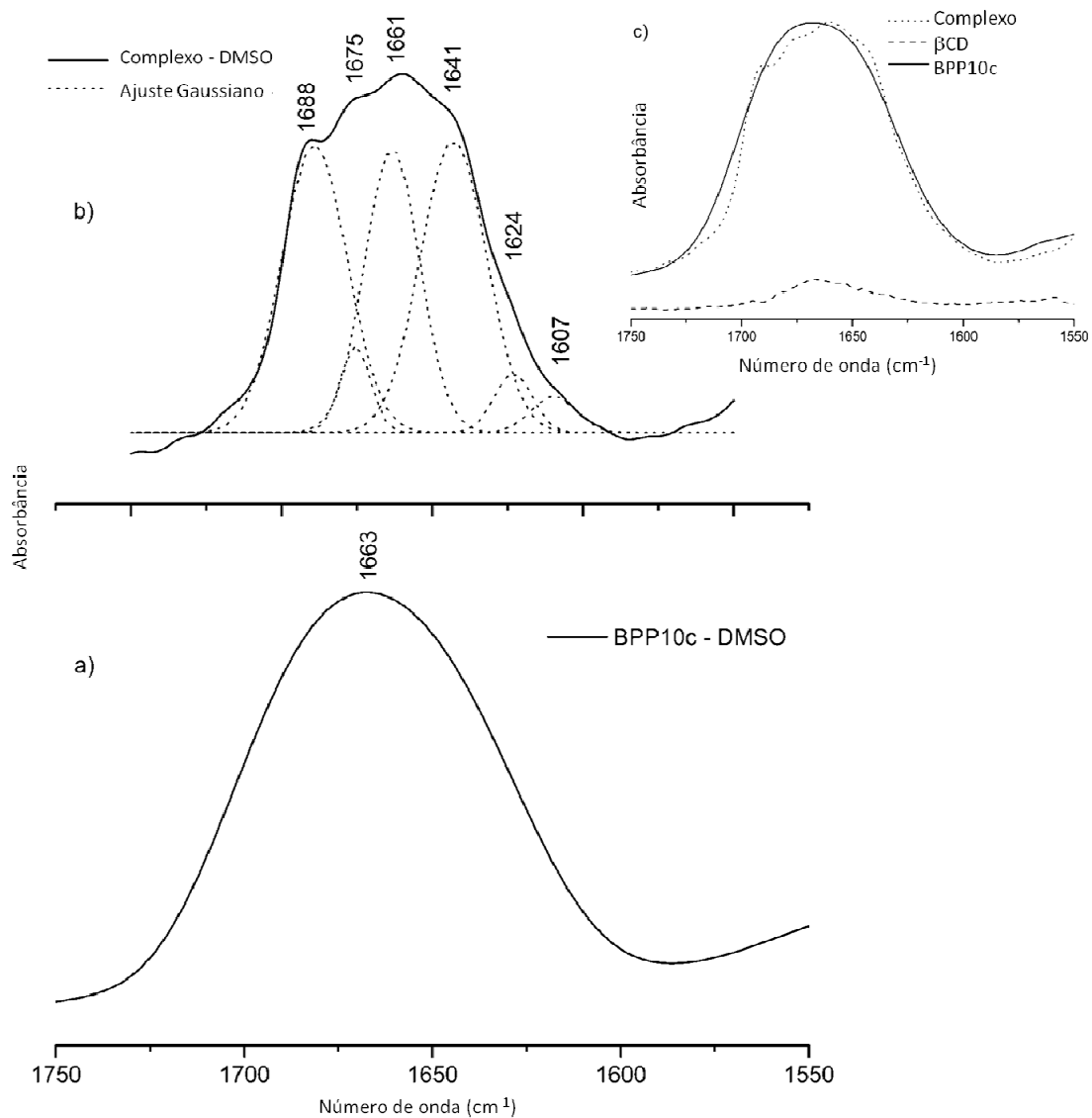


Figura 3.12: Espectro de FTIR-ATR na região de ν/cm^{-1} 1750 a 1550 para o BPP10c em DMSO a) na ausência de β CD, b) em presença de β CD com o ajuste não-linear (gaussiana) (---) e c) comparação entre BPP10c puro, complexo β CD/BPP10c e β CD pura.

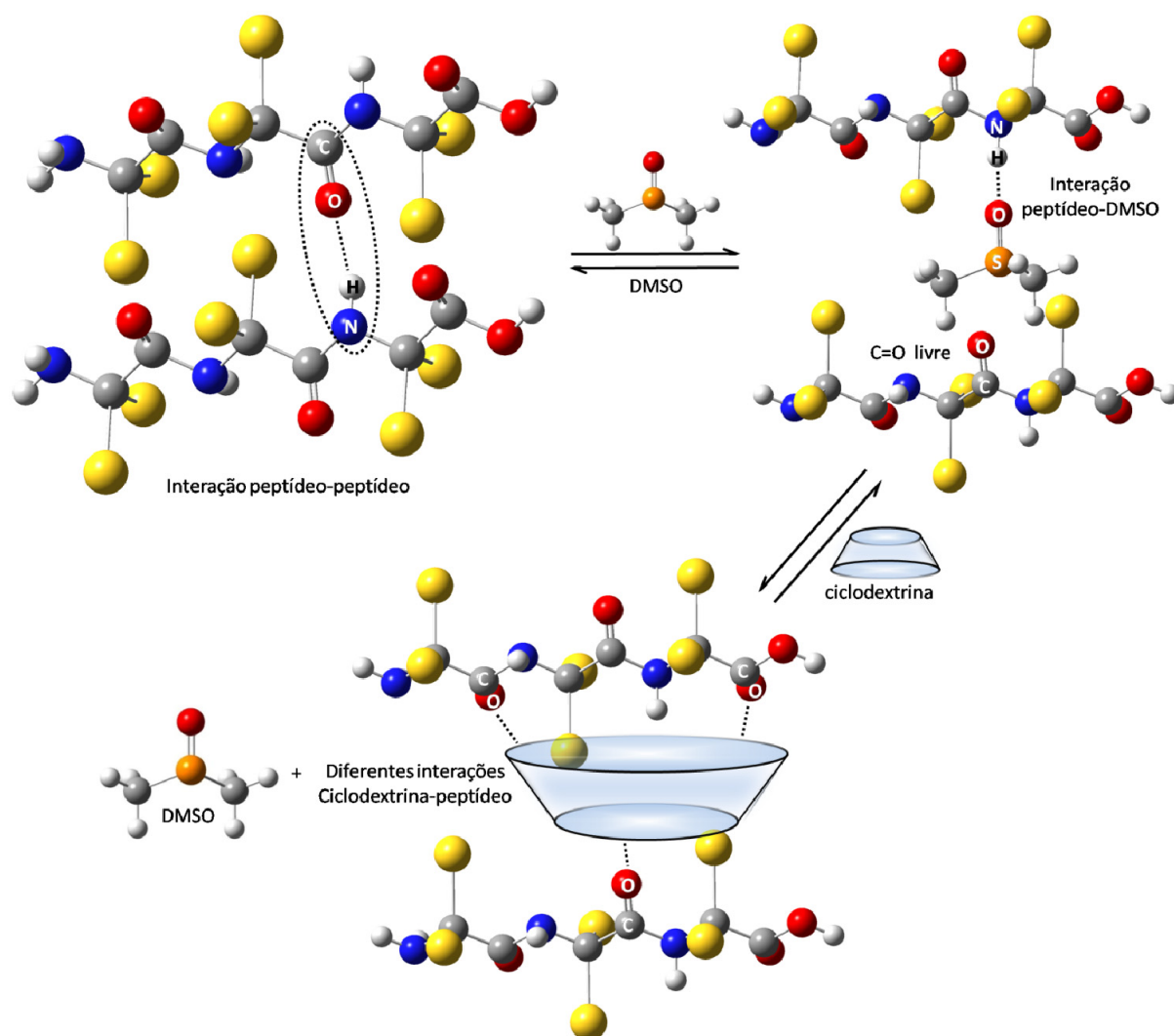


Figura 3.13: Representação esquemática das interações não covalentes para o sistema em equilíbrio entre peptídeo-peptídeo, peptídeo-solvente e peptídeo-ciclodextrina.

Analisando o espectro de infravermelho de FTIR-ATR para o sistema β CD/BPP10c em DMSO para a razão molar de 1:1, várias bandas referente à carbonila foram observadas quando o espectro é tratado pelo método da derivada segunda, Figura 3.12b. Esse resultado sugere que a β -ciclodextrina é capaz de competir com as moléculas do DMSO para interagir com o peptídeo de forma não covalente como observado pelos experimentos de RMN. Desta forma, as moléculas de β -ciclodextrina rompem algumas ligações de hidrogênio do tipo S=O...H-N favorecendo diferentes vizinhanças para os grupos C=O, como apresentado na Figura 3.13.

Sendo assim, um desdobramento daquela única banda em ν 1663 cm^{-1} , em seis bandas distinguíveis, foi verificado. Além disso, as modificações nas bandas de carbonila confirmam a interação intermolecular entre as moléculas de β CD e BPP10c em solução, além de sugerir que esta interação intermolecular é capaz de alterar a estrutura secundária do peptídeo. A Tabela 3.3

apresenta a atribuição das conformações do peptídeo na presença e na ausência de β -ciclodextrina, que foi baseada em atribuições já descritas para outros peptídeos na literatura,^{140,145,164} e ainda suas respectivas contribuições, que foram obtidas pela integração das áreas de cada gaussiana ajustada para cada banda de infravermelho.

Tabela 3.3: Posição e porcentagem das bandas de FTIR-ATR (ν/cm^{-1}) determinadas pela derivada segunda para as região de amida I do BPP10c e seus complexos em DMSO, H_2O e D_2O .

Amostra	DMSO		H_2O		D_2O	
	ν/cm^{-1}	Atribuição	ν/cm^{-1}	Atribuição	ν/cm^{-1}	Atribuição
BPP10c	1663 (100)	---	1611 (26,0)	Folha- β e Agregação	1622 (17,2)	Folha- β
			1631 (16,1)	Folha- β	1625 (18,2)	Folha- β
			1645 (7,7)	Aleatório	1639 (16,5)	Folha- β
			1661 (11,4)	Volta- β	1654 (17,2)	α -hélice
			1673 (38,8)	Folha- β	1671 (30,9)	Volta- β
β CD/BPP 10c	1607 (2,7)	Cadeia lateral	1608 (20,3)	β -folha e Agregação	1622 (10,2)	Folha- β
	1624 (3,7)	Folha- β	1620 (10,8)	Volta- β	1625 (36,2)	Folha- β
	1641 (32,1)	Volta- β	1635 (11,5)	Folha- β	1639 (11,4)	Folha- β
	1661 (26,0)	Volta- β	1647 (17,1)	Aleatório	1656 (22,6)	α -hélice
	1675 (4,3)	Folha- β	1662 (9,3)	Volta- β	1673 (19,6)	Volta- β
	1688 (31,2)	Folha- β	1676 (31,0)	Folha- β		

Valores em itálico entre parênteses representam a porcentagem de cada estrutura obtida pela integração das áreas para cada gaussiana obtida.

Foram observadas conformações estruturais do tipo β -folha em ν 1624, 1675 e 1688 cm^{-1} totalizando um percentual de 39,28 %. Além dessa estrutura β -folha, estrutura do tipo volta- β foi observada para os valores de ν 1641 e 1661 cm^{-1} , com um total de 58,05 % de estruturação. Deve ser ressaltado que a β -ciclodextrina pura não apresentou bandas de infravermelho significativas nas

concentrações e condições utilizadas para a avaliação da estruturação do peptídeo na região de ν 1750 a 1550 cm^{-1} que pudesse sobrepor àquelas bandas de amida I do peptídeo em solução de DMSO. Esse resultado pode ser demonstrado através da comparação dos espectros do BPP10c, β CD e do sistema β CD/BPP10c, Figura 3.12c.

Os espectros de FTIR-ATR para o peptídeo em água na ausência e presença de β -ciclodextrina são apresentados nas Figuras 3.14a e 3.14b, respectivamente. A atribuição das bandas observadas para o peptídeo e seu complexo supramolecular encontra-se apresentadas na Tabela 3.3.

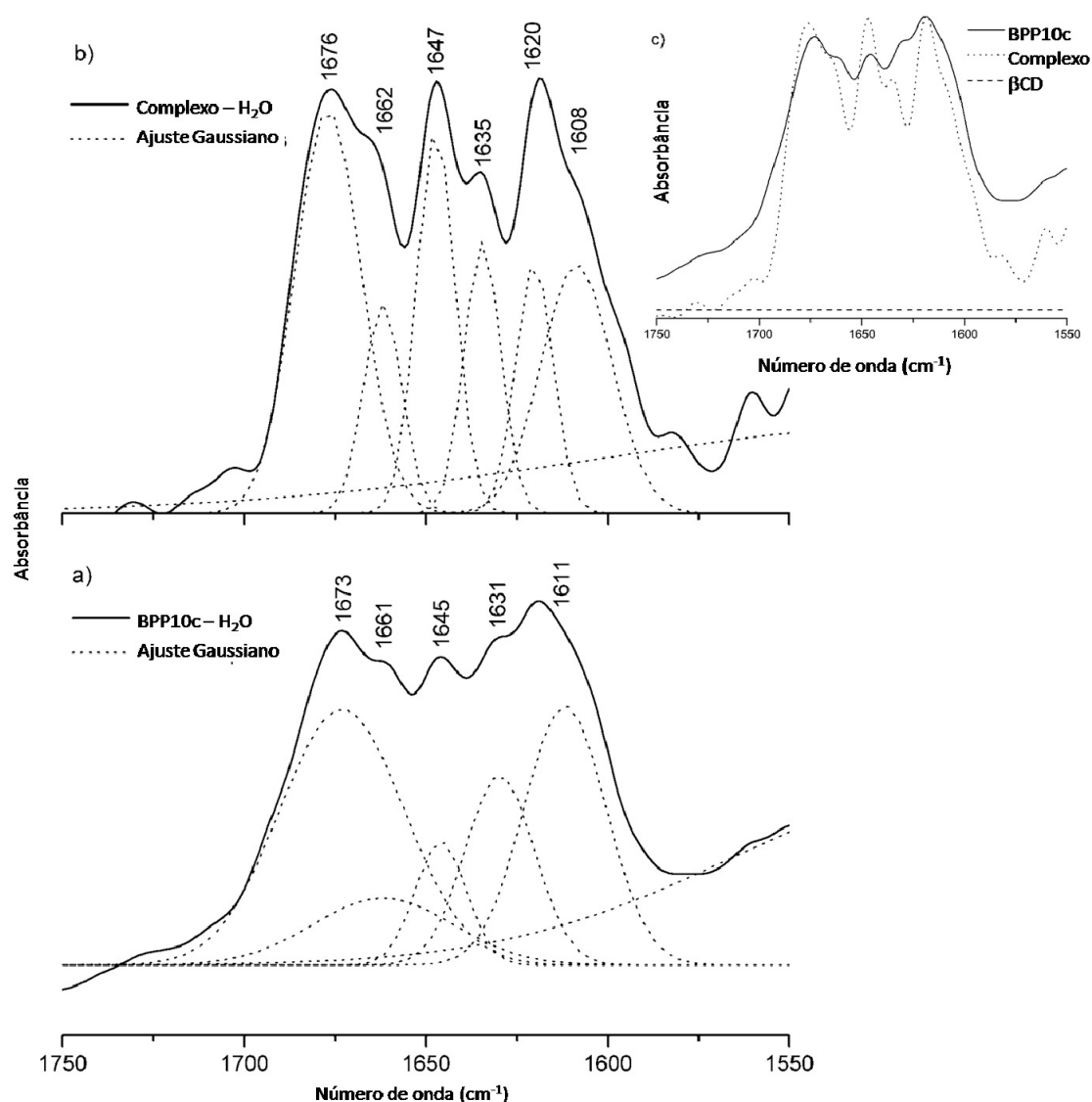


Figure 3.14: Espectro de FTIR-ATR na região de ν/cm^{-1} 1750 a 1550 para o BPP10c em H₂O a) na ausência de β CD, b) em presença de β CD com o ajuste não-linear (gaussiana) (---) e c) comparação entre BPP10c puro, complexo β CD/BPP10c e β CD pura.

É possível verificar que os valores de número de onda (ν) para a banda de amida I em solução na presença da β -ciclodextrina não apresentou variação significativa quando comparado com o espectro FTIR-ATR do BPP10c puro. Porém, foi verificada uma variação no percentual da contribuição de cada tipo de estrutura em solução. Para o peptídeo livre a contribuição da estrutura β -folha foi de 80,89 % para os valores de ν 1611, 1631 e 1673 cm^{-1} e para o complexo supramolecular para esta mesma estrutura a contribuição foi de 62,80 % para ν em 1608, 1635 e 1676 cm^{-1} , indicando uma redução nesta estruturação secundária quando a ciclodextrina é adicionada ao sistema. Já para a estrutura do tipo randômica, um aumento de 7,70 (ν 1645 cm^{-1}) para 17,05 % (ν 1647 cm^{-1}) foi observado quando a β -ciclodextrina é adicionada ao sistema. O mesmo fenômeno foi verificado para estrutura do tipo “turns”, na qual um aumento de 11,41 em ν 1661 cm^{-1} para 20,15 em ν 1662 cm^{-1} foi verificado. Os resultados em solução aquosa demonstram uma redução na contribuição do tipo β -folha com um aumento nas contribuições do tipo randômica e “turns” quando o complexo de inclusão é formado.

Para o peptídeo e o sistema supramolecular em solução de D_2O , Figuras 3.15a e 3.15b, um mesmo perfil no espectro de infravermelho foi observado com uma pequena variação nos valores de ν em cm^{-1} . Porém, desta vez em ambos os casos a estruturação do tipo α -hélice foi observada, com uma contribuição para o peptídeo puro foi de 17,07 % (ν 1654 cm^{-1}) valor esse inferior àquele obtido em presença de β -ciclodextrina, 22,57 % (ν 1656 cm^{-1}). A contribuição da estrutura do tipo β -folha para o peptídeo livre foi de 52,18 %, para os valores de ν 1622, 1625 e 1639 cm^{-1} e em presença de β CD foi de 57,85 % para os mesmo valores de ν 1622, 1625 e 1639 cm^{-1} . O último tipo de contribuição foi o tipo “turns” o qual em presença de β -ciclodextrina foi de 19,58 % em ν 1673 cm^{-1} e para o peptídeo livre foi de 30,75 % em ν 1671 cm^{-1} .

Os resultados obtidos utilizando os solventes DMSO, H_2O e D_2O mostram a capacidade da β -ciclodextrina interagir com a molécula do peptídeo nas condições estudadas. Além disso, a possibilidade de identificar as diferentes estruturas secundárias do peptídeo em solução permite inferir sobre a possibilidade da β -ciclodextrina em modificar a estrutura da molécula hóspede. Assim, os estudos em solução por FTIR-ATR podem ser uma forma rápida de análise para auxiliar a prever possíveis mudanças de estruturação de macromoléculas complexadas com ciclodextrina e uma relação entre a estrutura e a atividade dessas moléculas quando incluídas em ciclodextrina pode ajudar a entender resultados obtidos em testes biológicos.

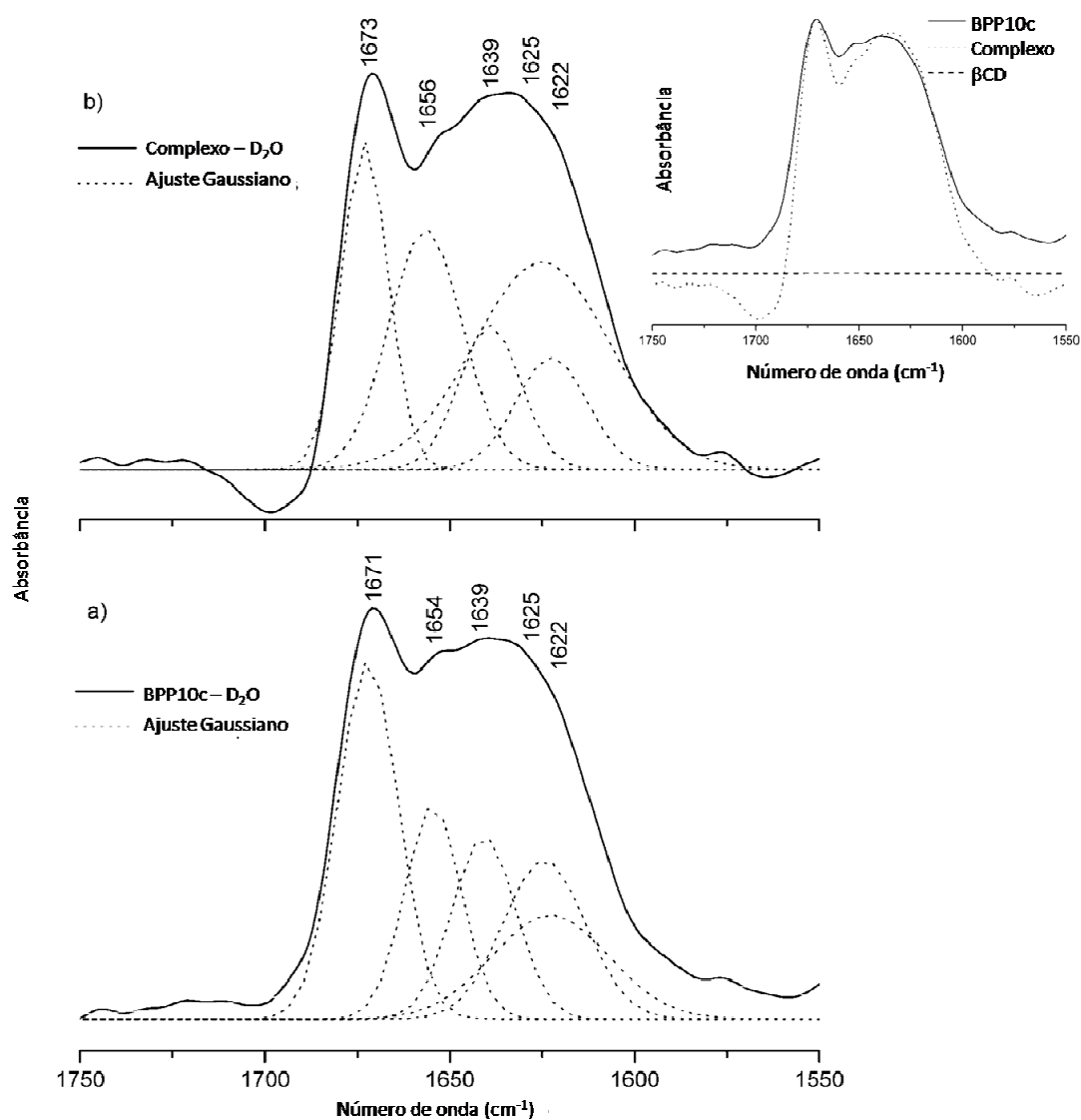


Figura 3.15: Espectro de FTIR-ATR na região de ν/cm^{-1} 1750 a 1550 para o BPP10c em D_2O a) na ausência de β CD, b) em presença de β CD com o ajuste não-linear (---) e c) comparação entre BPP10c puro, complexo β CD/BPP10c e β CD pura.

3.1.4. Dicroísmo Circular

Com o objetivo de confirmar os tipos de estruturas secundárias observadas pelo método da derivada segunda obtidas por FTIR-ATR em solução, espectros de dicroísmo circular para o peptídeo e seu complexo de inclusão na razão molar 1:1 foram obtidos. Para peptídeos e proteínas o grupo cromóforo de maior importância presente em sua cadeia é o $\text{R}_1(\text{C}=\text{O})-\text{NHR}_2$ referente à ligação peptídica. A presença desses grupos na estrutura primária dos peptídeos e proteínas interagindo de forma intermolecular faz com que essas macromoléculas apresentem estruturas secundárias do tipo α -hélice, β -folha ou ainda randômica, quando nenhuma regularidade conformacional é

observada.^{44,168} A investigação da estruturação dessas macromoléculas apresenta uma grande importância, uma vez que a atividade dessas moléculas pode estar relacionada com a estrutura. Sendo assim o estudo dessas estruturas em presença de ciclodextrina faz-se necessária, uma vez que esses macrociclos podem modificar a estrutura do peptídeo através da quebras das ligações intramoleculares da molécula.^{26,79}

A Figura 3.16 apresenta os espectros para o peptídeo BPP10c puro e para o complexo supramolecular β CD/BPP10c na razão molar de 1:1. O espectro de dicroísmo circular para o BPP10c apresenta um padrão randômico, que é comumente observado para peptídeos pequenos.^{20,21} Contudo, fazendo uso da deconvolução dos espectros do peptídeo e seu complexo de inclusão, utilizando o programa PEPFIT,¹⁶⁹ uma estrutura mais refinada pode ser obtida para os dois sistemas.

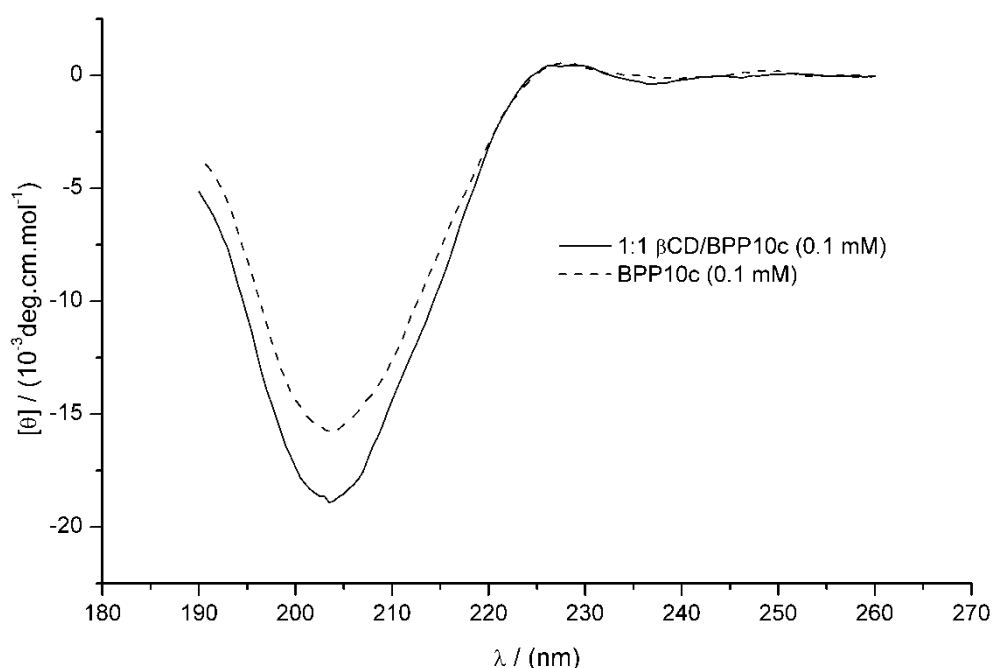


Figura 3.16: Espectro de dicroísmo circular para o BPP10c ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) e para o complexo supramolecular β CD/BPP10c ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) em tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 4,0).

Para o BPP10c foi possível observar 50 % de estrutura do tipo *gfas* e ainda 25 % de estruturas do tipo volta- β e 25 % de estruturas do tipo *gbt*.¹⁶⁹ A estrutura do tipo *gfas* é observada quando a conformação do tipo randômica apresenta um deslocamento para vermelho de aproximadamente 10 nm. Este fenômeno pode ser explicado pela presença dos resíduos de prolina, os quais previnem a formação de estruturas do tipo α -hélice e também ao reduzido tamanho da cadeia do peptídeo. Já a estrutura do tipo *gbt* pode ser atribuída a sistemas nos quais estruturas do tipo volta- β estão presentes, mas um rápido equilíbrio entre os possíveis ângulos de torção ϕ e ψ , Figura 3.17.^{167,169,170}

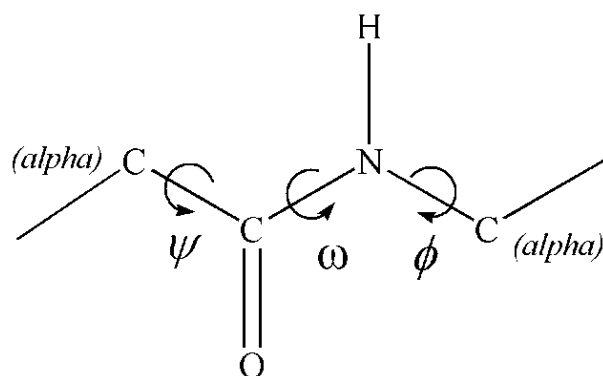


Figura 3.17: Representação esquemática da estrutura molecular para a região de ligação peptídica com os respectivos ângulos de torção.

O complexo supramolecular na razão molar de 1:1 apresentou um espectro de dicroísmo circular com perfil semelhante àquele observado para o peptídeo puro. Foi verificada uma mudança na estruturação do peptídeo na presença de β CD com: *gfas* (52 %), *gbt* (21 %) e volta- β (20 %). Os resultados obtidos por dicroísmo circular estão de acordo com aqueles verificados por infravermelho em solução. Além disso, combinando os resultados das duas técnicas observa-se a existência de estruturas secundárias semelhantes, sugerindo que essas metodologias podem ser uma boa ferramenta para a análise estrutural de peptídeos mesmo na presença de ciclodextrina. A complementaridade dessas duas ferramentas de análise tem sido aplicada a diferentes sistemas para peptídeos e proteínas auxiliando na determinação da estrutura secundárias dessas macromoléculas.^{140,142,145,171}

Capítulo 4

Agregação da β -ciclodextrina e seu Complexo Supramolecular

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados para a auto-organização e para a auto-agregação da β -ciclodextrina em água e também para o complexo supramolecular formado pela interação da Ampicilina com a β CD. Para a caracterização desses agregados moleculares e seus parâmetros termodinâmicos serão utilizadas técnicas de espalhamento de luz, dinâmica e estática, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, ressonância magnética nuclear, calorimetria de titulação isotérmica, microscopia de força atômica e também cálculos de dinâmica molecular em solução.⁵⁰

4.1. Auto-organização e Agregação da β -ciclodextrina e seu Complexo Supramolecular

4.1.1. Espalhamento de Luz Dinâmica e Estático

Os experimentos de espalhamento de luz dinâmica foram conduzidos nesse trabalho para avaliar o processo de auto-agregação da β -ciclodextrina em solução aquosa. Para essas titulações a variação da concentração de β CD foi plotada em função da intensidade de espalhamento de luz, medida em contagens por segundo (Kcps – “kilo cout per second”)¹⁴⁷. As curvas de titulação da β CD em água para as temperaturas estudadas de 293,15, 298,15 e 303,15 K estão apresentadas nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente.

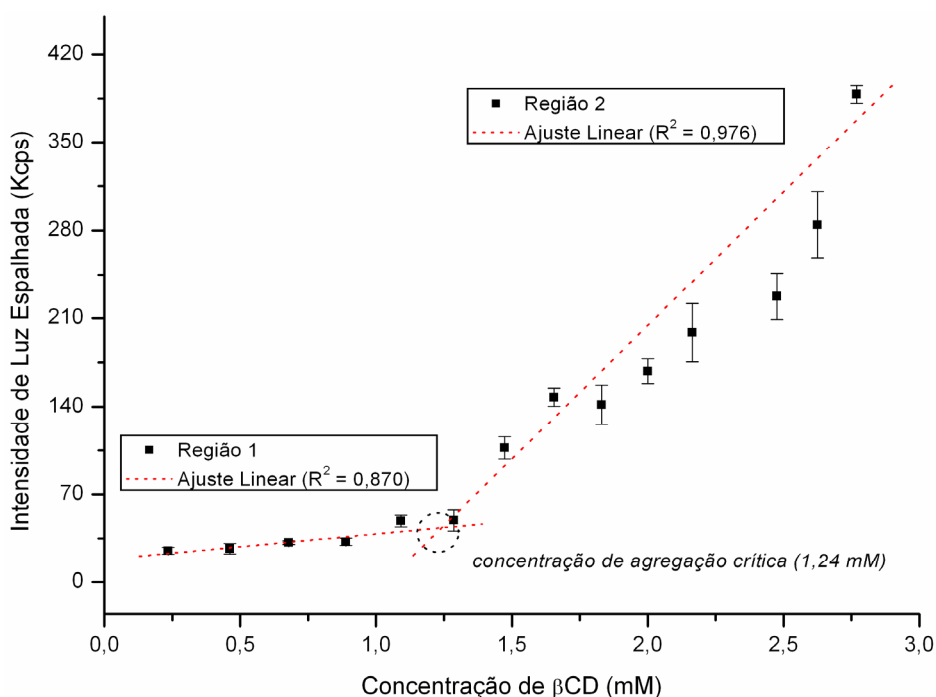


Figura 4.1: Curva de concentração de agregação crítica para a β CD em água a 293,15 K.

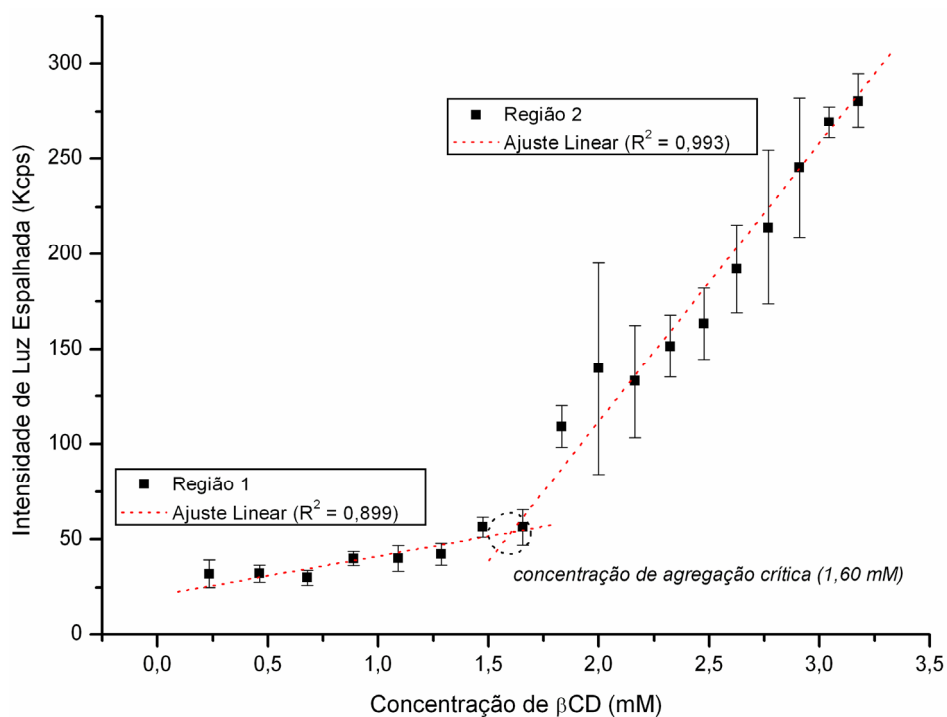


Figura 4.2: Curva de concentração de agregação crítica para a β CD em água a 298,15 K.

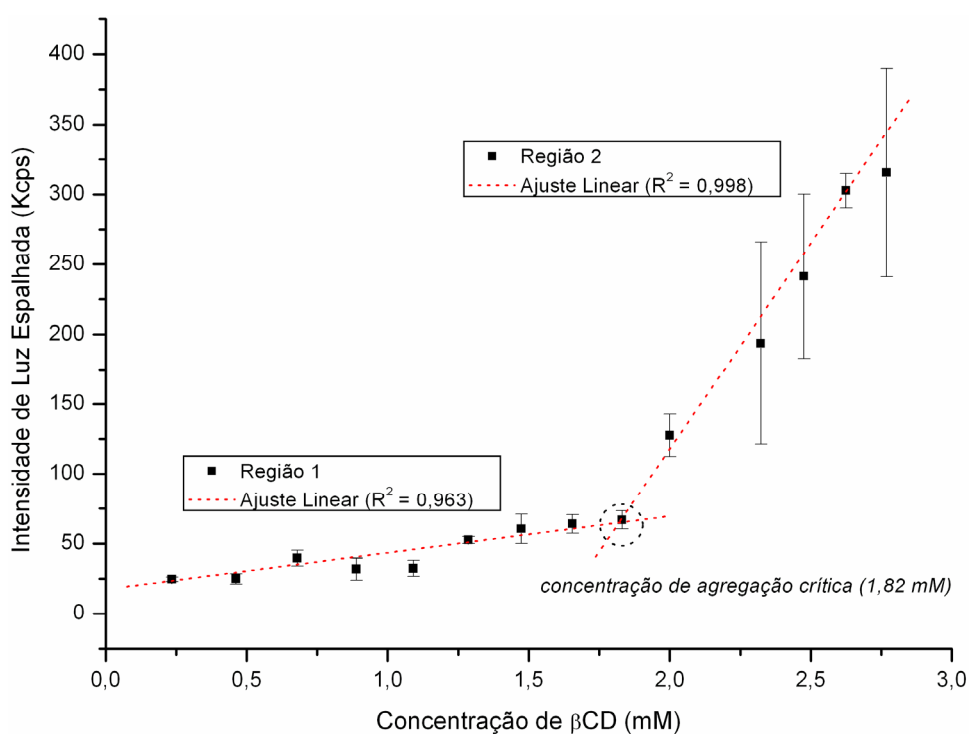


Figura 4.3: Curva de concentração de agregação crítica para a β CD em água a 303,15 K.

Analisando as curvas de titulação da β CD em água verifica-se duas regiões distintas, a região **1** e a região **2**. Essas duas regiões ficam evidentes com a análise dos ajustes lineares dos pontos de titulação. Os ajustes lineares para cada curva de titulação podem representar a existência de dois

sistemas supramoleculares distinguíveis, resultantes da interação intermolecular entre as moléculas de β -ciclodextrina em função da concentração. Neste sentido, a primeira parte da curva de titulação (região **1**) pode representar a forma não agregada da β -ciclodextrina em solução ou ainda, a formação de pequenos agregados os quais seriam menores do que aqueles observados para a segunda parte (região **2**) da curva de titulação.

Para confirmar a existência desses dois tipos de sistema distintos e sua dependência com a concentração de β CD, foi feita a medida de distribuição de tamanho para cada ponto da titulação. O gráfico de distribuição de tamanho para a região **1** está apresentado na Figura 4.4.

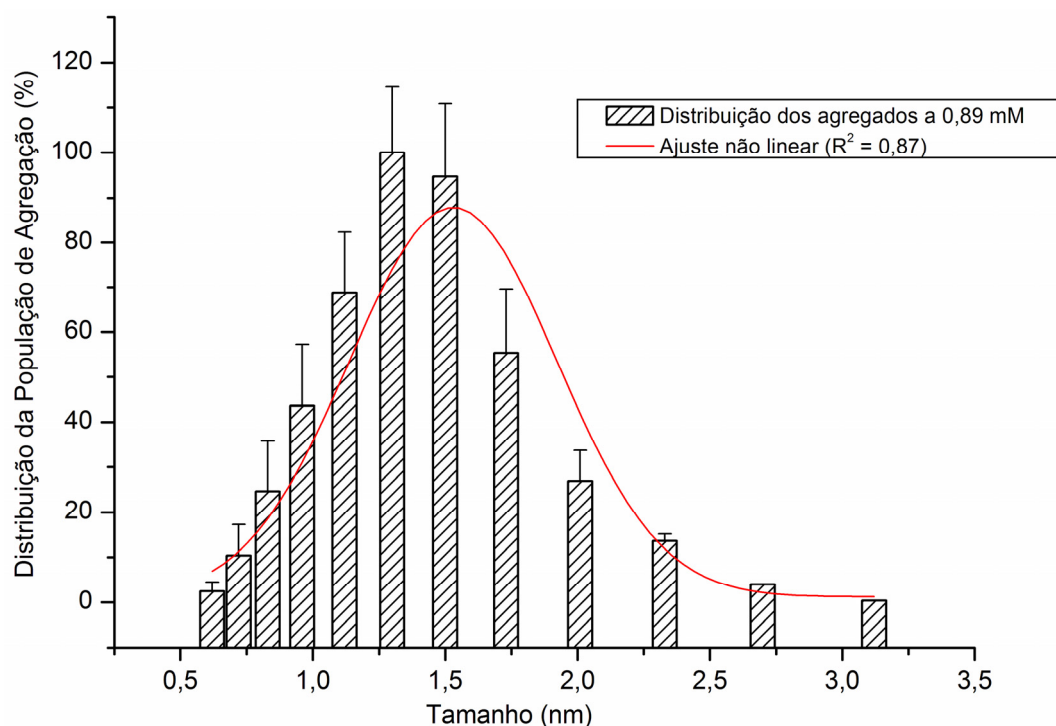


Figura 4.4: Distribuição da população de agregação para a β CD na concentração de $0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ em água a $298,15 \text{ K}$, representando a região **1**.

Esta curva de distribuição da população foi obtida pela soma das porcentagens de cada distribuição de tamanho em todas as medidas realizadas para a concentração de $0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ de β CD, com posterior normalização dos dados. Para esse sistema foi verificada uma distribuição de tamanho entre $0,6$ a $2,5 \text{ nm}$. Contudo, o ponto de máximo da distribuição de população apresentou um tamanho médio de aproximadamente $1,5 \text{ nm}$. Para esse tamanho de sistema alguns arranjos supramoleculares foram propostos e apresentados na Figura 4.5.

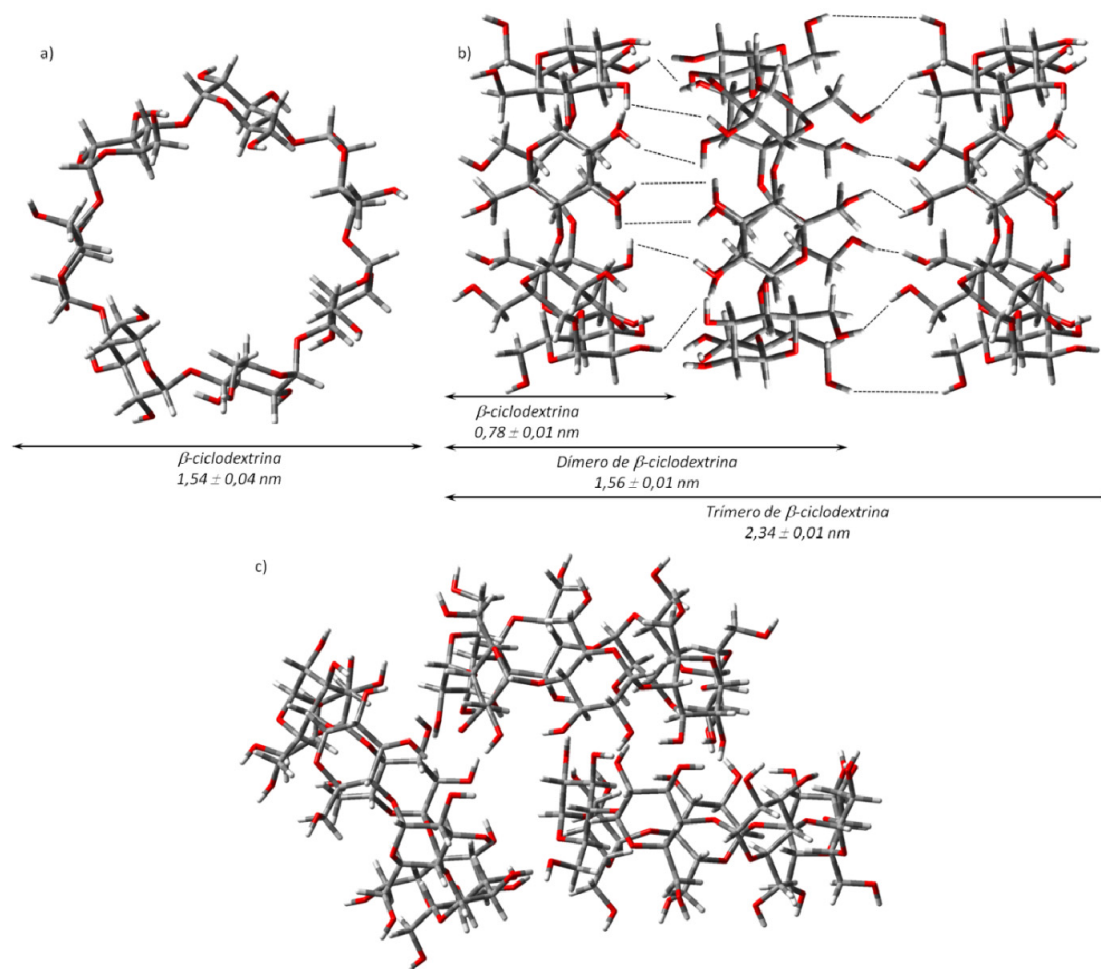


Figura 4.5: Representação esquemática de alguns possíveis sistemas antes da *cac* a) diâmetro da molécula de β CD, b) possíveis agregados formados pela interação frontal entre monômeros de β CD e c) agregado formado de estrutura em ziguezague.

De acordo com o ponto de máximo equivalente a 1,5 nm obtido pela curva de distribuição esse resultado pode representar o diâmetro médio de uma molécula de β CD livre, Figura 4.5a.⁵⁸ Além desse monômero, esse resultado pode também representar a interação frontal de duas ou três moléculas de β -ciclodextrina, formando dímeros ou trímeros em solução aquosa, Figura 4.5b.¹⁷² E por último, essa medida poderia estar relacionada com formação de estruturas agregadas em ziguezague, como apresentada na Figura 4.5c.⁴

A possibilidade de formação de agregados lineares pode ser sustentada pela presença dos grupos funcionais (-OH) nas bordas do cone da molécula de β CD, que são capazes de formar ligações de hidrogênio intermoleculares. A existência dessas estruturas formadas por moléculas de β -ciclodextrina conectadas pela interação frontal é considerada uma das etapas fundamentais para a síntese de rotaxanos e polirotaxanos. Porém, para a síntese dessas macroestruturas são utilizadas soluções concentradas de ciclodextrina e mais ainda, a presença da molécula hóspede geralmente

um polímero de cadeia linear, pode favorecer o alinhamento dessas ciclodextrinas que serão estabilizadas por ligações de hidrogênio.^{75,77,173} Encontram-se descritas na literatura evidências teóricas da formação de dímeros de α -ciclodextrina em fase gasosa, considerando diferentes tipos de interações frontais entre as moléculas de α CD, na qual a interação entre duas cavidades menores foi energeticamente favorável comparada as outras estruturas estudadas. As estruturas em ziguezague, por sua vez, já foram determinadas teoricamente e também no estado sólido por alguns autores na literatura, evidenciando a possibilidade real de existência dessa macroestrutura.^{4,174,175}

Para a região **2** da curva de titulação são observados a presença de agregados de tamanho maior do que aqueles observados para a região **1**, como observado na curva de distribuição de população que está apresentada na Figura 4.6. A confirmação da presença de agregados de tamanho maior é feita pela presença de nanoestruturas com diâmetro que podem variar de 40 a 250 nm. Além disso, com a análise desse gráfico é possível verificar dois pontos de máximo de distribuição, um em aproximadamente 60 nm e outro em 120 nm, demonstrando que não há uma distribuição homogênea dos agregados para a região **2**. Esse resultado pode ajudar a entender o motivo pelo qual um desvio padrão maior observado para os pontos da curva de titulação plotada em função da intensidade de luz espalhada, para os pontos da segunda parte da curva (região **2**).

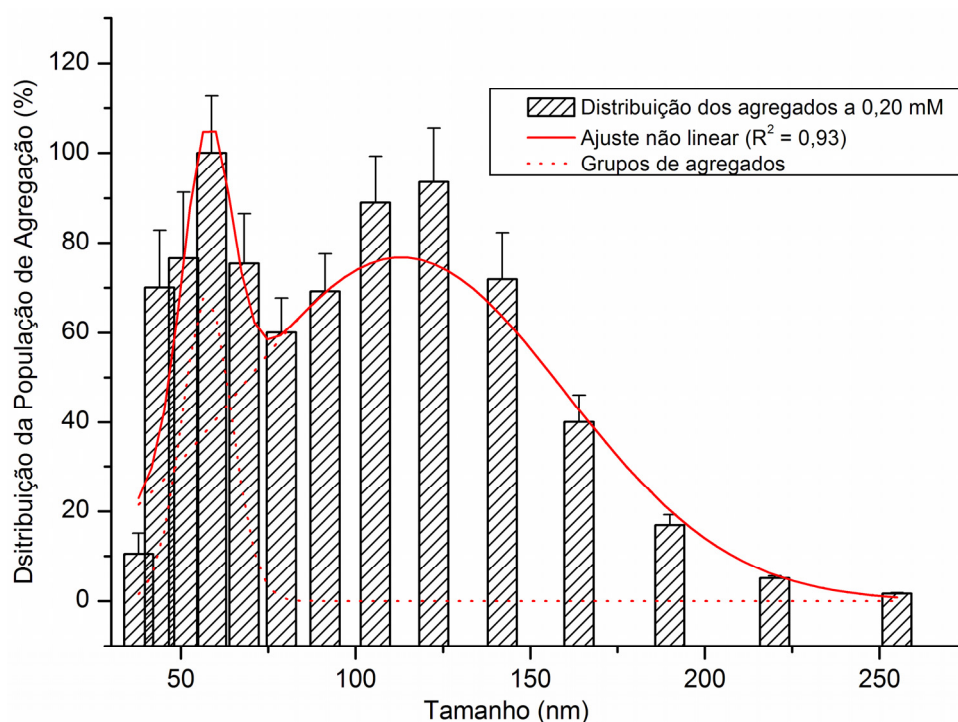


Figura 4.6: Distribuição da população de agregação para a β CD na concentração de $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em água a $298,15 \text{ K}$, representando a região **2**.

Esses resultados obtidos para as curvas de distribuição da população, para as duas regiões na temperatura de 298,15 K, também foram verificados para as temperaturas de 293,15 e 303,15 K. Os resultados obtidos para o tamanho dos agregados de β -ciclodextrina em solução aquosa estão de acordo com outros dados já descritos na literatura para a auto-agregação de ciclodextrinas naturais, entretanto, soluções de diferentes concentrações de ciclodextrina foram utilizadas nesses trabalhos.^{4,39,41,46}

Analisando as curvas de titulação da solução aquosa de β CD em água, o ponto de interseção entre os dois ajustes lineares, refere-se ao ponto de concentração de agregação crítica, que é definido como *cac*. Os valores de *cac* obtidos para as três temperaturas analisadas estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros termodinâmicos de agregação obtidos por espalhamento de luz para a β CD.

Temperatura /K	<i>cac</i> /mmol.L ⁻¹	$\Delta_{ag}G^{\circ}$ /kJ.mol ⁻¹	$\Delta_{ag}H^{\circ}$ /kJ.mol ⁻¹	$T\Delta_{ag}S^{\circ}$ /kJ.mol ⁻¹	A_2 /mol.mL.g ⁻²
293,15	1,239	-16,31	-26,48	-10,17	-8,88 x 10 ⁻⁵
298,15	1,604	-15,95	-26,48	-10,53	-9,00 x 10 ⁻⁵
303,15	1,821	-15,90	-26,48	-10,58	-5,44 x 10 ⁻⁵

Além disso, os valores de *cac* determinados por espalhamento de luz encontram-se próximos àqueles obtidos previamente por Bonini e Rossi.^{39,40} Esses autores identificaram estruturas de 90 nm de diâmetro para soluções com concentração a partir de 3 mmol.L⁻¹ de β CD. Para os valores de concentração de β CD inferiores a 3 mmol.L⁻¹, foram observados sinais negligenciáveis por Bonini e colaboradores,³⁹ porém, no presente estudo esse fato não ocorreu. Essa diferença na resposta observada para a medidas de espalhamento de luz pode estar relacionada como o método de preparo das soluções de β -ciclodextrina,⁴¹ uma vez que no trabalho de Bonini e colaboradores as soluções de β -ciclodextrina foram filtradas o que pode remover da solução agregados de β CD, influenciando na concentração de soluto no solvente (água), desfavorecendo assim a formação dos agregados. No presente estudo a água foi filtrada antes do preparo das soluções, método que não altera a concentração de β CD na solução final.

Com base nos valores obtidos de *cac* pelos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, os parâmetros termodinâmicos de agregação para a β -ciclodextrina foram calculados, uma vez que a auto-agregação da β CD em solução pode ser tratada de forma semelhante àquela observada para surfactantes de baixa massa molecular.⁴⁹ Para isso foi utilizado o modelo de separação de pseudofase, o qual considera os agregados como sendo uma fase separada no ponto da *cac*. Desta

forma a variação da energia livre de Gibbs de agregação padrão pode ser expressa pela Equação 4.1:^{49,176,177}

$$\Delta_{ag}G^{\circ} = RT \cdot \ln(X_{cac}) \quad 4.1$$

Na qual R é a constante da lei dos gases ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T a temperatura absoluta (Kelvin) e X_{cac} é a concentração de agregação crítica. Além disso, aplicando a equação de Gibbs-Helmholtz, Equação 4.2, a variação da entalpia de agregação padrão pode ser encontrada.¹⁷⁶

$$\Delta_{ag}H^{\circ} = R \left[\frac{\partial \ln(X_{cac})}{\partial 1/T} \right]_P \quad 4.2$$

A variação de entropia de agregação padrão pode ser obtida pela Equação 4.3, uma vez que os valores de $\Delta_{ag}G^{\circ}$ e $\Delta_{ag}H^{\circ}$ já foram obtidos.

$$\Delta_{ag}S^{\circ} = (\Delta_{ag}H^{\circ} - \Delta_{ag}G^{\circ}) / T \quad 4.3$$

Os valores encontrados para os parâmetros termodinâmicos de agregação da β -ciclodextrina estão apresentados na Tabela 4.1. Os valores negativos obtidos para a variação de energia livre de Gibbs padrão de agregação ($\Delta_{ag}G^{\circ}$) da β CD nas três temperaturas estudadas demonstram a espontaneidade do fenômeno de auto-agregação em solução aquosa. Esses valores de $\Delta_{ag}G^{\circ}$ para o processo de auto-agregação da β CD são próximos a outros valores reportados na literatura, para β -ciclodextrinas modificadas ($\Delta_{ag}G^{\circ} = -40,28$ e $-43,00 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Nesse trabalho os grupos hidroxila primários e secundários foram substituídos por grupos de oligo etilenoglicol.⁴⁹ Porém, esse sistema formado pela agregação da β CD modificada foi favorecido pela interação intermolecular dos substituintes das bordas da β -ciclodextrina, justificando o caráter mais espontâneo do processo. Em outro estudo no qual foi analisada a formação do poli-rotaxano formado pela associação de pentaetilenohexamina e α CD,¹⁷⁷ o valor de $\Delta_{ag}G^{\circ} = -34,03 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ foi determinado, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Fazendo uso da Equação 4.2 e do gráfico de \ln_{cac} em função de $1/T$ determinou-se a variação de entalpia padrão de agregação ($\Delta_{ag}H^{\circ}$), Figura 4.7. Do ponto de vista entálpico a formação de interações não covalentes é considerado um processo exotérmico ($\Delta H_{intrínseco} < 0$), enquanto que a

quebra da estrutura definida do solvente é endotérmico ($\Delta H_{dissolvatação} < 0$).¹⁶¹ Assim, para o sistema formado pela auto-agregação da β CD a variação entálpica determinada foi de $\Delta_{ag}H^0 = -26,48 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

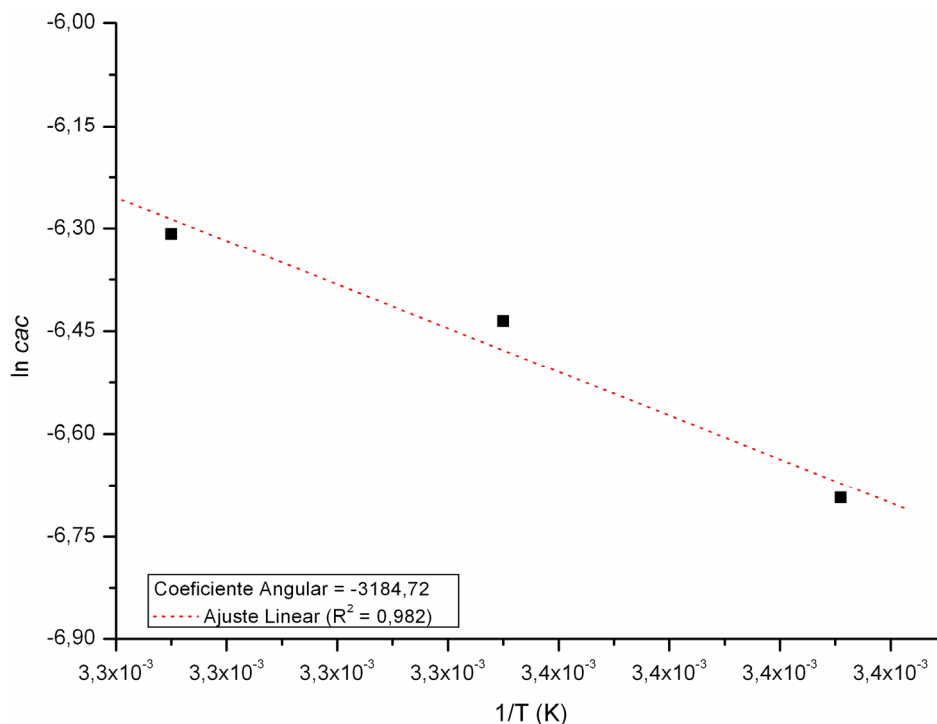


Figura 4.7: Curva de $\ln_{cac} \times 1/T$ e ajuste linear para a determinação da $\Delta_{ag}H^0$ para a β CD.

Os valores positivos de $T\Delta_{ag}S^0$ calculados pela Equação 4.3 estão apresentados na Tabela 4.1 demonstram um caráter entropicamente desfavorável. Vale ressaltar que no processo de agregação pode ocorrer contribuição entrópica desfavorável devido à restrição conformacional após a formação dos agregados em solução. Assim, os valores negativos de entropia observados para as três temperaturas podem indicar uma organização do sistema após com a formação dos agregados.^{36,52,58}

Com o objetivo de determinar o número de unidades de β -ciclodextrina por agregado (M) e o segundo coeficiente do viral (A_2) foram realizados experimentos de espalhamento de luz estático para a região **1**. As Figuras 4.8, 4.9 e 4.10 apresentam as curvas de Debye para as temperaturas de 293,15, 298,15 e 303,15 K, respectivamente.

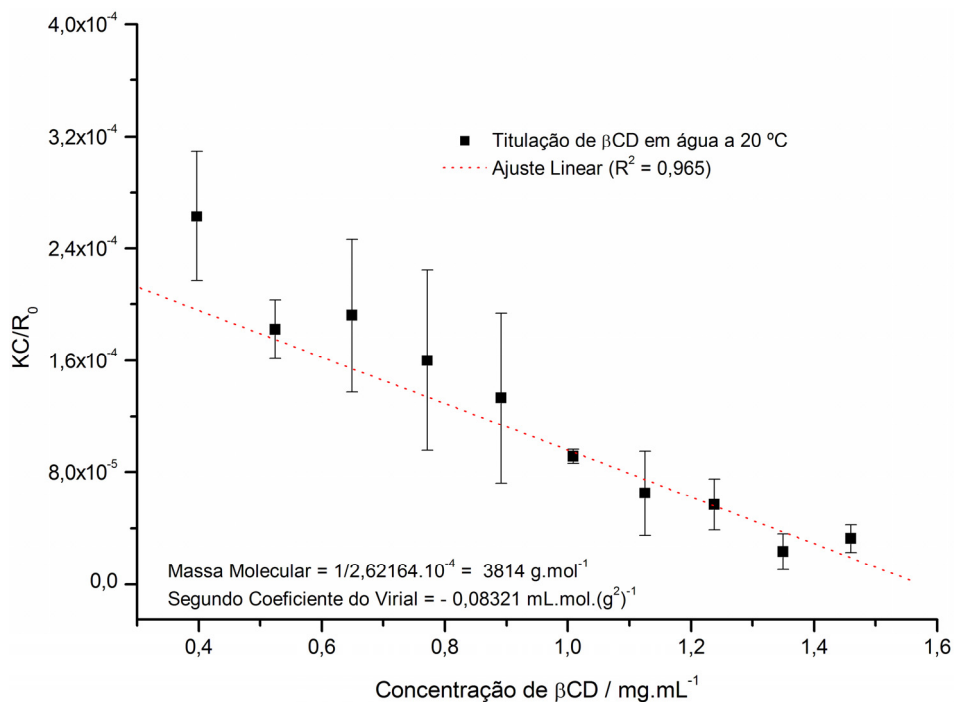


Figura 4.8: Curva de Debye para determinar o número de moléculas de β CD por unidade de agregado em água a 293,15 K para a região **1**.

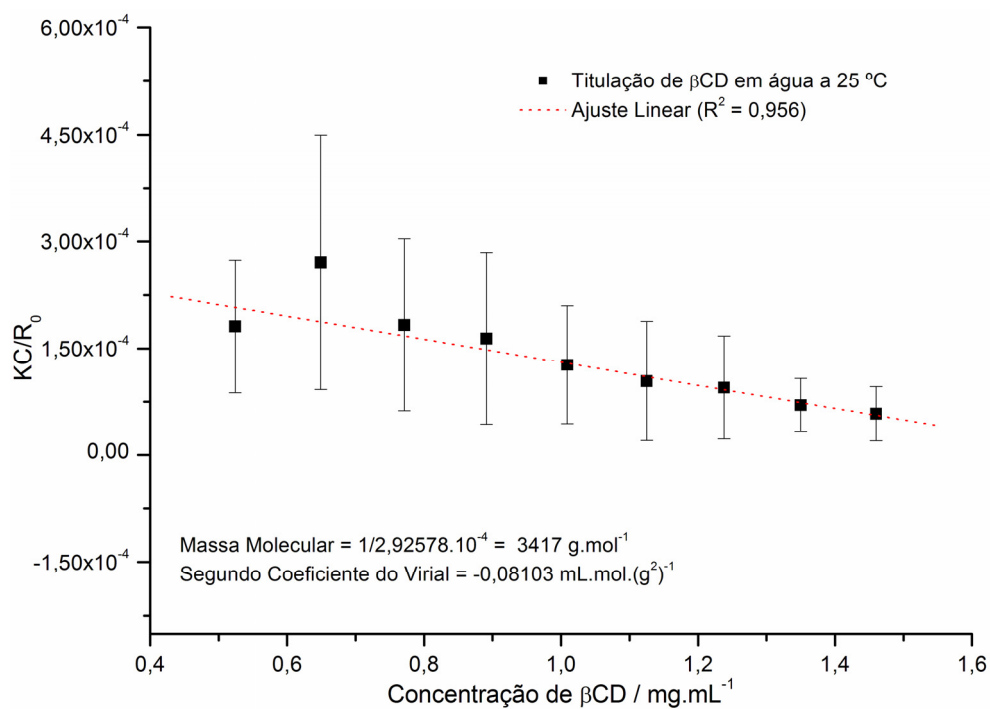


Figura 4.9: Curva de Debye para determinar o número de moléculas de β CD por unidade de agregado em água a 298,15 K para a região **1**.

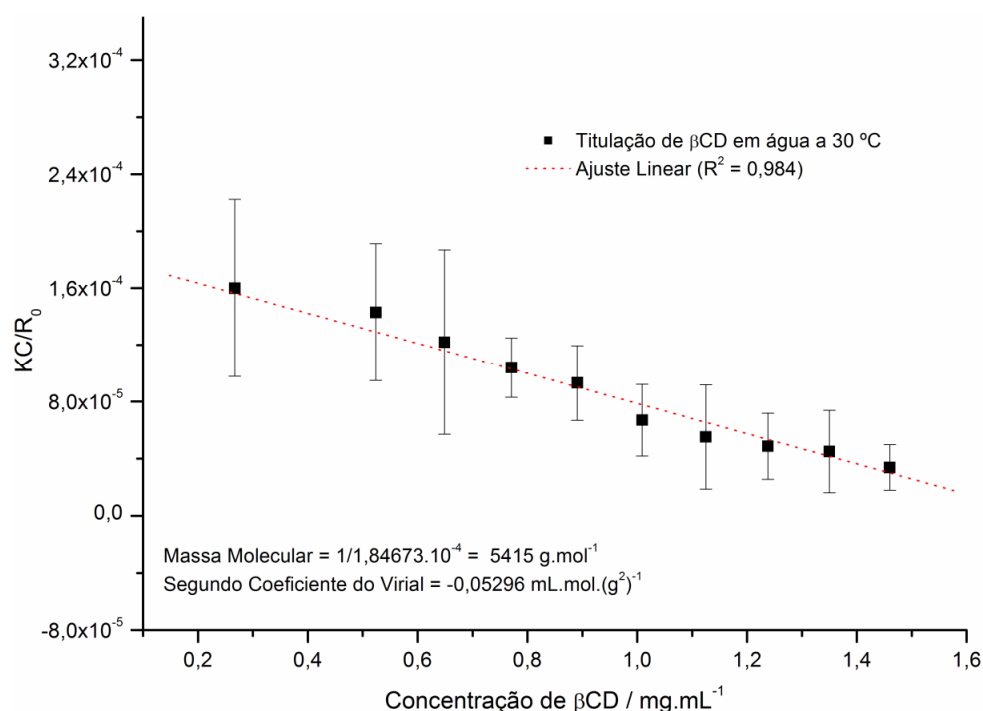


Figura 4.10: Curva de Debye para determinar o número de moléculas de β CD por unidade de agregado em água a 303,15 K para a região **1**.

Para a determinação dos parâmetros M e A_2 foi utilizada Equação 4.4, a qual correlaciona o número de moléculas por agregado (M), o segundo coeficiente do virial (A_2), a constante óptica (K), a concentração do soluto (C) e o raio de Rayleigh (R_θ) sem levar em consideração o fator de forma do agregado (P).

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad 4.4$$

A constante óptica (K) é definida pela Equação 4.5, na qual n_o é o índice de refração do solvente, dn/dc representa o incremento do índice de refração da solução pelo aumento das unidades de concentração de massa da β CD (equivalente a $0,139 \text{ mL.g}^{-1}$)¹⁴⁸, λ_o é o número de luz espalhada no vácuo e N_A o número de Avogrado.

$$K = \frac{2\pi^2 n_o^2 (dn/dc)^2}{\lambda_o^4 N_A} \quad 4.5$$

A partir dos experimentos de Debye foi possível determinar o peso médio de 3378 g.mol^{-1} dos agregados formados em solução para as temperaturas de 293,15 e 298,15 K, Figuras 4.8 e 4.9. Levando em consideração a massa molecular⁵⁸ da β CD que é equivalente a 1135 g.mol^{-1} , pode-se determinar que o agregado formado nas temperaturas de 293,15 e 298,15 K é constituído de três moléculas de β -ciclodextrina. Esse resultado sugere que mesmo em soluções diluídas de β -ciclodextrina, região antes do ponto de concentração de agregação crítica, a β CD tende a formar agregados moleculares estabilizados por interações não covalentes. À temperatura de 303,15 K, Figura 4.9, um agregado com maior massa (5307 g.mol^{-1}) foi verificado em solução do que aqueles observados anteriormente. Esse valor de massa pode ser correspondente a agregação de quatro ou cinco moléculas de β -ciclodextrina.

Outra evidência que suporta nossa hipótese para a agregação da β -ciclodextrina antes do ponto de *cac* foi obtida pelos valores obtidos para o segundo coeficiente do virial. Esse parâmetro foi utilizado para avaliar as forças atrativas e repulsivas entre o soluto (moléculas de β CD) e o solvente (água).^{178,179} Foram obtidos valores negativos de A_2 para as três temperaturas estudadas, como verificado pela inclinação das curvas de Debye, Figuras 4.8, 4.9 e 4.10, os quais encontram-se apresentados na Tabela 4.1. Esses valores negativos refletem uma interação entre as moléculas de β -ciclodextrina, levando ao processo de formação dos agregados. A comparação direta dos resultados de A_2 para as três temperaturas não pôde ser feito, uma vez que estes valores são muito pequenos, o que levaria a um erro de interpretação dos resultados. Porém, resultados com valores negativos e ainda na mesma ordem de grandeza para A_2 já foram descritos na literatura para sistemas envolvendo lipossomas, associação de polímeros com ciclodextrina e proteínas.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ O mesmo experimento de Debye conduzido para a região **1** (antes da *cac*) foi realizado para a região **2**. Porém, devido ao alto desvio padrão para as medidas feitas para essa região, oriundo da grande polidispersidade ou heterogeneidade do sistema, não puderam ser obtidos ajustes satisfatórios e assim não foi possível obter o número de β CD por agregado.

A partir dos dados obtidos por espalhamento de luz dinâmica e estática, o agregado de β CD formado antes do ponto de *cac* é constituído de aproximadamente três moléculas de β -ciclodextrina com um tamanho de aproximadamente 1,5 nm. Além disso, esses resultados sugerem que esse ponto de agregação, identificado por espalhamento de luz possa ser a segunda agregação da β CD, na qual a primeira seria antes de $1,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ a 298,15 K. Para o sistema após a *cac* (região **2**), agregados com distribuição de tamanho entre 40 – 250 nm, apresentando pontos de máximo em 60 e 120 nm, foram observados. Porém, devido à heterogeneidade desses agregados, após a *cac* não foi possível inferir sobre o número de moléculas de β CD por unidade de agregado e sobre o segundo coeficiente do virial.

Desta forma, com o objetivo de avaliar as possíveis estruturas tridimensionais para os agregados formados antes da *cac* foram realizados cálculos de dinâmica molecular em solução. Foram avaliados, através dos cálculos de dinâmica molecular, cinco arranjos possíveis para a formação do agregado molecular envolvendo três moléculas de β -ciclodextrina. Quatro dessas estruturas foram arranjadas levando em consideração a possibilidades de interações frontais entre as cavidades maior e menor da β CD, como representado na Figura 4.11. Além dessas estruturas, uma quinta foi testada considerando o trabalho publicado previamente pelo grupo do Prof. Hélio F. dos Santos, para agregados envolvendo três moléculas de α -ciclodextrina.¹⁸¹

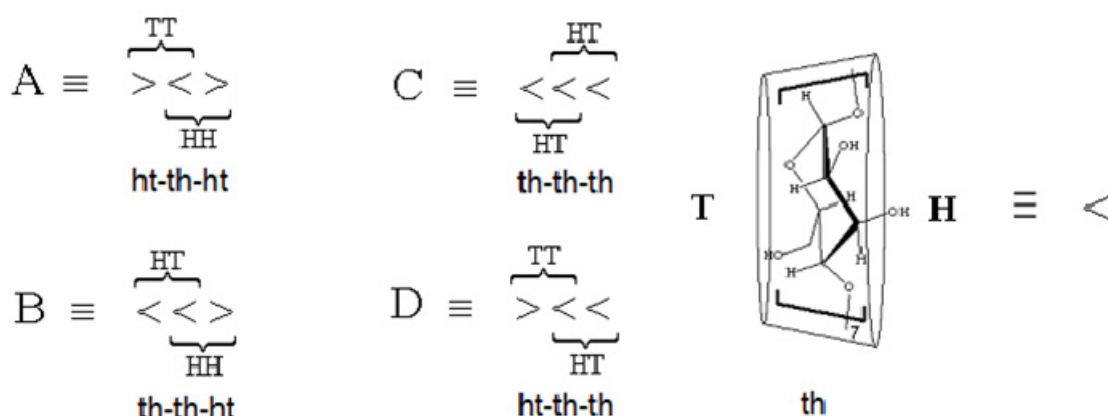


Figura 4.11: Nomenclatura das estruturas de β CD usadas nas simulações de dinâmica molecular.

Na Figura 4.12 estão apresentadas as curvas de tamanho médio do agregado ($2R_g$) em função do tempo de simulação para todos os arranjos moleculares estudados. O raio de giro (R_g) foi utilizado como parâmetro de referência, o qual descreve a "mass-weighted distance" do átomo "i" ao centro de massa do agregado associado, segundo a Equação 4.6:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i R_i^2}{\sum_i m_i}} \quad \therefore R_i = |r_i - r_{cm}| \quad 4.6$$

As geometrias após o tempo $t = 0$ ps, Figure 4.12, foram praticamente lineares com um $2R_g$ variando de 1,60 a 1,86 nm, valores estes um pouco maiores do que aqueles determinados experimentalmente. Pode ser observado através da análise dos resultados apresentados na Figura 4.12 que o tamanho das estruturas A, B e C não sofrem uma variação significativa ao final da simulação ($t = 5000$ ps), na qual a estrutura A e C apresentaram um tamanho de 1,6 nm e a estrutura B um de aproximadamente 2,0 nm. Por outro lado, o arranjo supramolecular D se tornou maior (3,2

nm) ao final da simulação. O resultado para a estrutura 3P (três ciclodextrinas perpendiculares) também foi incluído na Figura 4.12. Esse arranjo foi proposto com base na estrutura estável estudada previamente para a α -ciclodextrina (três moléculas perpendiculares), o qual não possuía nenhuma associação HH.¹⁸¹ Como demonstrado na Figura 4.12, o arranjo 3P foi estável durante toda a simulação, apresentando uma estrutura final de 1,53 nm que se encontra em um bom acordo com o valor obtido experimentalmente por espalhamento de luz de 1,50 nm. A análise das estruturas finais obtidas por dinâmica molecular nos permite inferir sobre as associações locais HH, HT e TT na estabilização do agregado de β CD.

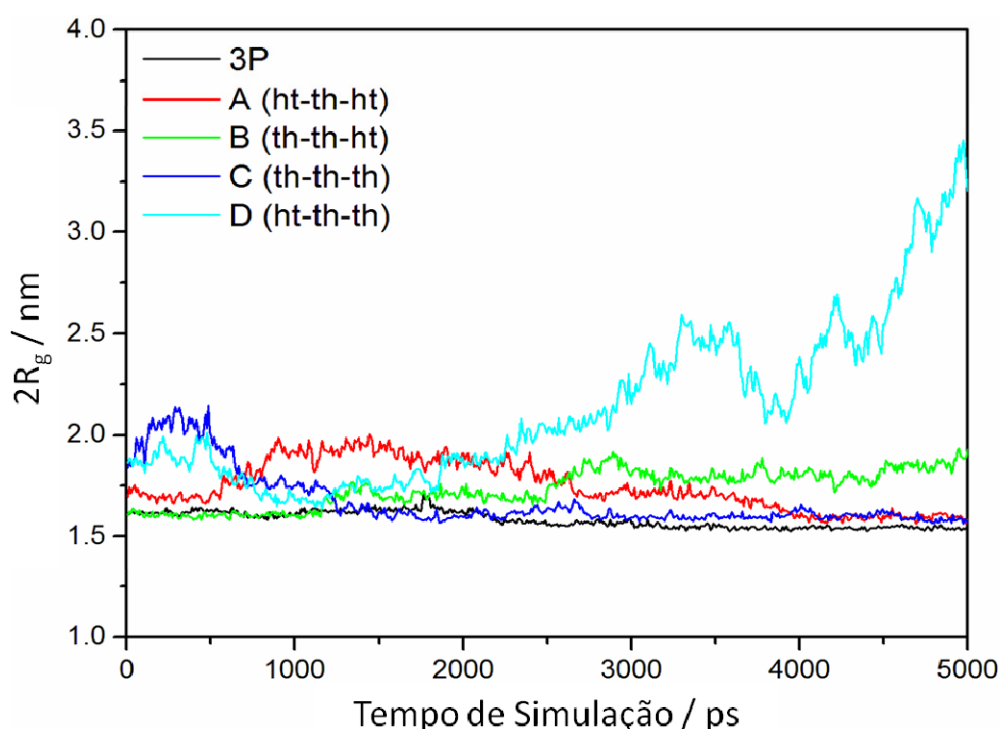


Figura 4.12: Variação do tamanho do agregado em função do tempo de simulação em solução aquosa a 298,15 K.

As estruturas encontradas ao final da simulação para os arranjos iniciais A (ht-th-ht) e B (th-th-ht) são apresentadas nas Figuras 4.13a e 4.13b. Essas duas estruturas possuem associações HH que são mantidas quase inalteradas durante todo o tempo da simulação. A diferença entre essas duas estruturas está na segunda associação, na qual o arranjo A apresenta a interação TT e a estrutura B HT. Para a estrutura B, essa segunda associação assume um arranjo perpendicular àquele dímero formado pela associação HH, aumentando assim o tamanho do agregado formado pela interação entre as três moléculas de β -ciclodextrina. Esse fenômeno não é observado para a estrutura A, a qual mantém seu arranjo ht-th-ht até o fim da simulação, comportamento este que

não foi observado para o arranjo formado pela associação das três moléculas de α CD estudadas anteriormente. Esse resultado confirma que o número de unidades glicosídicas é importante na estabilização dos dímeros lineares de ciclodextrina em solução aquosa.¹⁷⁵

Nas Figuras 4.13c e 4.13d são apresentadas as estruturas finais para os arranjos C e para o arranjo 3P, os quais apresentam uma estrutura espacial similar com três associações perpendiculares. Para esses dois agregados moleculares os valores de $2R_g$ são 1,57 e 1,53, respectivamente. Embora, a energia de agregação não tenha sido calculada no presente trabalho, devido à dificuldade de avaliar a exatidão da metodologia seria capaz de representar as energias em solução, no trabalho prévio envolvendo a associação da α CD, o arranjo 3P foi pelo menos 10 kcal.mol⁻¹ mais estável que os outros arranjos possíveis em solução.

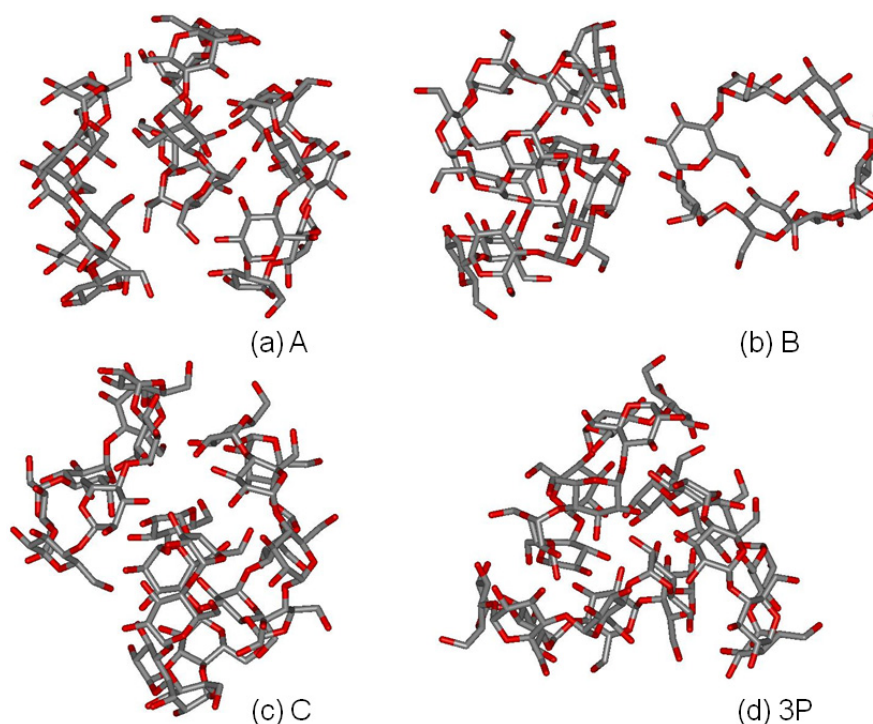


Figura 4.13: Estruturas obtidas por dinâmica molecular para os agregados de β CD após tempo de 5000 ps.

Desta forma, duas conclusões principais podem ser obtidas com os resultados experimentais somados àqueles obtidos teoricamente: (i) dentre várias possibilidades, quatro estruturas supramoleculares formadas pela interação de três moléculas de β CD foram propostas com tamanhos estimados entre 1,93 a 1,53 nm e (ii) a estruturas espacial 3P, não linear, pode representar a média dos arranjos supramoleculares a baixas concentrações de β CD em solução aquosa, o qual seu tamanho (1,53 nm) está em bom acordo com aquele obtido experimentalmente.

4.1.2. Medidas Espectroscópicas e Termodinâmicas para o Sistema β -CD:Ampicilina

Com o intuito de estudar o comportamento dos agregados de β -ciclodextrina, antes e após a *cac*, em presença de uma molécula hóspede foi utilizada espectroscopia de absorção na região do infravermelho e para isso a Ampicilina foi utilizada como modelo. Outros sistemas envolvendo a β -ciclodextrina com diferentes fármacos têm sido estudados.^{51-53,55,85,153} Nesses trabalhos, diferentes técnicas físico-químicas têm demonstrado que a β -ciclodextrina é capaz de formar agregados organizados com as moléculas hóspede, os quais podem apresentar diferentes arranjos supramoleculares em equilíbrio com estruturas que podem chegar a razões molares de 4:1 β CD:molécula hóspede.

Visando monitorar o sistema β CD:AMP dois experimentos foram realizados: (i) a titulação de β CD em solução aquosa de AMP e a titulação de água em solução aquosa de AMP. Desta forma, medidas de absorção na região do ultravioleta-visível para a molécula hóspede (Ampicilina) foram realizadas em λ 215 nm. Na Figura 4.14 são apresentados os valores de absorbância obtidos para cada ponto da curva de titulação.

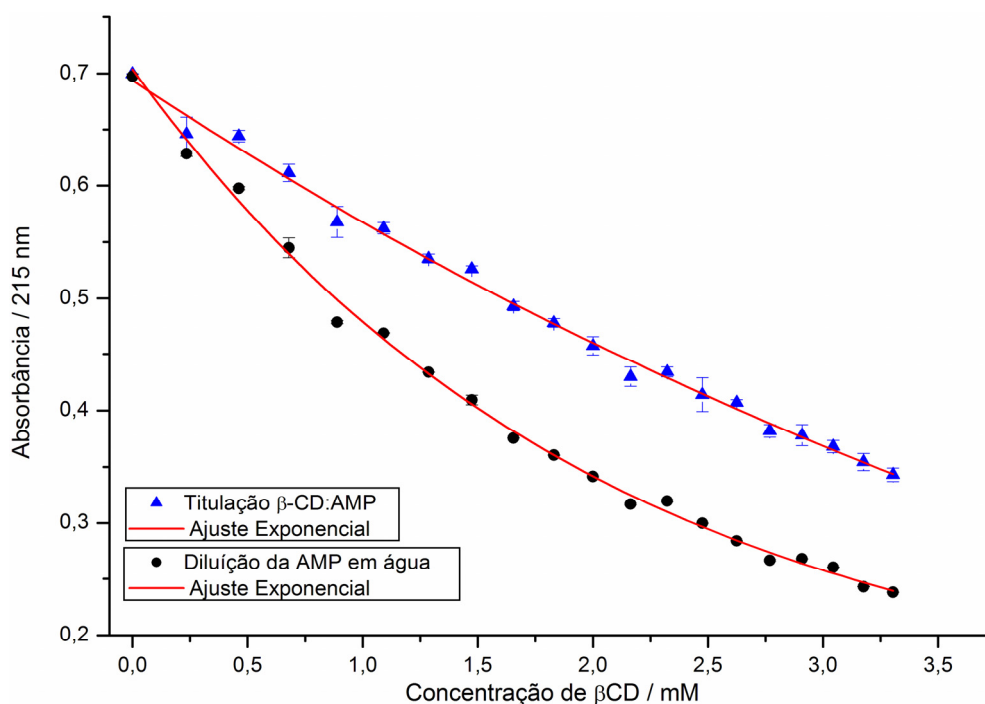


Figura 4.14: Curvas de titulação e ajuste não-linear para a β CD a 12 mmol.L^{-1} em AMP a $6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ e água em AMP a $6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$.

Comparando as curvas de titulação de β CD em AMP e da diluição de AMP com água fica evidente uma maior declividade da primeira (β CD em AMP). Esse resultado indica que a variação nos valores de absorbância para a AMP em λ 215 nm medidos para a titulação de β CD em AMP em

função do aumento da concentração de ciclodextrina é maior. Esse resultado sugere que a molécula de β -ciclodextrina está influenciando no perfil do espectro da AMP, indicando que as moléculas estão interagindo em solução. Logo para uma melhor visualização desse efeito da β CD na intensidade da absorção medida para a AMP em λ 215 nm a Figura 4.15 foi obtida.

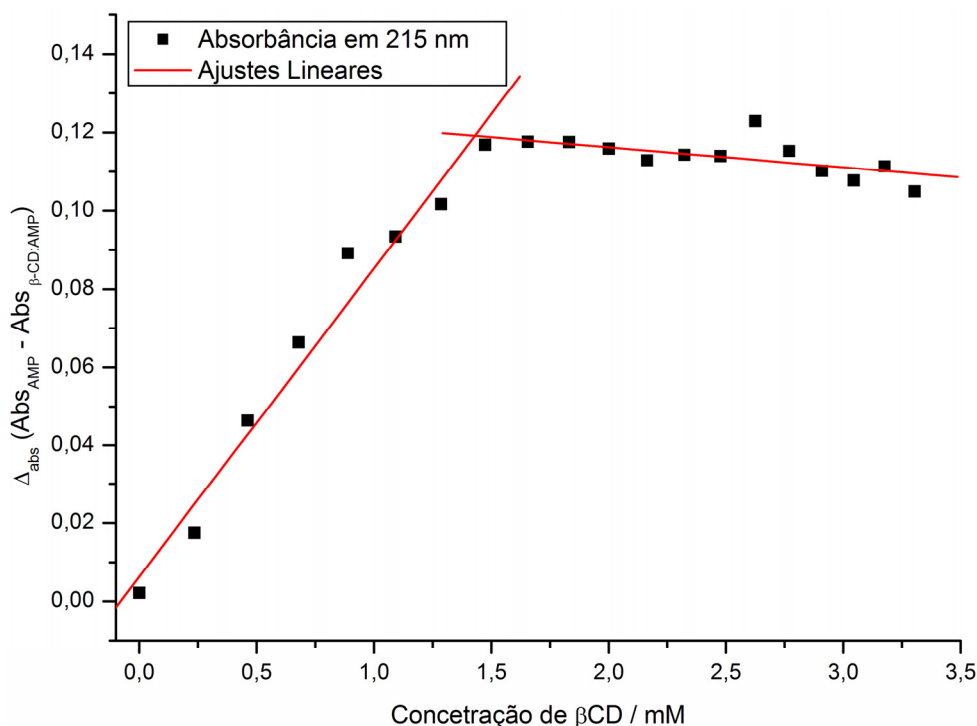


Figura 4.15: Variação da absorbância da AMP ($\Delta_{abs} = \Delta_{abs_{AMP}} - \Delta_{abs_{\beta CD:AMP}}$) a 215 nm.

A Figura 4.15 foi obtida através da subtração dos valores de absorbância obtidos para a curva de titulação de diluição da AMP em água por aqueles valores de absorbância da curva de titulação de β CD em AMP. É possível verificar na Figura 4.15 um ponto de inflexão na curva em aproximadamente $1,43 \text{ mmol.L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. Esse valor é muito próximo àquele valor de concentração de β CD obtido por espalhamento de luz dinâmica para a titulação de β CD em água. Esse resultado obtido por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível indica que o ponto de agregação da β -ciclodextrina pode ser monitorado através de uma propriedade físico-química, neste caso variação da absorbância, da molécula hóspede.

Analisando a curva obtida na pela subtração das titulações, Figura 4.15, esse ponto de inflexão sugere a existência de dois sistemas supramoleculares distintos presentes em solução aquosa. Um comportamento similar foi observado para outro sistema supramolecular formado pela β CD, no qual medidas de absorbância e fluorescência foram medidas, onde foi observada uma inflexão quando a concentração de 11 mmol.L^{-1} de β CD é atingida.⁴⁷ Desta forma, para melhor

propor um arranjo para o sistema supramolecular formado, foram realizados experimentos de ressonância magnética nuclear e experimentos de calorimetria de titulação isotérmica para que os parâmetros termodinâmicos para o processo de interação entre as moléculas de β CD e AMP fossem obtidos.

Primeiramente, foram realizados experimentos de RMN para identificar o deslocamento químico dos hidrogênios presentes na molécula de Ampicilina. Analisando o espectro da AMP, utilizando D_2O como solvente, é verificado que o valor de deslocamento químico para os sinais de hidrogênio da AMP estão de acordo com resultados já descritos na literatura, Figura 4.16a.⁵⁷ A atribuição dos sinais para a molécula de Ampicilina está apresentada na Tabela 4.2.

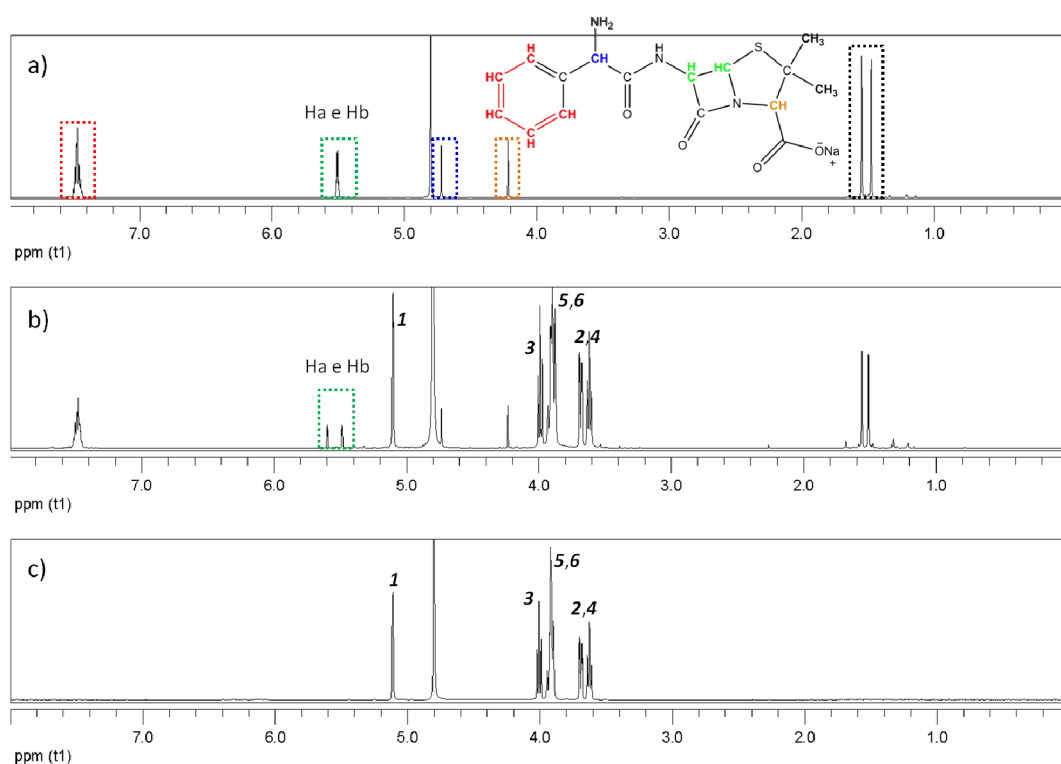
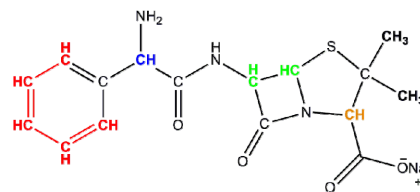


Figura 4.16: Espectros de RMN de 1H a 600 MHz e a 30 °C em D_2O para: a) AMP, b) complexo de inclusão β CD:AMP na razão molar de 1:1 e c) β CD pura.

Tabela 4.2: Deslocamento químico para os sinais de hidrogênio para a Ampicilina em D_2O a $30\text{ }^\circ\text{C}$.

Hidrogênio	δ AMP livre	δ AMP Cl	$\Delta\delta$ (Cl - AMP)
Ha/Hb	5,50	5,60 e 5,49	0,10 e 0,01
Hc	4,72	4,74	0,02
Hd	7,47	7,48	0,01
He	1,55 e 1,47	1,56 e 1,51	0,01 e 0,04
Hf	4,21	4,24	0,03



O espectro de hidrogênio para o complexo de inclusão é apresentado na Figura 4.16b. Comparando os valores de deslocamento químico dos sinais de hidrogênio das moléculas de AMP e β CD (livres) com os respectivos sinais após a formação do complexo de inclusão não foram observadas variações significativas para maioria dos sinais. Porém, para os hidrogênios **Ha** e **Hb** foi verificada uma separação desses sinais que se apresentavam sobrepostos no espectro de hidrogênio para a molécula livre. Esse resultado sugere a interação entre as moléculas hóspede e hospedeira e essa variação no deslocamento químico do hidrogênio está relacionada com a variação na densidade eletrônica após a inclusão da molécula, ou parte desta, na cavidade da ciclodextrina.^{150,154}

A inclusão da molécula de Ampicilina na cavidade da β -ciclodextrina foi confirmada através dos experimentos bidimensionais $^1\text{H}/^1\text{H}$ ROESY no qual é possível verificar correlações dipolares a curta distância (menor do que 5 \AA) entre as moléculas presentes no sistema, Figura 4.17. Experimentos bidimensionais envolvendo correlações dipolares têm sido amplamente utilizados para obter informações sobre a estrutura tridimensional de sistemas envolvendo ciclodextrinas.^{21,51,52,82,150,182}

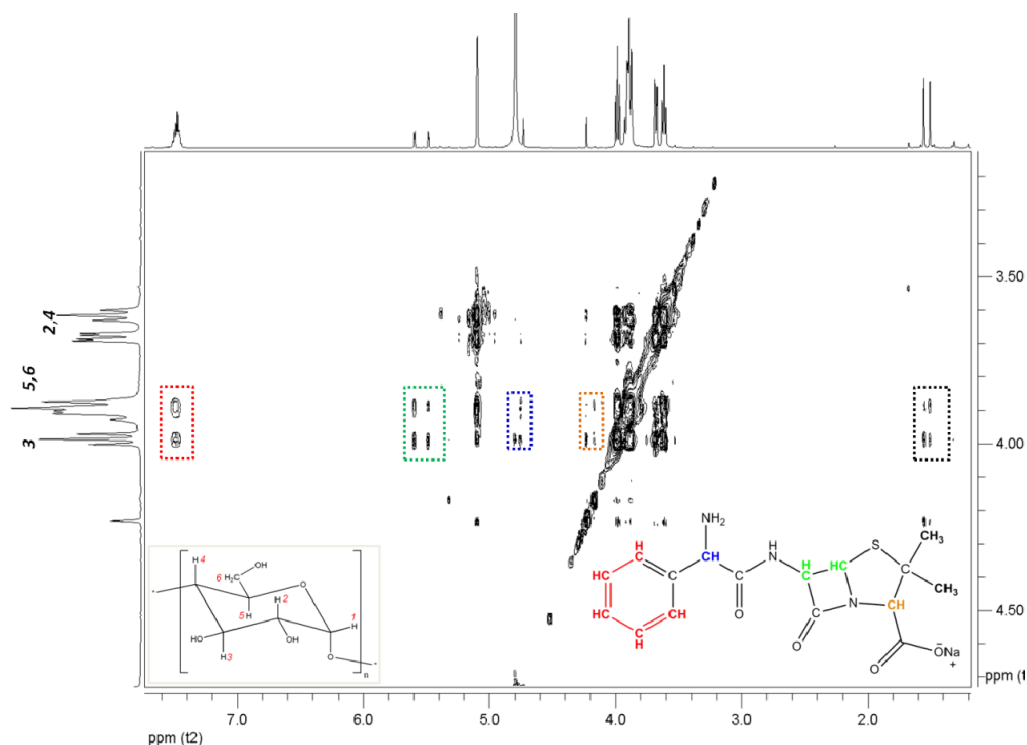


Figura 4.17: Mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ ROESY para o sistema supramolecular $\beta\text{CD}:\text{AMP}$ a 400 MHz e a 30°C em D_2O .

Pode ser verificado no espectro de 2D ROESY correlações dipolares entre todos os hidrogênios da molécula de Ampicilina e aqueles hidrogênios localizados no interior da cavidade da β -ciclodextrina (H3 e H5). Esse resultado demonstra que a molécula de AMP está totalmente inserida na cavidade da βCD . Uma vez que a molécula de AMP é maior do que a cavidade da molécula hospedeira, esse resultado sugere que diferentes complexos supramoleculares $\beta\text{CD}:\text{AMP}$ possam estar se formando em solução, como 1:1, 2:1 ou maiores, como reportado para outros sistemas.^{27,51,52,83,153,183} Mais ainda, comparando qualitativamente a intensidade das correlações observadas no mapa de contorno 2D ROESY fica evidente uma interação mais forte entre os hidrogênios internos da β -ciclodextrina com aqueles hidrogênios aromáticos da Ampicilina. Esse resultado demonstra uma inclusão preferencial dessa região da molécula hóspede na cavidade hidrofóbica da βCD , resultado que está de acordo com a literatura.¹⁵⁰

Além da análise da estrutura supramolecular formada, investigada por ressonância magnética nuclear, experimentos de calorimetria isotérmica de titulação foram realizados para avaliar os parâmetros termodinâmicos de interação do sistema e dentre esses parâmetros foi analisada a estequiometria do sistema. As curvas de titulação calorimetria para a diluição da Ampicilina em água e sua titulação em solução aquosa de β -ciclodextrina estão apresentadas na Figura 4.18a.

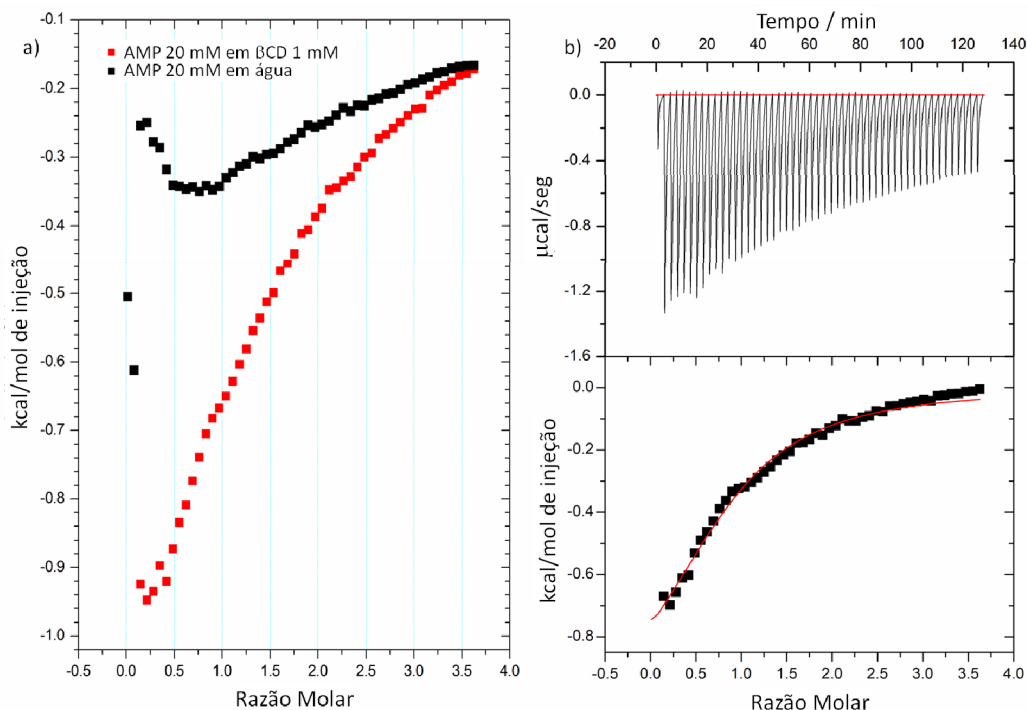


Figura 4.18: Curvas de titulação calorimétrica para: a) (■) AMP 20,0 mmol.L⁻¹ em água e (■) AMP 20,0 mmol.L⁻¹ em solução aquosa de β CD a 1,0 mmol.L⁻¹ e b) (---) dado original, (■) curva após subtração da diluição de AMP com água e (---) regressão não-linear para o ajuste dos dados (isoterma de Wiseman).

Analisando o ajuste para a curva final para a titulação de AMP em solução de β CD (após a subtração da curva de diluição da AMP em água, Figura 4.18b, foi observado um valor de n (coeficiente estequiométrico) equivalente a $n = 0,83 \pm 0,05$. Esse resultado demonstra a existência de estruturas com diferentes estequiometrias em solução, o que também foi verificado por ressonância magnética nuclear, uma vez que foram observadas correlações dipolares com toda a molécula da AMP e a cavidade da β CD nos experimentos de 2D ROESY.

Além disso, a titulação demonstrou que o processo de inclusão da AMP na cavidade da β CD é espontâneo com um valor de variação de energia livre de Gibbs padrão $\Delta G^{\circ} = -19,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Os valores obtidos para a variação de entalpia padrão foi de $\Delta H^{\circ} = -4,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e uma variação de entropia padrão de $T\Delta S^{\circ} = 14,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Esses valores demonstram que o processo de interação entre as moléculas é favorecido tanto por entalpia quanto por entropia. Os resultados obtidos por calorimetria de titulação isotérmica e àqueles verificados por ressonância magnética nuclear indicam a existência de um equilíbrio entre diferentes sistemas supramoleculares em solução aquosa. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com resultados previamente publicados.⁵⁶ Vale ressaltar que esse trabalho da literatura só considerou a formação de complexos de inclusão na

razão molar 1:1 β CD:AMP, com diferentes formas de inclusão da AMP na cavidade da β -ciclodextrina. Em um segundo trabalho, a inclusão da molécula de AMP com a hidroxipropil- β CD foi investigada demonstrando que estrutura do tipo 2:1 HP β CD:AMP também pode ser estável, assim como diferentes arranjos do tipo 1:1.¹⁸⁴

Com o intuito de avaliar as possíveis estruturas supramoleculares formadas em solução, cálculos de dinâmica molecular foram estudados assumindo primeiramente a estequiometria de 1:1. Esses resultados propuseram duas estruturas estáveis (estruturas **A1** e **A2**), com a Ampicilina incluída na cavidade da β CD através do anel aromático, Figuras 4.19a e 4.19b.

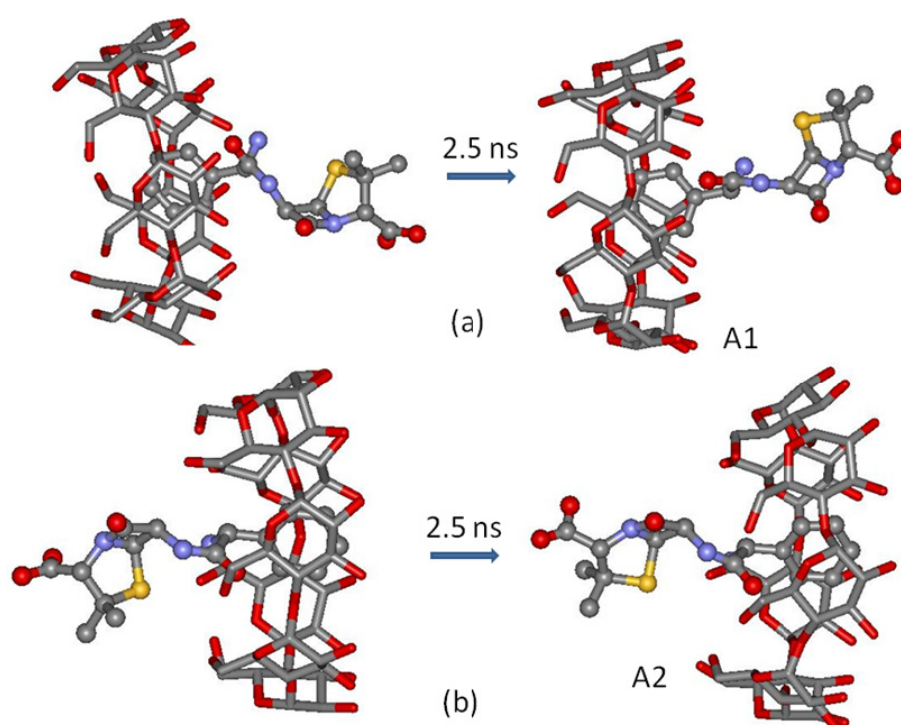


Figura 4.19: Estruturas iniciais (esquerda) e finais (direita) das trajetórias da dinâmica molecular para os arranjos moleculares na razão molar 1:1 quando a AMP é incluída pela (a) cavidade maior e (b) cavidade menor da β CD.

A diferença de energia obtida entre as estruturas **A1** e **A2** oriundas das médias de energia potencial foi de $22,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, favorecendo o arranjo estrutural **A2** o que sugere que essa forma de inclusão deve representar a maioria das espécies presentes de razão molar 1:1 em solução. Além dessa análise, para esses complexos de inclusão foram monitoradas as distâncias entre os hidrogênios H3 e H5 presentes na cavidade da β CD com átomos da molécula de AMP. Uma distância de 4 \AA para os átomos internos da β CD e os aromáticos da AMP foi verificada. Para os átomos do centro da cadeia da AMP a distância foi de 7 \AA e para os grupos metil foi de 11 \AA . Esses resultados

suportam, em parte, àqueles obtidos por experimentos 2D ROESY, no qual a intensidade das correlações foi maior para a região aromática da molécula de AMP. Várias tentativas foram feitas para identificar estruturas nas quais a parte polar da molécula de AMP estivesse incluída na cavidade da β CD, porém, esses complexos de inclusão não foram estáveis ao longo dos 2,5 ns de simulação, levando a estruturas do tipo A2 ou complexos de associação, com a AMP interagindo com os grupos (-OH) das bordas do cone. Esses dados estão de acordo com aqueles previamente publicados,⁵⁶ onde os autores verificaram que a molécula de AMP deixava a cavidade da β CD após 20 ps de simulação.

Além daquelas estruturas na razão molar 1:1, arranjos supramoleculares de β CD:AMP 2:1 e 2:2 com todas as possíveis associações locais (HH, TT e TH) para os dímeros de β CD foram propostas. De todas as possibilidades somente aquelas com associações frontais do tipo HH foram estáveis após os 2,5 ns da simulação. As estruturas iniciais e finais obtidas para a simulação de dinâmica molecular para os arranjos β CD:AMP 2:1 (**A3**) e β CD:AMP 2:2 (**A4**) β CD:AMP estão apresentados na Figura 4.20a e 4.20b, respectivamente.

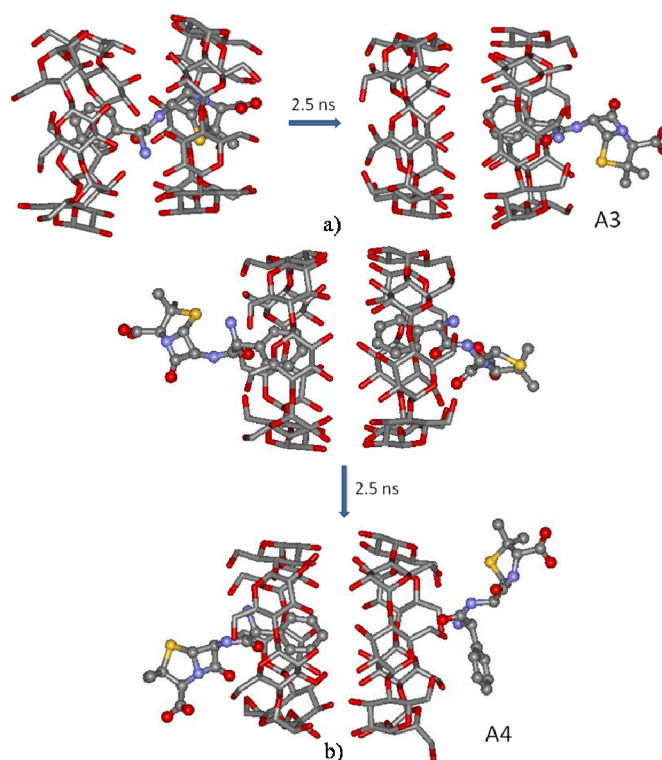


Figura 4.20: Estruturas iniciais e finais das trajetórias da dinâmica molecular para os arranjos moleculares na razão molar (a) 2:1 β CD:AMP e (b) 2:2 β CD:AMP, nos quais a AMP é incluída pela cavidade menor.

Para o sistema 2:1, o arranjo **A3**, a molécula de AMP se move ao longo do eixo da cavidade levando a formação de um complexo supramolecular similar àquele **A2**, com o anel aromático incluído dentro da cavidade da β CD pelo lado menor. A saída da outra região da molécula de AMP da

cavidade da β CD pode ser explicada pela similaridade de carga, uma vez que ocorrerá uma repulsão entre os grupos C=O da AMP com os grupos C-O-C do interior da cavidade. Nessa estrutura, as distâncias entre os hidrogênios internos da β CD e aqueles presentes na AMP foram as mesmas observadas para o complexo **A2**. Para o complexo 2:2 um resultado interessante foi observado, das duas moléculas de AMP incluídas nas cavidades da β CD, somente uma permaneceu desta forma após 2,5 ns. A segunda molécula de AMP saiu da cavidade assumindo uma orientação paralela a cavidade menor da β CD, sendo estabilizada por duas ligações de hidrogênio. Esse complexo **A4** é muito estável e também deve contribuir para as formas de inclusão em equilíbrio.

4.1.3. Microscopia de Força Atômica para o Sistema β -CD:Ampicilina

Os processos de auto-agregação e auto-organização da β -ciclodextrina e seu complexo supramolecular com Ampicilina foram investigados no estado sólido por microscopia de força atômica. Para isso, duas concentrações de β -ciclodextrina e do seu complexo foram testadas, uma antes do ponto de agregação crítica ($0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$) e outro após a *cac* ($2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). Para o complexo de inclusão β CD:AMP, a concentração de AMP utilizada foi a mesma utilizada nos experimentos de ultravioleta-visível ($6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$). A imagem de AFM para a β CD a $0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ é apresentada na Figura 4.21a e a análise de sua seção está apresentada na Figura 4.21b.

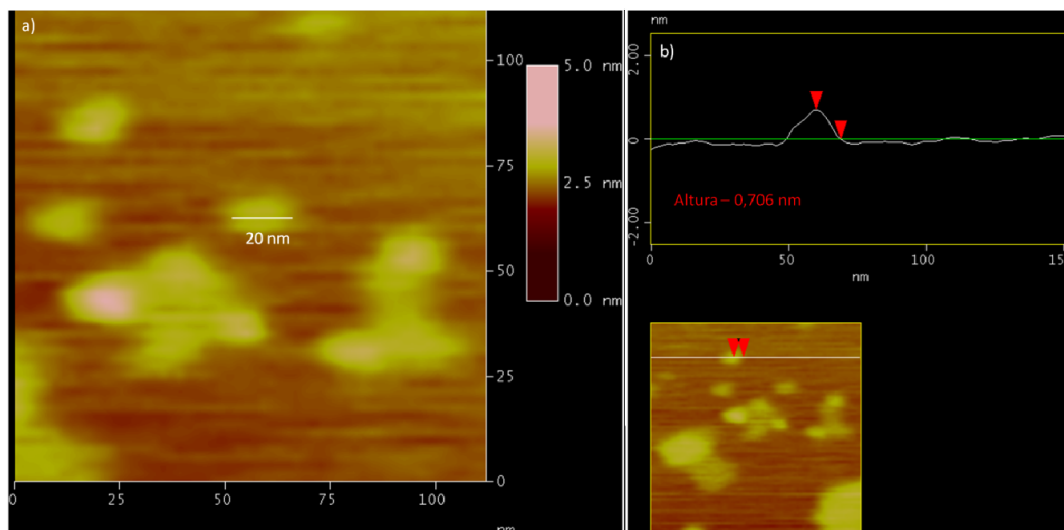


Figura 4.21: a) imagem de AFM para a β CD a $0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ b) análise da altura da nanopartícula.

Analisando a imagem apresentada na Figura 4.21a é possível identificar nanoestruturas com tamanho de aproximadamente 20 nm que apresentam forma esférica. Estruturas esféricas já foram reportadas para agregados de β -ciclodextrina em concentrações de 6 mmol.L^{-1} , estudadas por

microscopia eletrônica de transmissão.³⁹ Além disso, através da análise da imagem apresentada na Figura 4.21b foi possível verificar que esses agregados possuem uma altura de aproximadamente 0,7 nm. Os resultados obtidos por AFM sugerem a agregação da β -ciclodextrina mesmo no estado sólido, entretanto, é difícil afirmar que as nanopartículas observadas pela AFM sejam semelhantes às aquelas verificadas pela técnica de espalhamento de luz em solução, antes do ponto de *cac* da β CD.

Para o sistema β CD:AMP nas concentrações de 0,9 e $6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$, respectivamente, foram observadas estruturas semelhantes a aquelas verificadas sem adição de Ampicilina ao sistema, Figuras 4,22a e 4.22b.

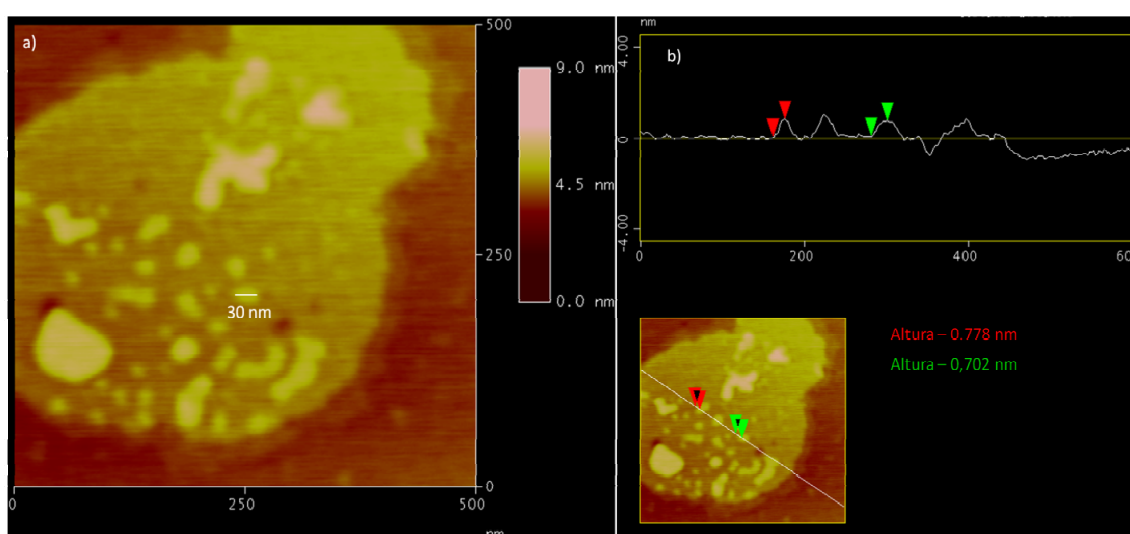


Figura 4.22: a) imagem de AFM para o sistema β CD:AMP a $0,9; 6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ b) análise da altura da nanopartícula.

Para esse sistema supramolecular, na qual a concentração da β CD é inferior a *cac*, são verificadas nanoestruturas globulares com tamanhos entre 20 – 30 nm. Mais uma vez, analisando as imagens foi possível verificar que esses agregados moleculares apresentavam uma altura equivalente àquela observada para os agregados formados pela interação da β CD somente, 0,702 – 0,778 nm. Comparando o resultado obtido para o sistema β CD:AMP com aquele no qual há somente β CD (antes da *cac*) é possível verificar que a adição da molécula hóspede não influenciou de forma significativa o processo de agregação da β CD e tão pouco introduziu mudanças no arranjo estrutural globular observado no estado sólido para ambos os casos.

A análise da imagem de microscopia de força atômica para a β -ciclodextrina após a *cac* a uma concentração de $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ apresentou um tipo de estrutura espacial indefinida e somente a formação de um filme foi verificado no estado sólido, Figura 4.23.

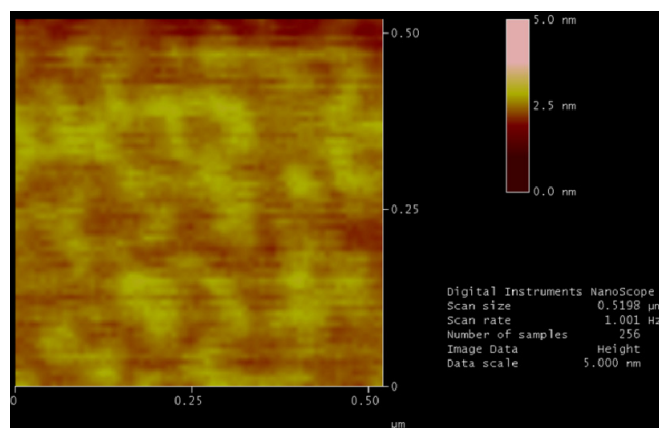


Figura 4.23: Imagem de AFM para a β CD a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Porém, a essa mesma concentração de β -ciclodextrina ($2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) quando adicionada a molécula de Ampicilina ($6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$) foi possível verificar a formação de estruturas tubulares, Figuras 4,24a e 4.24b.

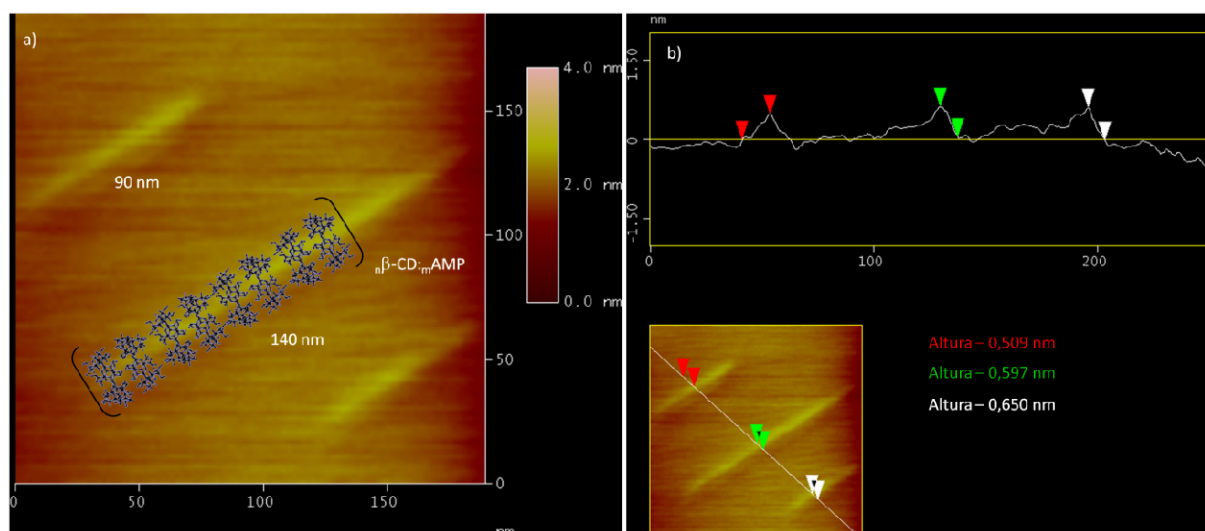


Figura 4.24: a) imagem de AFM para o sistema β CD:AMP a $2,0:6,7 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ b) análise da altura da nanopartícula.

O comprimento e a altura das estruturas formadas pela β CD e a AMP após a *cac* são de aproximadamente 100 a 150 nm e de aproximadamente 0,7 nm, respectivamente. Esse resultado indica que no estado sólido a formação de estruturas tubulares é favorecida com o aumento da concentração de β CD. Com base nos resultados de AFM para os agregados de β CD antes e após a *cac* em presença de molécula hóspede indicam que o arranjo supramolecular formado no estado sólido é dependente da concentração de β CD. Estruturas tubulares semelhantes a estas já foram descritas na literatura para outros sistemas, como os poli-rotaxanos e pseudopoli-rotaxanos.^{75,77,185-}

¹⁸⁷ Esses poli-rotaxanos e pseudopoli-rotaxanos são estruturas nas quais a ligação de hidrogênio favorecem sua estabilidade.^{77,188,189} Uma estrutura similar envolvendo ciclodextrina e uma molécula hóspede foi observada por Sowmiya e colaboradores para concentração de ciclodextrina equivalente a 9,0 mmol.L⁻¹.⁴⁷

A importância de se avaliar as estruturas formadas pela associação de moléculas de β CD em presença e ausência de AMP pode estar relacionada tanto com a atividade do fármaco quanto ao seu perfil de liberação após a inclusão na cavidade da β CD. Uma vez que o tamanho e a forma de sistemas supramoleculares bem como de nanopartículas poliméricas têm sido investigados como um parâmetro primário para a interação entre células e as essas nanoestruturas.^{190,191} Mais ainda tem sido reportado que estruturas tubulares tendem a permanecer na circulação por um tempo superior do aquelas estruturas globulares, enfatizando o efeito da forma da partícula influencia sua atividade e essa dependência está relacionada com fagocitose do material.¹⁹¹⁻¹⁹³

Como o objetivo de tentar entender a estrutura tridimensional na forma tubular e as forças que contribuem para a estabilização dos sistemas formados, cálculos de dinâmica molecular para o arranjo formado por quatro moléculas de β -ciclodextrina e quatro de Ampicilina foram realizados. Essas estruturas, contendo oito moléculas, foram utilizadas como um modelo que poderia representar o menor monômero formador de estruturas tubulares, sistema esse que foi construído a partir da estrutura 2:2 β CD:AMP. Para fim de comparação também foi realizado o cálculo de dinâmica para o arranjo formado por quatro moléculas de β CD na ausência das moléculas de AMP.

Os resultados para esses dois sistemas foram plotados na Figura 4.25a, na qual a energia potencial normalizada de cada sistema foi plotada em função do tempo de simulação na temperatura de 298,15 K. Para os dois sistemas pode ser observado que as estruturas são quase lineares no início da simulação, entretanto, após 10 % da trajetória de simulação o agregado formado pelas quatro β -ciclodextrinas tende a se dissociar. Porém, quando o sistema 4:4 β CD:AMP é utilizado esse se mantém estável durante todo o período da simulação. A estrutura inicial e final para o arranjo 4:4 β CD:AMP é apresentado na Figura 4.25b. Da mesma forma como observado para os sistemas menores, apenas uma molécula de AMP permanece incluída na cavidade da β CD para cada dímero. Mas de forma determinante para a estabilidade do arranjo linear, essa estrutura é estabilizada pela interação entre as moléculas de AMP que estão fora da cavidade da β -ciclodextrina pela associação TT. A formação de dímeros de AMP tem sido demonstrada pela interação entre o grupo amino de uma molécula com a carbonila da molécula seguinte.^{56,194} Esse tipo de estrutura pode explicar o tipo de interação entre as moléculas de AMP que estabilizam as estruturas em forma de tubo observadas no presente trabalho.

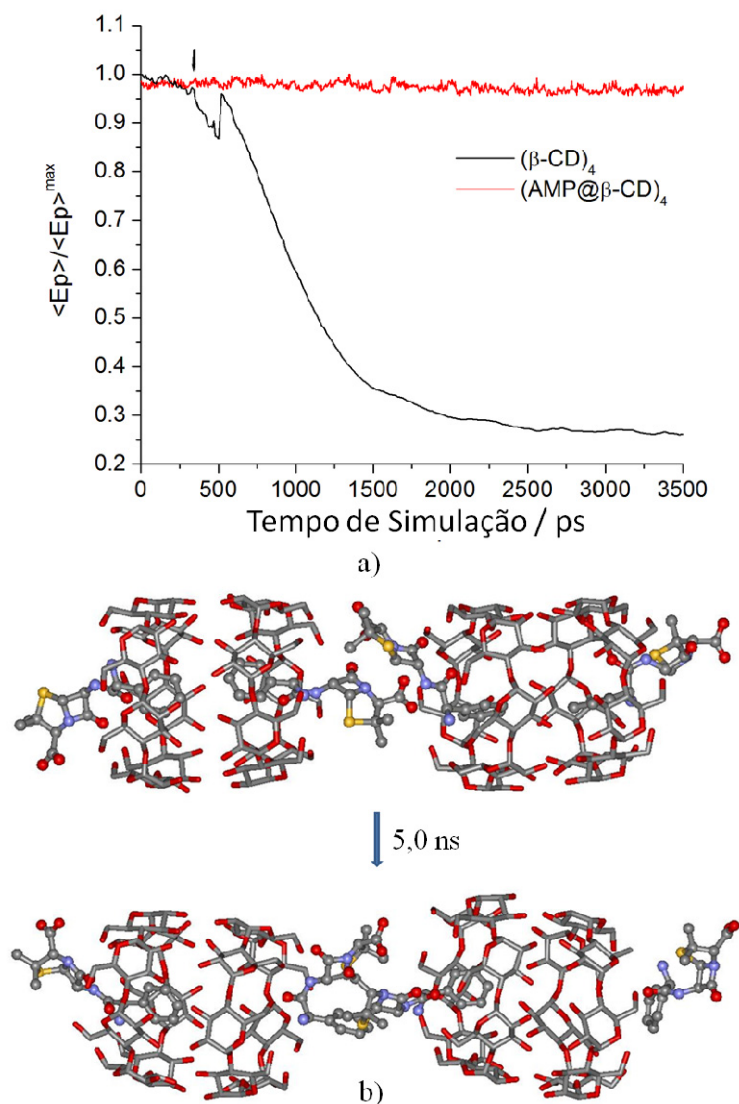


Figura 4.25: a) energia potencial normalizada em função do tempo de simulação e b) estruturas iniciais e finais para o complexo supramolecular 4:4 β CD:AMP.

Em geral, os arranjos supramoleculares formados pela auto-agregação de moléculas hóspede e hospedeira, como esse observado para a β CD e a AMP, podem afetar as propriedades do complexo em pelo menos duas formas diferentes. Primeiramente, moléculas hóspedes com baixa constante de afinidade com as ciclodextrinas podem não ter energia suficiente para quebrar os agregados moleculares formados pelas ciclodextrinas e então não formam complexos de inclusão, sugerindo uma dependência da concentração de molécula hospedeira ideal para a formação do complexo de inclusão. Por outro lado, uma vez que um arranjo supramolecular é formado por diversas moléculas de β CD e moléculas hóspede, uma energia adicional seria necessária para quebrar esses agregados moleculares e esse efeito poderia ser uma razão adicional para o perfil modificado de liberação do fármaco. Uma vez que, não somente o conjugado ciclodextrina-fármaco

precisa ser rompido, mas um grande número de interações intra- e intermoleculares precisariam ser quebradas. Desta forma, arranjos supramoleculares com grande número de partículas formadoras de agregado poderiam agir como dispositivos nanoparticulados para sistemas de liberação de fármacos, dependentes do meio e da concentração de ciclodextrina.

Capítulo 5

Sistemas Poliméricos a Base de β -ciclodextrina Modificada

5. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a síntese e caracterização da ciclodextrina modificada com a molécula fotocromica (espiropirano), bem como o estudo das propriedades fotocromicas quando a ciclodextrina modificada é incorporada em sistema polimérico (ácido polimetacrílico – PMAA). Foram utilizadas técnicas de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho por reflectância atenuada (FTIR-ATR) e de absorção na região do ultravioleta-visível, espectrometria de massa no modo (MALDI-TOF) para a caracterização dos materiais de partida, da β -ciclodextrina modificada e para os polímeros modificados. Para as nanofibras obtidas por eletrofiação, foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica de varredura e ângulo de contato da água, além da técnica de FTIR-ATR. As propriedades fotocromicas da β -ciclodextrina e dos polímeros modificados em solução (isomerização e cinética) e para a nanofibra obtida por eletrofiação também foram investigadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível. Para comparar os resultados de ângulo de contato da água obtidos para as nanofibras, foram preparados filmes utilizando o polímero modificado com a β -ciclodextrina fotocromica por recobrimento por rotação.⁶⁷

5.1. Síntese da β -ciclodextrina com Espiropirano e dos Polímeros: $PMAA\beta CD_{SP}$ e $PMAA_{SP}$

5.1.1. Ressonância Magnética Nuclear

A estratégia de síntese da β -ciclodextrina modificada com a molécula fotocromica espiropirano (SP) usando a substituição das hidroxilas primarias da β -ciclodextrina⁵⁹ foi eficiente com um rendimento de aproximadamente 25 %, Figura 5.1. O produto da reação foi caracterizado por ressonância magnética nuclear, utilizando experimentos de 1H . Foram identificados os sinais de hidrogênio para a molécula de SP para auxiliar na caracterização da βCD modificada.

Tabela 5.1: Deslocamento químico para os hidrogênios da molécula de Espiropirano, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} .

Hidrogênio	δ (ppm)	Hidrogênio	(ppm)
1	6,80	16	8,01
2	7,12	18	8,22
3	6,67	19	3,38 – 3,49
6	7,12	20	2,47 – 2,55
13	7,22	22	12,25
14	6,01	24	1,07
15	6,87	25	1,18

Além do experimento de hidrogênio, experimentos bidimensionais ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) foram realizados para identificar a correlação escalares entre os hidrogênios, para confirmar a estrutura da molécula obtida, Figuras 5.3 e 5.4. Esse experimento permitiu atribuir de forma inequívoca os sinais de hidrogênio da molécula de SP, principalmente àqueles referentes à região aromática de δ 5,5 a 8,5.

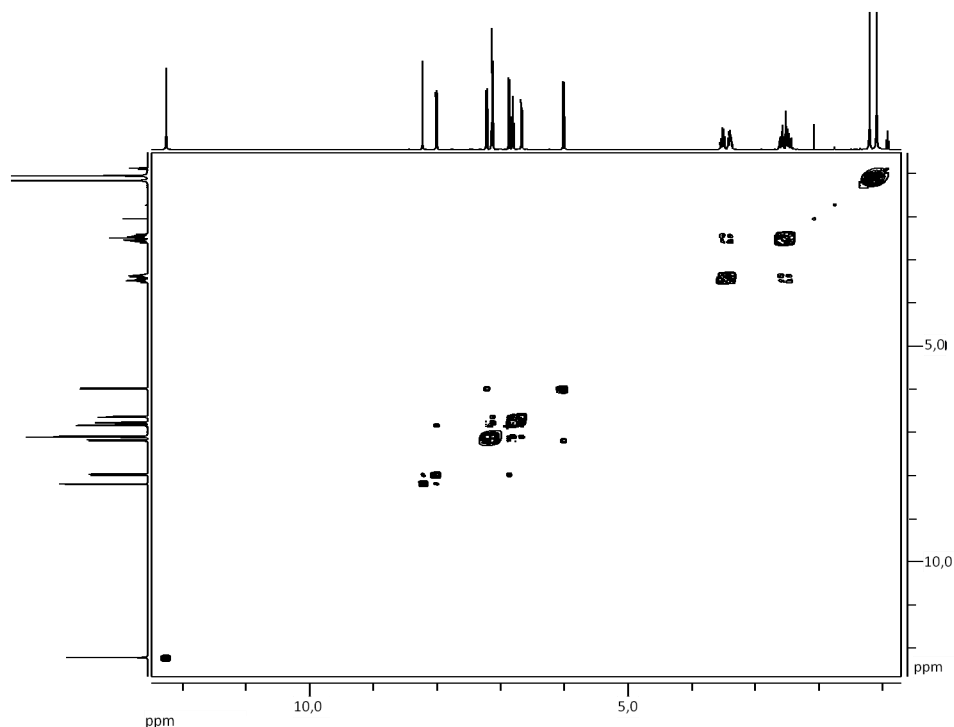


Figura 5.3: Mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY para a SP, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} .

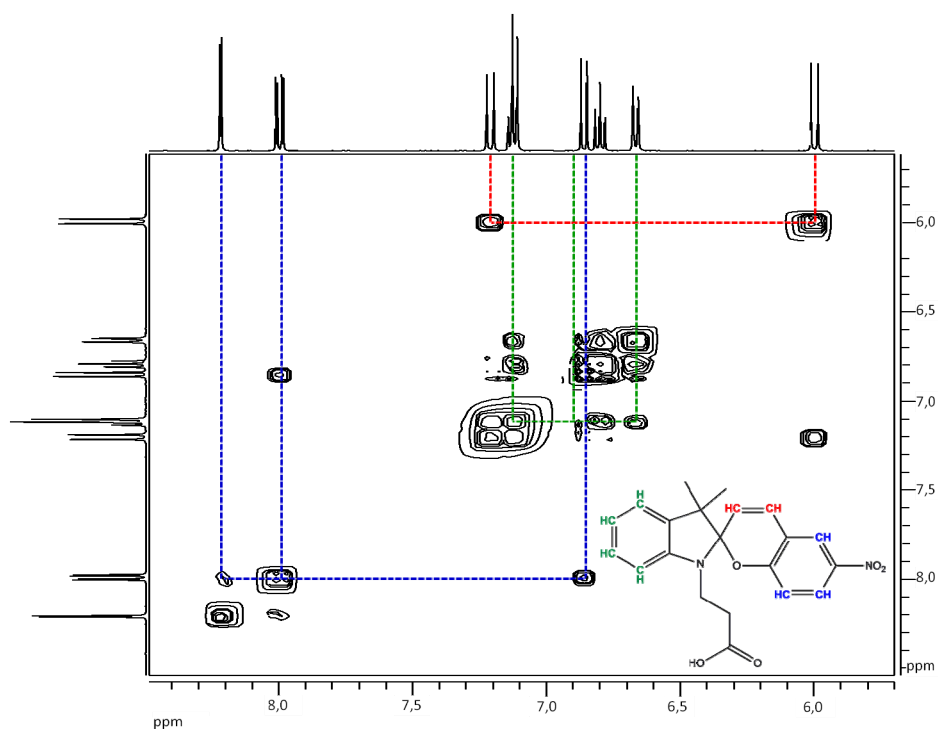


Figura 5.4: Expansão do mapa de contorno $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY para a SP, a 400 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d_6} .

Dentre os sinais de hidrogênio para a molécula de SP é importante destacar o valor de deslocamento químico para aquele grupo referente à hidroxila do ácido carboxílico, em δ 12,25. Isso porque esse grupo funcional será utilizado para a ligação da molécula fotocrômica com a β -ciclodextrina, através da formação de um grupo éster. Na Figura 5.5 está apresentado o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para a molécula de β -ciclodextrina modificada com a SP.

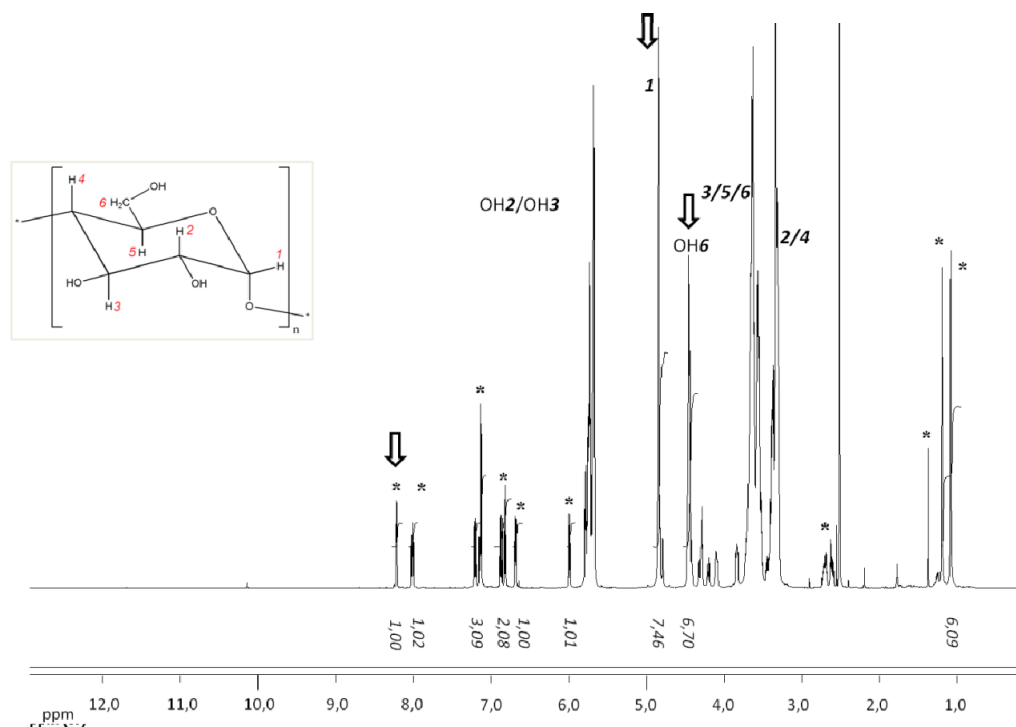


Figura 5.5: Espectro de RMN de ^1H para a $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d_6} (*sinais da molécula de SP).

Analisando o espectro de RMN de hidrogênio para a $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ podem ser observados todos os sinais referentes à molécula de βCD e ainda aqueles referentes à molécula de SP. O único sinal que não é observado no espectro de RMN de ^1H é aquele referente ao hidrogênio do ácido carboxílico da molécula fotocromica em δ 12,25, indicando a ligação covalente através desse grupo entre as moléculas de βCD e de SP. A síntese da $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ apresentou um rendimento final de aproximadamente 25 %, o que está de acordo com outros trabalhos publicados na literatura que utilizaram 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) para a síntese de diferentes ciclodextrinas modificadas.^{133,135,196} O processo de recristalização permitiu separar os isômeros da molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ mono- di- e trissubstituída obtidas por essa rota sintética,^{59,135} além das moléculas de βCD livre.

A estrutura da molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ monosubstituída sintetizada foi confirmada pela análise da relação entre as integrais dos hidrogênios da molécula de βCD e de SP. Desta forma, foram comparadas as relações das integrais para o singlete da SP em δ 8,2 e os sinais de hidrogênio para os grupos **CH1** em 4,8 e **OH6** em 4,4 da β -ciclodextrina, possibilitando determinar uma razão aproximada de 1:7:6 entre esses hidrogênios. Esse resultado indica a monosubstituição da β -ciclodextrina de forma preferencial na hidroxila primária, localizada na borda de menor diâmetro do cone, originando a estrutura que está apresentada na Figura 5.1.

Adicionalmente aos experimentos de RMN, espectro de massa, por ionização e desorção de matriz assistida a laser (MALDI-TOF), foram obtidos para confirmar o peso molecular da molécula de β CD_{SP} e assim definir o número de hidroxilas primárias substituídas da ciclodextrina com a SP. Na Figura 5.6 está apresentado o espectro de massa para a molécula de β CD_{SP}, no qual pode ser verificada a massa molecular equivalente a 1497,4 g.mol⁻¹, referente à molécula de β CD_{SP} monosubstituída. Esse resultado se encontra em bom acordo quando comparado à massa molecular teórica de 1496,5 g.mol⁻¹. Vale a pena ressaltar que não foi observado nenhum pico em aproximadamente 1877 e 2257 g.mol⁻¹ referente às moléculas de β CD_{SP} di- e trisubstituídas.

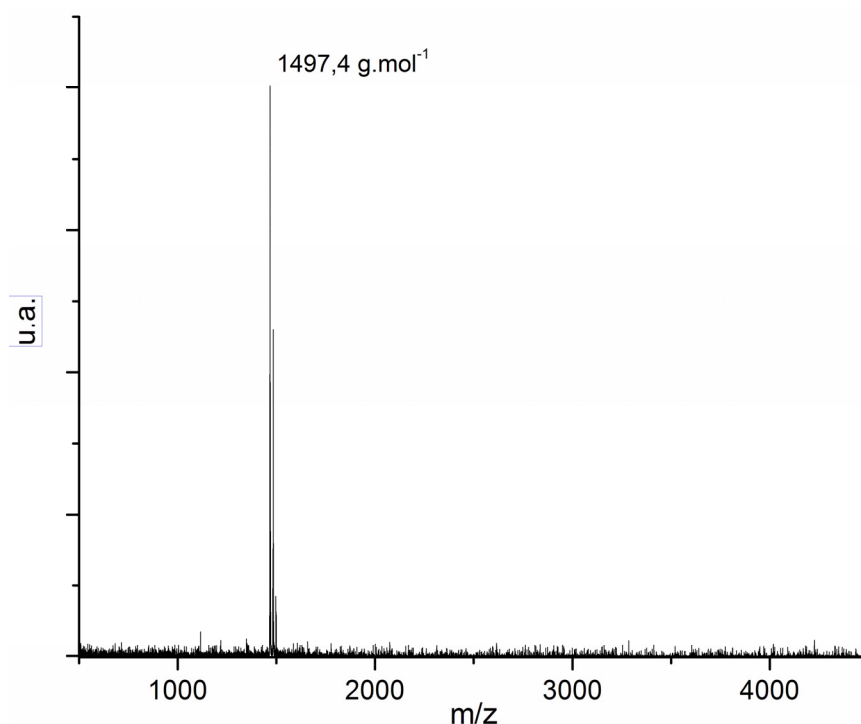


Figura 5.6: Espectro de massa (MALDI-TOF) para a molécula de β CD_{SP}.

Para a síntese da molécula de β CD_{SP} com o PMAA, Figura 5.7, foi utilizada a mesma estratégia de síntese empregada para modificar a β CD com a molécula de SP, com a reação de esterificação da cadeia lateral do polímero com a hidroxila da β CD_{SP}.

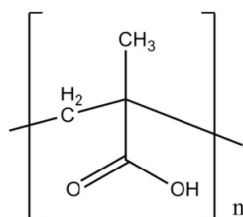


Figura 5.7: Fórmula estrutural do monômero do ácido polimetacrílico.

O espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do polímero puro, PMAA, e para aquele com a cadeia lateral modificada com a molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ estão apresentados nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente.

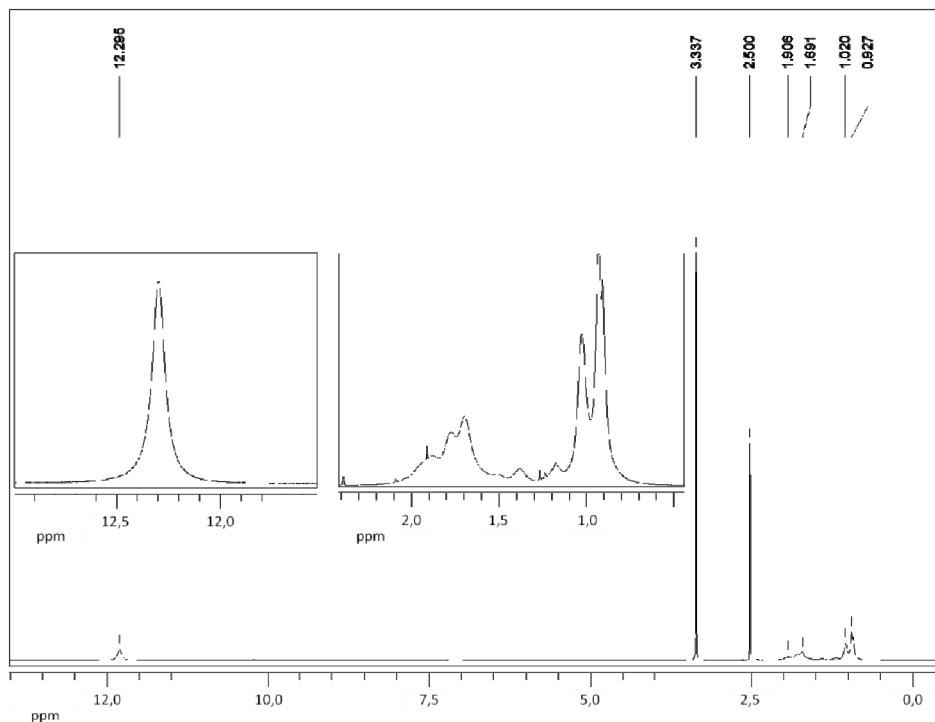


Figura 5.8: Espectro de RMN de ^1H para o polímero PMAA, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} .

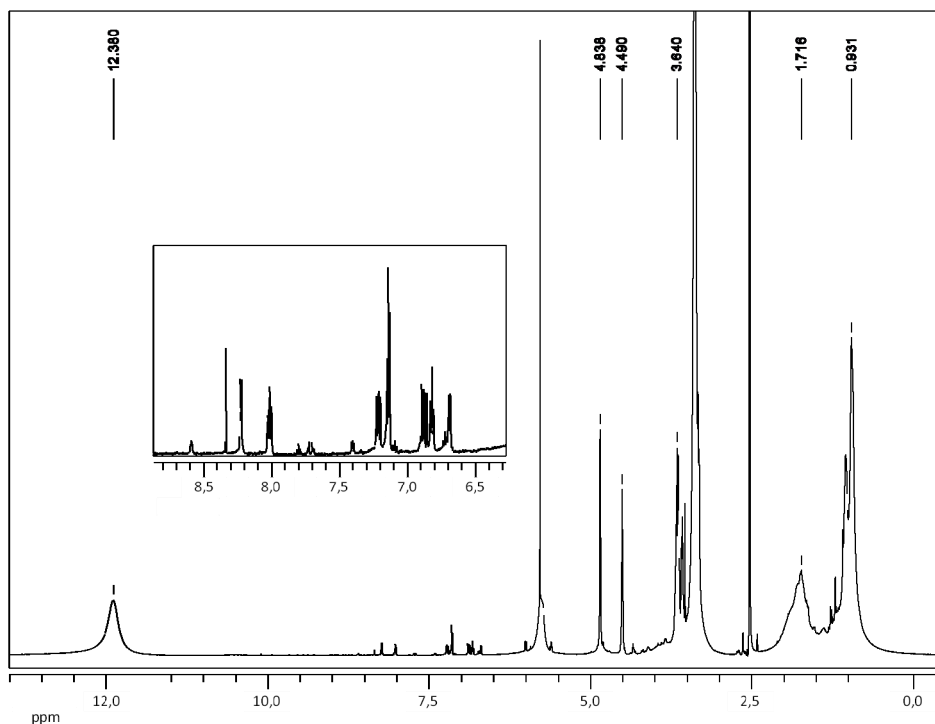


Figura 5.9: Espectro de RMN de ^1H para o polímero PMAA $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} .

Analisando o espectro de RMN de hidrogênio para o polímero PMAA verificam-se os respectivos sinais de CH_3 (δ 0,92), CH_2 (δ 1,70) e o grupo OH (δ 12,29). Esses mesmos sinais, referentes à cadeia do PMAA, também são observados no espectro de RMN para o polímero modificado, assim como os sinais de RMN referentes à molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$.

O grau de substituição da cadeia lateral do polímero com a ciclodextrina fotocromica ($\beta\text{CD}_{\text{SP}}$) foi determinado utilizando a razão entre a integral dos sinais de hidrogênio da molécula de PMAA para os grupos CH_3 (δ 0,92) e CH_2 (δ 1,70) e os hidrogênios da região aromática referentes à molécula de SP. Essa razão entre as integrais desses sinais foi equivalente a 1,3 %, sugerindo assim uma substituição máxima de 1,3 % das hidroxilas da cadeia lateral do polímero pelas moléculas de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$.

Com o intuito de obter um polímero com propriedades fotocromicas que sirva de branco para comparar com o PMAA substituído com a $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, a síntese do polímero PMAA_{SP} foi realizada. Para isso uma molécula de espiropirano com um grupo álcool na parte alifática foi sintetizada, Figura 5.1, de acordo com uma rota de síntese previamente descrita na literatura.¹³² Utilizando DCC em piridina o grupo álcool foi utilizado para formar uma ligação do tipo éster com o grupo ácido do polímero (PMAA). O espectro de ressonância magnética nuclear para o polímero PMAA_{SP} está apresentado na Figura 5.10.

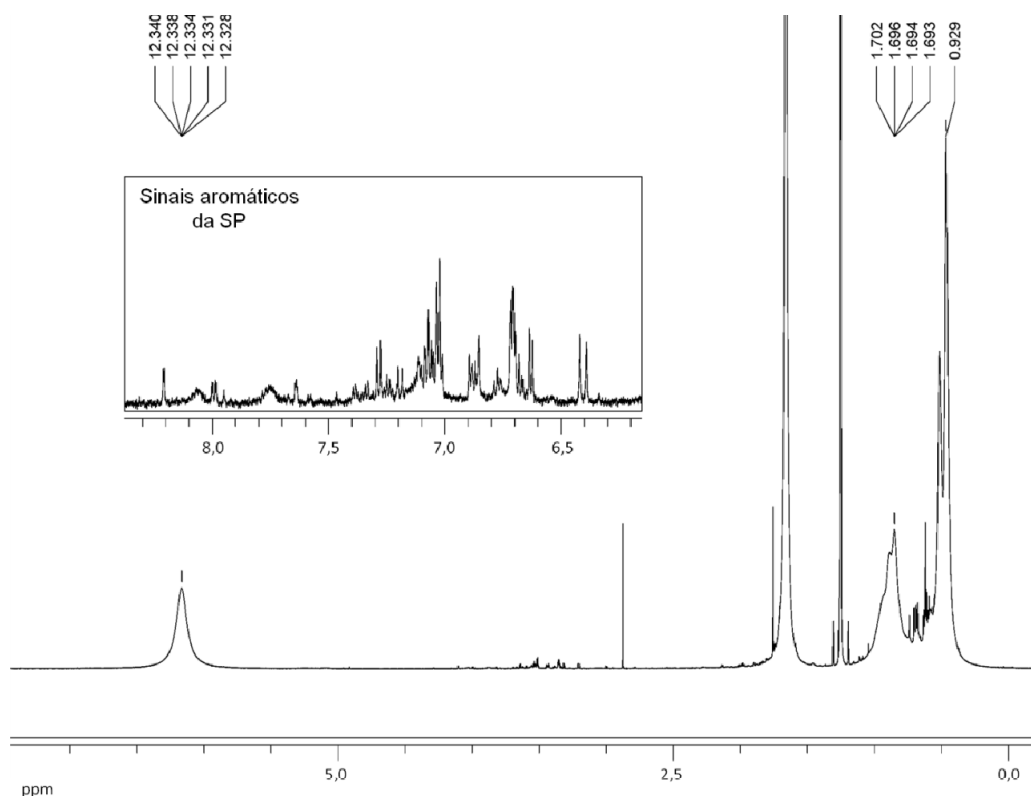


Figura 5.10: Espectro de RMN de ^1H para o polímero PMAA_{SP} , a 600 MHz e a 25 °C, em DMSO_{d6} .

Analisando o espectro é possível verificar a presença dos sinais de hidrogênio característicos tanto do polímero (PMAA) quanto àqueles sinais de hidrogênio da região aromática referentes à molécula de espiropirano. Esse resultado indica que a formação da ligação covalente entre as moléculas de PMAA e SP ocorreu, dando origem ao polímero de interesse. Porém, devido à alta relação sinal ruído obtida no espectro de RMN de ^1H , não foi possível verificar o grau de substituição da cadeia lateral do polímero.

Foi possível verificar de forma qualitativa que todas as moléculas sintetizadas ($\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, PMAA_{SP} e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$) apresentaram propriedades fotocromáticas e termocromáticas, como descrito para a classe dos espiropiranos,^{113,197} propriedades essas que são observadas no estado sólido e em solução.

5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho – FTIR-ATR

A espectroscopia de infravermelho, através da técnica de reflectância atenuada (FTIR-ATR),^{85,139,198} foi utilizada para a caracterização dos materiais utilizados na preparação das fibras: β -ciclodextrina, espiropirano, ciclodextrina modificada ($\beta\text{CD}_{\text{SP}}$), ácido polimetacrílico e o polímero modificado com a $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ ($\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$). Os espectros de infravermelho de FTIR-ATR para a β -ciclodextrina, espiropirano e a β -ciclodextrina modificada ($\beta\text{CD}_{\text{SP}}$) estão apresentados na Figura 5.11.

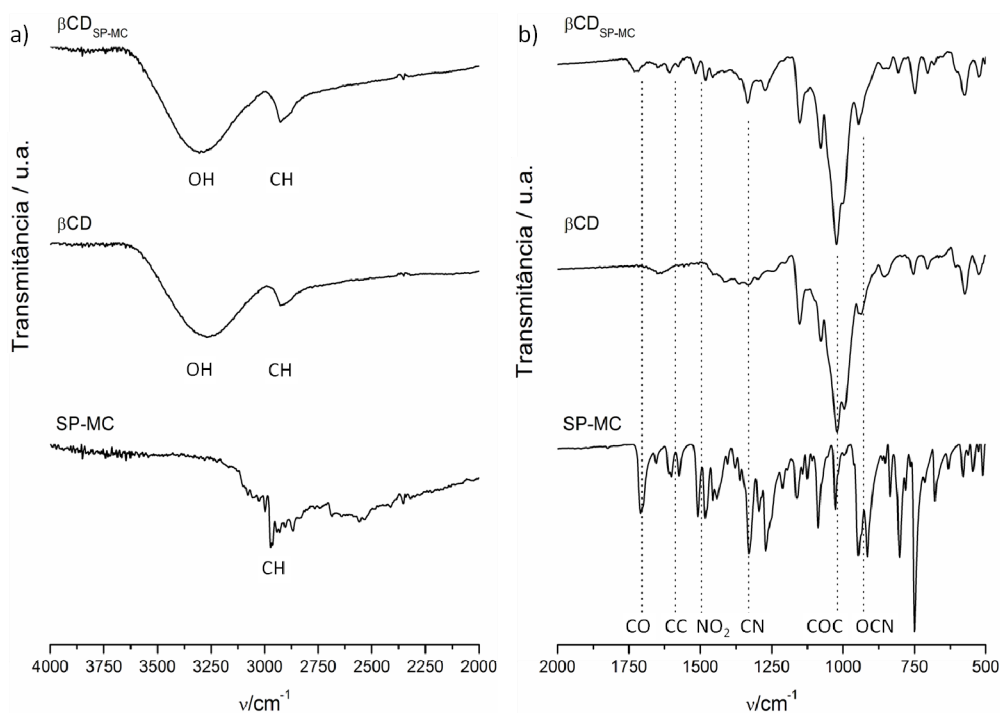


Figura 5.11: Espectros de infravermelho para a βCD , SP e $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$: a) aproximação da região de 4000 a 2000 cm^{-1} e b) região de 2000 a 500 cm^{-1} .

O espectro de infravermelho para a β -ciclodextrina apresenta os sinais característicos para a molécula, como por exemplo: em 3300 cm^{-1} os modos ν OH (referente aos grupos alcoóis primários e secundários), em 2930 cm^{-1} os ν_{sim} e ν_{ass} CH e o ν C-O-C em 1027 cm^{-1} .¹⁹⁹ Outras bandas de infravermelho são observadas na região entre 1500 a 1100 cm^{-1} referente a outros modos vibracionais menos intensos detectados por FTIR-ATR, como o estiramento e deformação CH.^{85,199} Para a molécula de espiropirano o espectro de infravermelho apresenta os seguintes modos vibracionais: em 2930 cm^{-1} os ν_{sim} e ν_{ass} CH, em ν 1707 cm^{-1} o ν CO, entre $1605 - 1575\text{ cm}^{-1}$ os modos de ν C=C (anel aromático conjugado) e C=N e ainda os modos ν CN em 1329 cm^{-1} e ν OCN em 940 cm^{-1} .²⁰⁰⁻²⁰² Para a molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ é possível verificar bandas características de infravermelho das duas moléculas, a βCD e a SP. Esse resultado demonstra e corrobora os dados obtidos por ressonância magnética nuclear e MALDI-TOF, as quais indicaram a formação do sistema $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$.

Os espectros de infravermelho para os polímeros PMAA e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ estão apresentados na Figura 5.12a e 5.12b.

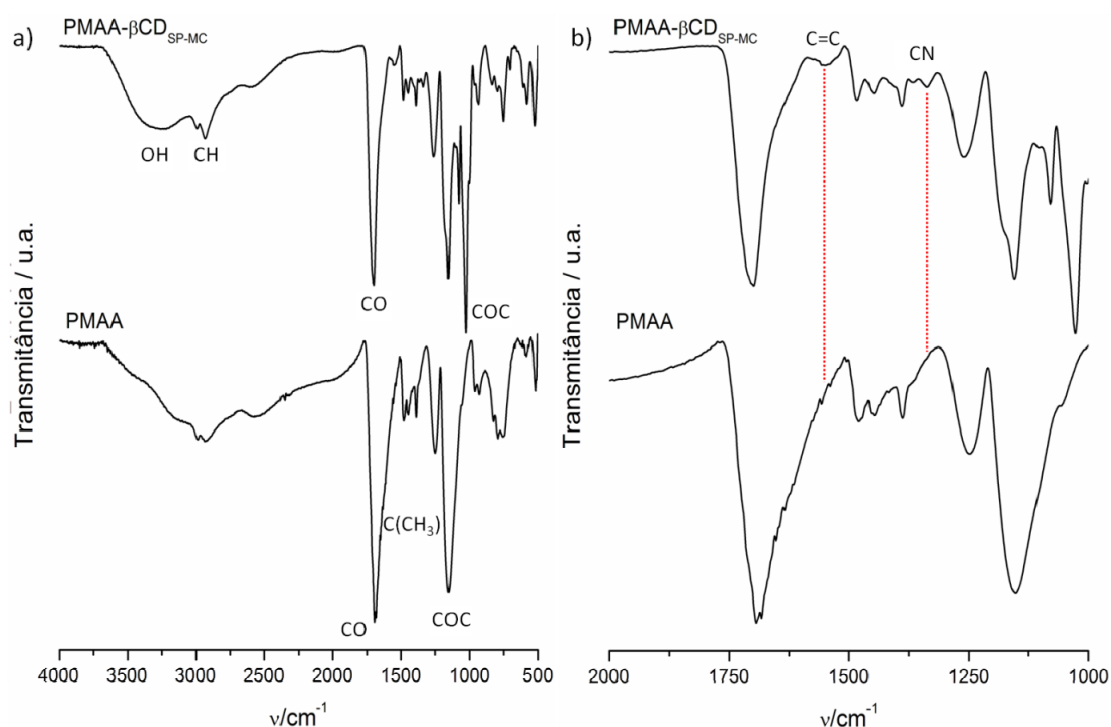


Figura 5.12: Espectros de infravermelho para os polímeros PMAA e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$: a) região de 4000 a 500 cm^{-1} e b) região de 2000 a 1000 cm^{-1} .

Analisando o espectro de FTIR-ATR do polímero puro verificam-se as seguintes bandas de infravermelho: em 1160 cm^{-1} uma banda de vibração do grupo C-O-C, em 1702 cm^{-1} uma banda referente à ν CO, entre $2985 - 2930\text{ cm}^{-1}$ referente aos ν_{sim} e ν_{ass} CH, uma banda larga na região de

3300 cm^{-1} referente ao ν OH. A presença de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares favorece uma redução na intensidade da banda de infravermelho, quando essa é comparada com a banda OH da β CD, por exemplo.^{203,204} Para o polímero modificado, PMAA β CD_{SP}, podem ser verificadas bandas referentes à β -ciclodextrina, como o estiramento OH em 3300 cm^{-1} , bandas de infravermelho referente à molécula de espiropirano em 1575 cm^{-1} atribuídas ao ν C=C do anel aromático substituído e em 1337 cm^{-1} referente ao ν CN, mesmo que em baixa intensidade uma vez que a porcentagem de substituição foi de apenas 1,3 %, além de modos vibracionais referentes ao polímero PMAA, como destacadas na Figura 5.12b.

5.1.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível

As propriedades fotocrômicas das moléculas de espiropirano, β -ciclodextrina modificada (β CD_{SP}) e dos polímeros PMAA β CD_{SP} e PMAA_{SP} foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível. Para a molécula de espiropirano foram utilizadas soluções em solvente orgânico (metanol) uma vez que essa molécula é pouco solúvel em água. Entretanto, foram utilizadas soluções aquosas para a molécula de β CD_{SP} e para os dois polímeros modificados com SP e β CD_{SP} na cadeia lateral. O espectro de UV-vis para a molécula de espiropirano, em ambas as formas isoméricas (SP e MC) estão apresentados na Figura 5.13.

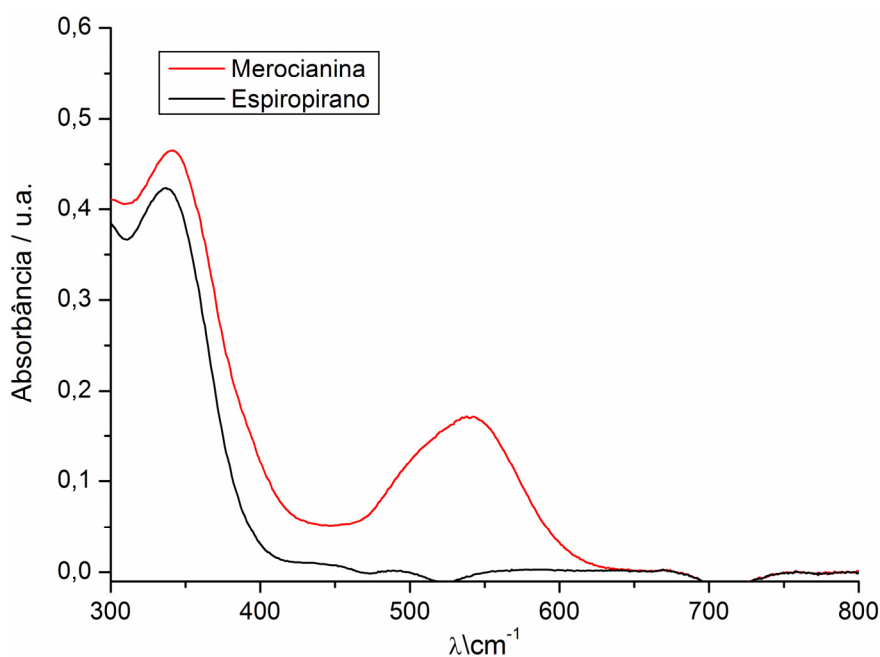


Figura 5.13: Espectros de absorbância na região do ultravioleta visível em metanol para o sistema SP-MC.

O espectro para a forma merocianina apresenta uma banda característica em λ aproximadamente 530 nm referente à isomeria *cis-trans* ($\pi \rightarrow \pi^*$) com maior extensão de conjugação do que a forma *espiro*,²⁰⁵ enquanto que na forma *espiro*, após irradiação com luz visível essa banda é suprimida. Em solvente orgânico, como o utilizado, a forma fechada da molécula fotocromica e sem cor é a mais estável. Sendo assim, a molécula de espiropirano quando dissolvida em metanol apresenta o fotocromismo normal, esse fenômeno é verificado quando a forma incolor é mais estável em solução, só podendo ser obtida a forma aberta (merocianina) através da utilização de uma fonte externa de energia, como por exemplo, irradiação de luz ultravioleta ou aquecimento.^{124,125}

Entretanto, quando a molécula de espiropirano é ligada covalentemente à molécula de β -ciclodextrina o fenômeno de fotocromismo reverso é observado.²⁰⁶ Para esse sistema a forma mais estável em solução aquosa é a forma aberta, a merocianina.¹²⁹ Os espectros de absorvância para a forma MC e SP da molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ estão apresentados na Figura 5.14a. É possível verificar no espectro de UV-vis para a forma aberta da molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ um deslocamento no valor de λ_{MAX} 530 para 514 nm, o qual está em acordo com os dados publicados previamente. Esse deslocamento no valor de absorvância está associado à interação da molécula fotocromica com a βCD .²⁰⁶

Além disso, na Figura 5.14b pode ser verificada a reversibilidade do processo de isomerização da $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, entre as formas aberta e fechada. Esses resultados demonstram que o processo de isomerização em solução aquosa a 40 °C para a molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ pode ser realizado pelo menos dez vezes com alternância de irradiação entre luz visível e ultravioleta por um tempo equivalente a dois minutos.

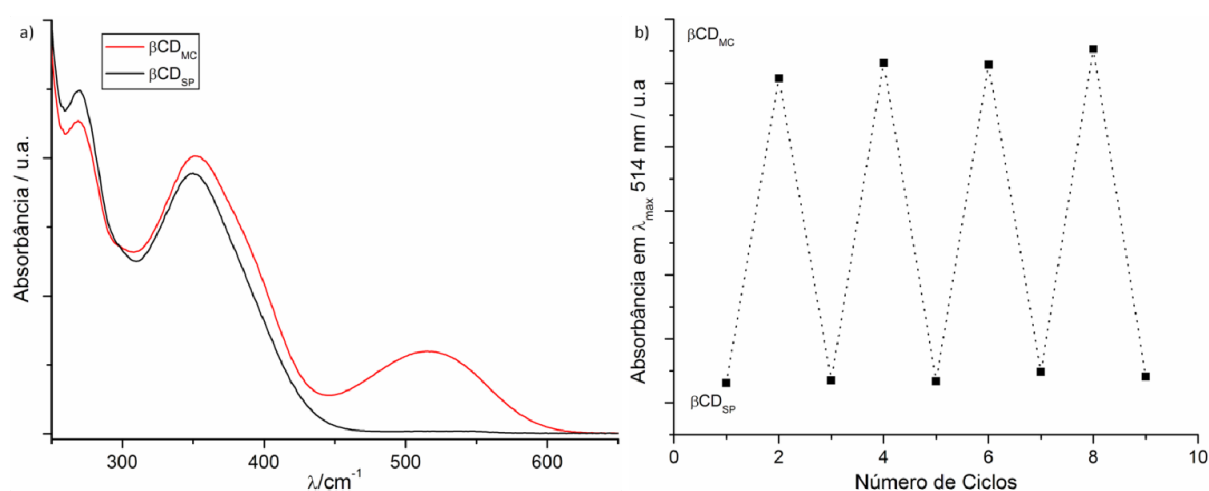


Figura 5.14: a) espectros de absorvância de ultravioleta visível em água para o sistema $\beta\text{CD}_{\text{SP-MC}}$ e b) reversibilidade do processo de isomerização para o sistema $\beta\text{CD}_{\text{SP-MC}}$ alternando ciclos de luz visível e ultravioleta.

A mesma análise de UV-vis realizada para a molécula de β CD_{SP} foi conduzida para o polímero PMAA β CD_{SP}, o qual contém a β -ciclodextrina modificada, Figura 5.15a e 5.15b. Foi verificado, assim como para o sistema β CD_{SP}, que o polímero modificado apresenta fotocrômismo reverso, na qual a espécie mais estável é a forma aberta da molécula fotocrômica. Pode ser observada pela análise dos espectros de absorvância de UV-vis a presença da banda referente ao isômero mero quando a solução de polímero PMAA β CD_{SP} foi irradiada por luz ultravioleta. De forma semelhante ao sistema β CD_{SP}, a solução do polímero apresentou reversibilidade através da irradiação alternada entre luz visível e ultravioleta, com ciclos de pelo menos dez vezes entre as fontes de irradiação. A avaliação da reversibilidade do processo de interconversão entre os isômeros é de extrema importância para uma possível reutilização do polímero e maior aplicação do mesmo, como por exemplo, em sistemas de armazenamento de dados, componentes para dispositivos de óptica não-linear e ainda na produção de lentes oftálmicas, no qual a interconversão e a velocidade de isomerização são fatores de extrema importância para o produto final.^{113,114}

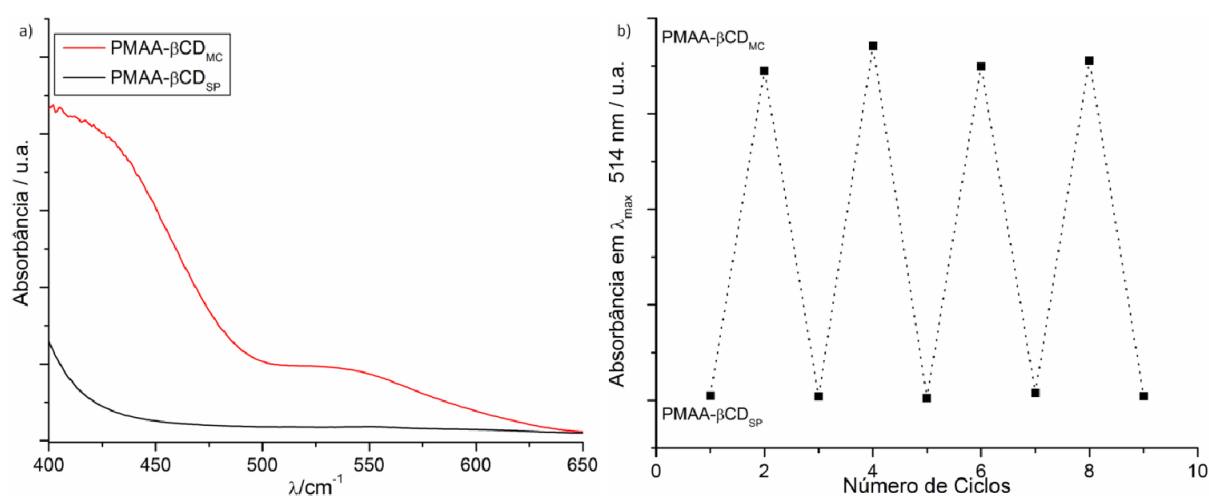


Figura 5.15: a) espectros de absorvância de ultravioleta visível em água para o sistema PMAA β CD_{SP-MC} e b) reversibilidade do processo de isomerização para o sistema PMAA β CD_{SP-MC} alternando ciclos de luz visível e ultravioleta.

De forma comparativa, foram obtidos os espectros de UV-vis e verificada a reversibilidade do processo de isomerização para o polímero PMAA_{SP}, na qual a molécula de espiropirano foi ligada diretamente a cadeia lateral do polímero sem utilizar a β CD como ponte entre a SP e o PMAA, Figura 5.16a e 5.16b. Um mesmo perfil de absorvância para o PMAA_{SP} foi verificado, quando o espectro desse polímero é comparado ao espectro do PMAA β CD_{SP}, apresentando fotocrômismo reverso e ainda a possibilidade de interconversão de pelo menos dez ciclos. O fenômeno do fotocrômismo

reverso observado em solução aquosa tem sido reportado para a molécula de espiropirano quando associada a diferentes matrizes, orgânicas ou inorgânicas. Esse efeito de maior estabilidade para a molécula na forma aberta (merocianina) tem sido atribuído a estabilização desse isômero através de interações não covalentes, principalmente ligação de hidrogênio com o micro ambiente entorno da molécula fotocrômica.^{124,129} Desta forma, esses dados indicam que a molécula de espiropirano está estabilizada na sua forma mero mais estável e é estabilizadas por ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos materiais β CD e PMAA.

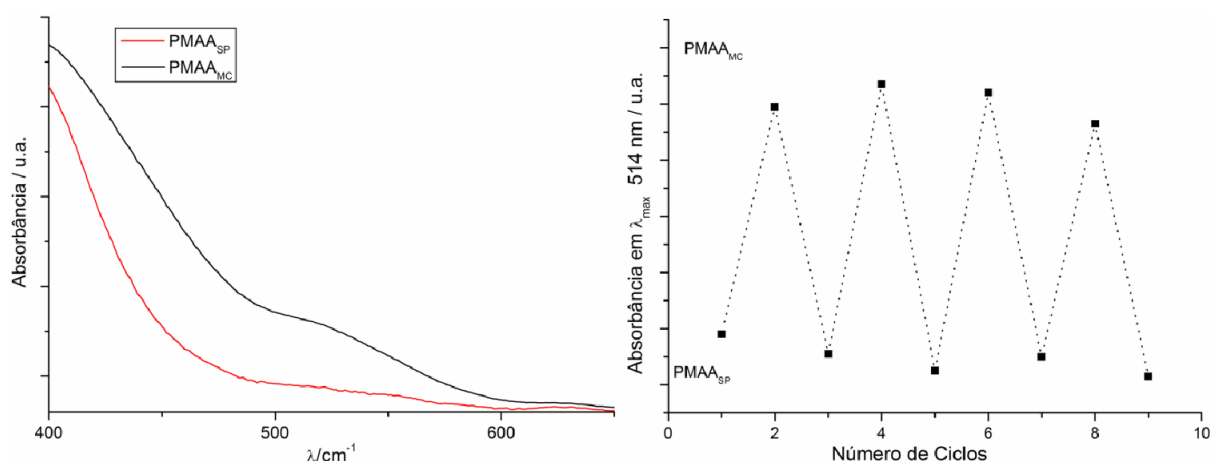


Figura 5.16: a) espectros de absorbância de ultravioleta visível em água para o sistema PMAA_{SP-MC} e b) reversibilidade do processo de isomerização para o sistema PMAA_{SP-MC} alternando ciclos de luz visível e ultravioleta.

Foram conduzidos experimentos de cinética para avaliar o tempo de interconversão da forma fechada (espiro) para a forma aberta (mero), uma vez que as moléculas β CD_{SP}, PMAA_{SP} e PMAA β CD_{SP} apresentaram fotocrômismo reverso. As curvas de cinética de coloração para essas três moléculas avaliadas durante 14 horas estão apresentadas na Figura 5.17, bem como, os valores das constantes de velocidade. Os parâmetros obtidos pelos ajustes biexponenciais são apresentados na Tabela 5.2.

As curvas cinéticas foram analisadas utilizando o modelo de ajuste biexponencial, Equação 5.1, na qual A é a densidade óptica, B_1 e B_2 são as contribuições para a densidade óptica inicial, k_1 e k_2 as constantes de velocidade para os componentes de isomerização rápida e lenta, respectivamente, e C é descoloração quando o tempo se aproxima de infinito.^{113,125} A escolha do modelo biexponencial foi baseada em outros trabalhos da literatura,^{122,126,207} o qual tem sido utilizado devido a estabilização de uma das formas isoméricas da molécula de espiropirano por

ligações de hidrogênio com o solvente ou ainda com a matriz na qual a molécula encontra-se associada.

$$A = B_1(1 - e^{-k_1/t_1}) + B_2(1 - e^{-k_2/t_2}) + C \quad 5.1$$

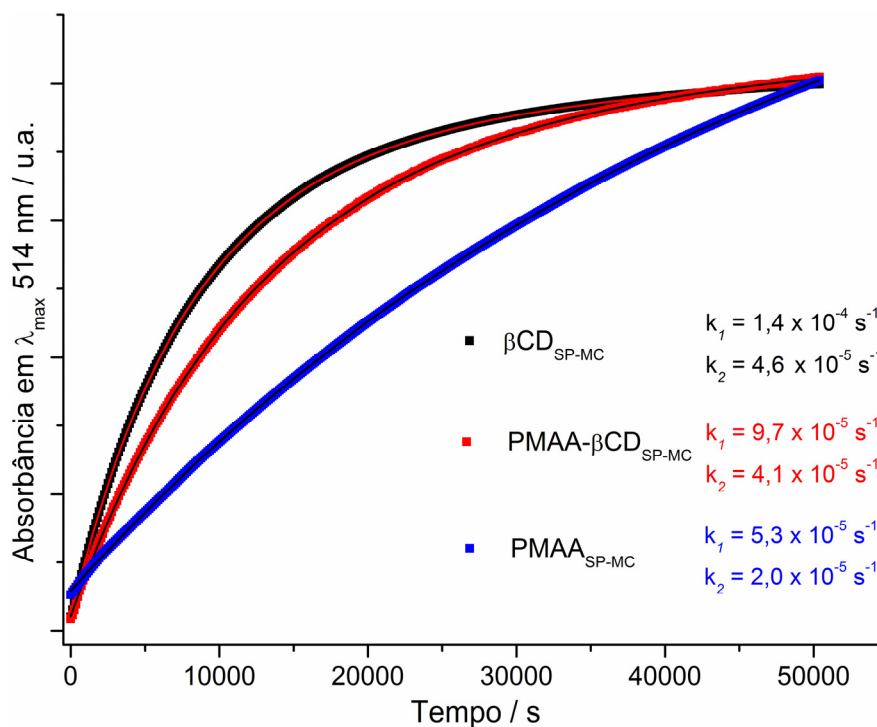


Figura 5.17: Curvas de coloração para as moléculas de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, PMAA_{SP} e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ obtidas a 25 °C.

Tabela 5.2: Parâmetros obtidos pelos ajustes biexponenciais para as curvas cinéticas para os sistemas $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, PMAA_{SP} e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$:

Sistema	K_1 / s^{-1}	K_2 / s^{-1}	C	B_1	B_2
$\beta\text{CD}_{\text{SP}}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-5}$	$0,051 \pm 0,001$	$1,44 \pm 0,008$	$0,57 \pm 0,007$
PMAA_{SP}	$5,3 \times 10^{-5}$	$4,1 \times 10^{-5}$	$0,092 \pm 0,001$	$0,05 \pm 0,140$	$1,62 \pm 0,107$
$\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$	$9,7 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$0,22 \pm 0,001$	$0,46 \pm 0,030$	$0,33 \pm 0,027$

O ajuste através desse modelo biexponencial demonstrou que a molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ apresenta a coloração mais rápida, indicando a isomerização da forma espiral para a forma mero. Para essa molécula de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ foi obtida uma constante de velocidade $k_1 = 1,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, a mais rápida, quando comparada com a constante de velocidade do PMAA_{SP} , $k_1 = 5,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a mais lenta. Para o polímero $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ a constante de velocidade $k_1 = 9,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ apresentou uma velocidade de isomerização entre as forma espiral e mero intermediária em relação às duas outras moléculas. As

constantes de velocidade k_2 para os três sistemas investigados são: $4,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $4,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para as moléculas de $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, PMAA_{SP} e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, respectivamente.

O microambiente ao redor da molécula fotocromica tem demonstrado ser responsável pela estabilização da forma merocianina da molécula e também pela velocidade de interconversão entre as formas isoméricas.^{124,208} Os resultados de interconversão da molécula de espiropirano associadas aos diferentes sistemas (polímero, βCD e polímero- βCD) revelam um resultado interessante acerca das propriedades dos materiais. Primeiramente é verificada que a presença da molécula de βCD leva a uma isomerização mais rápida da forma espiro para a forma mero, fator que a cadeia polimérica do PMAA não é capaz de proporcionar. Isso demonstra que os grupos (-OH) das bordas do cone da molécula de β -ciclodextrina favorecem um microambiente que estabiliza a forma aberta, mais hidrofílica, provavelmente por interações de hidrogênio.

Embora a estrutura do PMAA também apresente hidroxilas em sua cadeia lateral, o sistema PMAA_{SP} é aquele que apresenta a menor velocidade de interconversão, isso se deve ao fato da cadeia do polímero apresentar grupos (-CH₃) os quais podem ser responsáveis pela estabilização da forma fechada da molécula de espiropirano. Além disso, devido à menor mobilidade da molécula de SP no sistema polimérico, a velocidade de isomerização pode ser diretamente influenciada, estabilizando a forma espiro.¹¹³

Desta forma, combinar as propriedades de ambos os sistemas, βCD e PMAA, levou a uma taxa de isomerização intermediária quando esse sistema é comparado com os outros dois anteriores, através da parte hidrofílica da molécula de βCD e da cadeia polimérica do PMAA. A baixa taxa de interconversão da espiropirano no sistema PMAA_{SP} foi causada pela baixa mobilidade da SP no sistema e/ou ainda pela presença da parte hidrofóbica da molécula, porém, com a utilização da molécula de βCD como ponte entre os sistemas foi observada uma interconversão mais rápida. Esse resultado confirma a importância das hidroxilas da molécula de ciclodextrina ao sistema, favorecendo a isomerização mais rápida.

5.2. Nanofibras a Base do Ácido Polimetacrílico e $\text{PMAA}\beta\text{CD}_{\text{SP}}$

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias para as duas fibras obtidas por eletrofiação utilizando dimetilformamida como solvente estão apresentadas nas Figuras 5.18a, 5.18b, 5.18c e 5.18d.

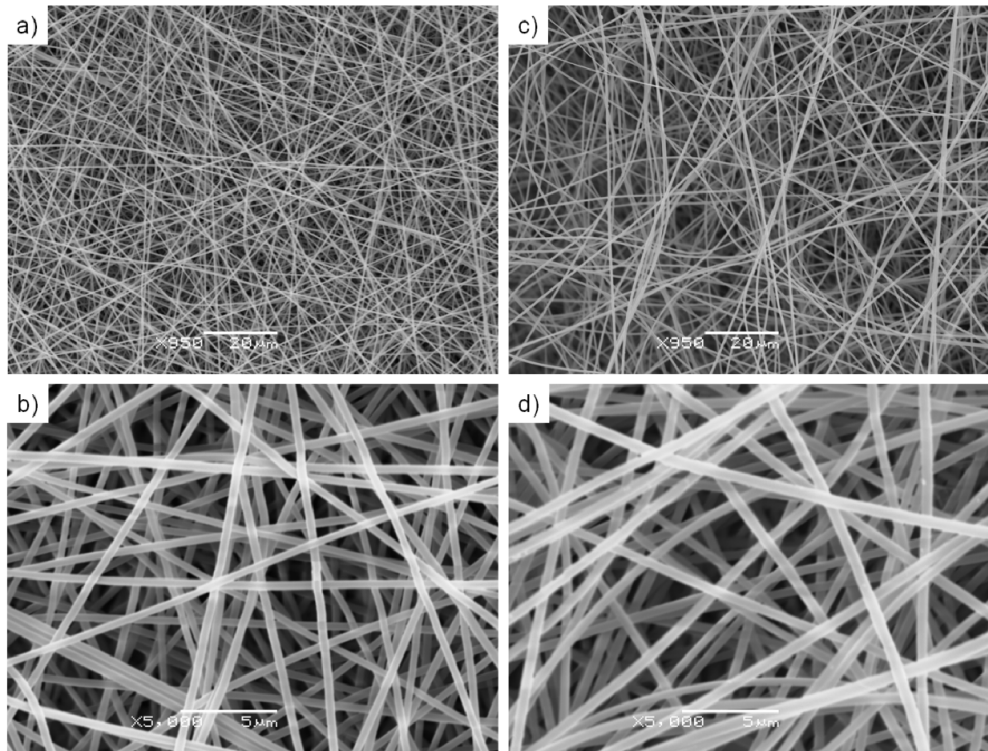


Figura 5.18: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fibras obtidas por eletrofiação do polímero PMAA β CD_{SP} aproximação de (a) 950 X (b) 5000 X e para o polímero PMAA (c) 950 X e (d) 5000 X.

Analisando as micrografias verifica-se que as fibras obtidas com o polímero PMAA β CD_{SP} não apresentam gotas e poros em sua estrutura. A ausência de poros em sua estrutura deve-se a utilização de um solvente pouco volátil, o DMF.^{92,111} Já a homogeneidade da superfície é uma combinação dos parâmetros de distância entre o bico injetor e a placa coletora, bem como o fluxo de injeção da solução polimérica e da voltagem aplicada no bico injetor, no qual esse último é mais relevante dentre os demais.⁹¹ O efeito da variação de voltagem aplicada no bico injetor pode ser melhor verificado para a solução de um poli carbonato utilizado para obtenção de nanofibras por eletrofiação, onde a corrente aplicada variou de 10 a 25 kV. Para esse sistema o aumento da voltagem aplicada favorecia o desaparecimento das gotas poliméricas na estrutura das nanofibras, confirmando a hipótese para o polímero de PMAA β CD_{SP}.²⁰⁹ Mais ainda, pode ser observada uma pequena distribuição no diâmetro das fibras obtidas, que apresentam um tamanho médio de 422 ± 24 nm.

Para as fibras obtidas a base de PMAA, Figuras 5.18c e 5.18d, essas também apresentaram características morfológicas semelhantes às obtidas para o polímero PMAA β CD_{SP}, as quais não apresentam de gotas poliméricas em sua estrutura e nem porosidade em sua superfície. O resultado

comparativo entre as fibras de PMAA β CD_{SP} e PMAA sugere que a presença da molécula de β CD_{SP} presente na cadeia lateral do polímero não alterou significativamente as propriedades do PMAA. As fibras obtidas utilizando o PMAA também apresentaram uma pequena distribuição de tamanho, 526 ± 24 nm, porém, verifica-se um aumento de aproximadamente 20 % no diâmetro dessas nanofibras quando comparado àquelas obtidas com o PMAA β CD_{SP}.

As propriedades fotocromicas, sob irradiação de luz UV e luz visível e ainda termocromicas das moléculas de β CD_{SP}, referentes à isomerização da SP em MC, foram verificadas nas nanofibras obtidas por eletrofiação, como apresentado nas Figuras 5.19a e 5.19b. As nanofibras apresentadas na Figura 5.19a foram aquecidas a 80 °C durante 12 horas e então irradiadas por luz visível através de um molde (representado pelas iniciais de nome *Massachusetts Institute of Technology* – MIT). Após esse processo as nanofibras de PMAA β CD_{SP} apresentaram duas cores: uma cor vermelha clara associada à presença de moléculas na forma merocianina a qual foi mantida protegida de luz visível e outra parte branca referente à forma espiro, a qual foi irradiada pela luz visível. Essas observações demonstram a presença da molécula fotocromica na nanofibra, bem como sua possibilidade de interconversão entre as formas SP e MC. Além disso, as fibras foram colocadas sob irradiação de luz UV, Figura 5.19b, e a diferença entre as formas SP e MC foram evidenciadas devido às propriedades fluorescentes da molécula merocianina.

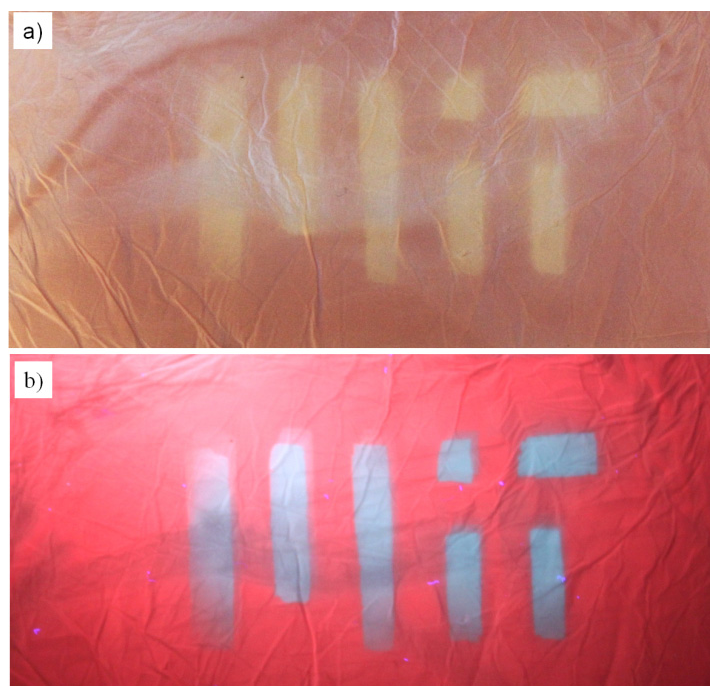


Figura 5.19: Nanofibras (tamanho 10 X 7 cm) obtidas por eletrofiação: a) aquecidas a 80 °C e iluminada por luz visível através de um molde e então b) expostas a luz ultravioleta.

5.2.2. Ângulo de Contato da Água

A técnica de medida de ângulo de contato da água com a superfície da nanofibra foi utilizada para determinar as características de hidrofobia e hidrofília da superfície das nanofibras obtidas por eletrofiação. Foram realizadas medidas de ângulo de contato da água de forma dinâmica e também estática. Primeiramente foi feita uma comparação entre as propriedades de superfície das nanofibras de PMAA com aquelas obtidas com o polímero modificado, PMAA β CD_{SP}.

Nas Figuras 5.20a – 5.20f estão apresentadas as propriedades de absorção da água nas superfícies de PMAA e também de PMAA β CD_{SP} em função do tempo. O processo de absorção da água foi feito para os dois sistemas após o processo de tratamento térmico das nanofibras, onde ambos os materiais foram mantidos a aproximadamente 170 °C por 12 horas em estufa. Esse tratamento térmico é descrito na literatura para diferentes nanofibras obtidas por eletrofiação, incluindo àquelas com PMAA em sua estrutura, com o intuito de aumentar a resistência das fibras à água.⁹⁶

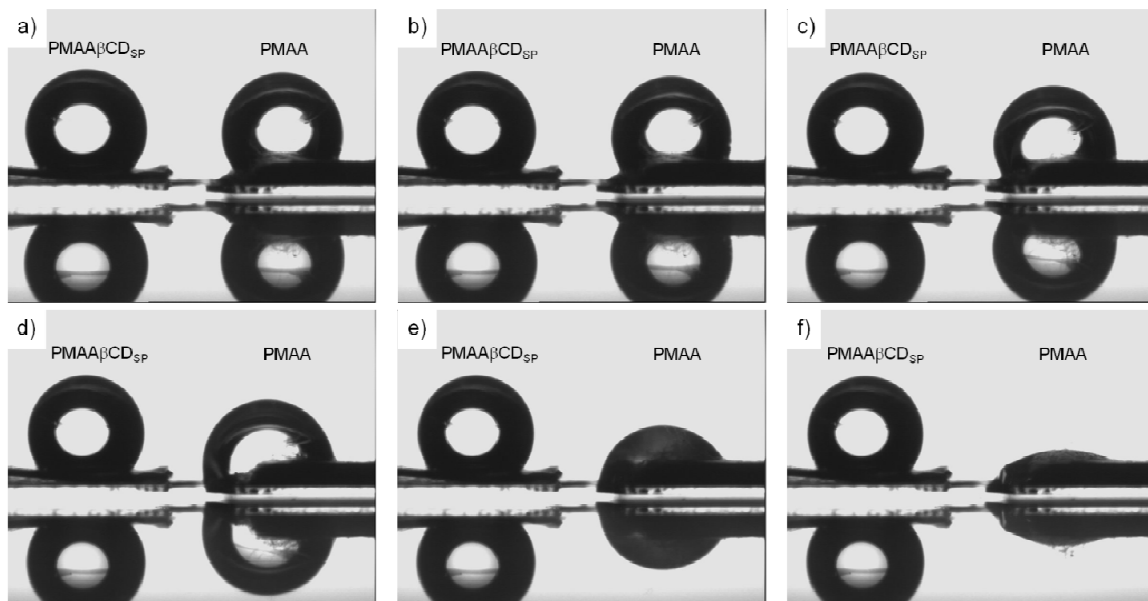


Figura 5.20: Gotas de água em nanofibras a base de PMAA β CD_{SP} (à esquerda) e PMAA (à direita) após o tempo de: a) zero s, b) 180 s, c) 360 s, d) 370 s, e) 420 s e f) 480 s.

Analisando as imagens obtidas pelo experimento de ângulo de contato da água com a superfície das nanofibras de PMAA e PMAA β CD_{SP} em função do tempo, fica evidente que à medida que o tempo passa a superfície das nanofibras à base de PMAA adsorve a gota de água, o que não é verificado para o polímero modificado. Isso pode ser concluído uma vez que após 420 segundos as nanofibras de PMAA absorveram toda a água de sua superfície, enquanto que a gota de água se

manteve praticamente inalterada sobre a superfície da nanofibra de PMAA β CD_{SP}. Esse resultado demonstra o maior caráter hidrofóbico para a superfície das nanofibras de PMAA β CD_{SP}, o que é consequência não somente do tratamento térmico utilizado, mas também da modificação da cadeia lateral polimérica do ácido poli (metacrílico) com a ciclodextrina fotocromica.

Demonstrado o maior caráter hidrofóbico das nanofibras de PMAA β CD_{SP}, foi realizado o estudo do ângulo de contato da água com a superfície desse polímero após a irradiação com luz visível e também com luz UV, como apresentado nas Figuras 5.21a 5.21b, respectivamente.

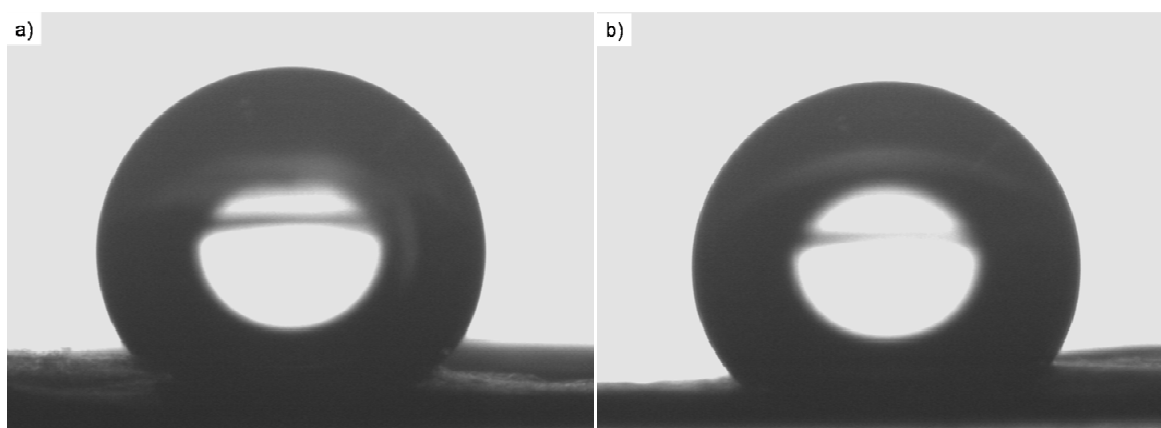


Figura 5.21: Medidas de ângulo de contato da água com a superfície das nanofibras de PMAA β CD_{SP} após 24 horas sob irradiação de: a) luz visível, PAMM β CD_{SP} e b) luz UV, PAMM β CD_{MC}.

O ângulo de contato da água com a superfície irradiada por UV apresentou um valor de $138 \pm 2^\circ$ e para aquela nanofibra irradiada por luz visível o valor do ângulo de contato foi de $155 \pm 5^\circ$. Essa variação no ângulo de contato da água para as duas nanofibras que foram irradiadas por fontes de luz diferentes pode estar relacionada com a presença das moléculas de espiropirano na superfície do material. Desta forma, é coerente que valores menores de ângulo de contato sejam observados para a espécie na forma aberta da molécula (MC), devido ao seu maior caráter hidrofílico. Enquanto que a presença de moléculas na forma fechada (SP) com maior característica hidrofóbica presente maiores valores de ângulo de contato da água com o material polimérico. Essa diferença de 15° observada entre as duas superfícies está de acordo com outros resultados já publicados na literatura, nos quais a molécula de espiropirano ou ainda outras moléculas com propriedades fotocromicas encontram-se incorporada a matrizes poliméricas.^{210,211}

Segundo o trabalho de Wang e colaboradores quando a molécula de SP foi incorporada em uma matriz polimérica, sem modificação da cadeia lateral do polímero e o material irradiado durante 10 minutos por luz visível e UV não foi observada nenhuma variação significativa nos valores de ângulo de contato da água com a superfície das nanofibras.¹⁰⁰ Entretanto, os valores de ângulo de

contato obtidos por Wang e colaboradores em seus experimentos para o sistema contendo a molécula de espiropirano foi de 145° , o que está de acordo com os resultados observados no presente trabalho. A ausência de variação nas medidas de ângulo de contato quando as nanofibras foram irradiadas por luz UV e visível para o sistema de Wang quando comparadas com os resultados do presente trabalho, demonstram que o processo de substituição da cadeia lateral do polímero com a molécula fotocromica, neste caso a $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$, é fundamental para que uma resposta mais sensível possa ser obtida a partir de nanofibras poliméricas.

Para verificar se a variação nas medidas de ângulo de contato com a água, observada para a superfície das nanofibras, foi oriunda da presença de moléculas de espiropirano na superfície do material, filmes a base do polímero modificado foram obtidos. Esses filmes obtidos pela técnica de recobrimento por rotação utilizando dimetilformamida como solvente foram tratados termicamente do mesmo modo que as nanofibras (170°C) e irradiados por UV e luz visível durante 24 horas. Os filmes obtidos após esse período estão apresentados nas Figuras 5.22a e 5.22b.

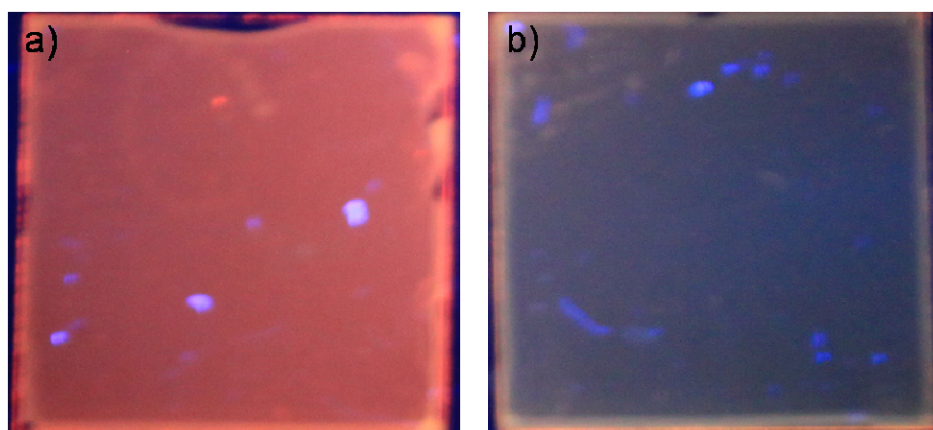


Figura 5.22: Filmes a base de PMAA $\beta\text{CD}_{\text{SP}}$ obtidos por recobrimento por rotação e irradiados durante 24 horas por: a) luz UV e b) luz visível.

O valor de ângulo de contato da água com o filme irradiado por UV foi de $59 \pm 4^\circ$ e para o filme que foi exposto a luz visível o valor foi de $68 \pm 2^\circ$. Mais uma vez foi verificada uma coerência entre os valores de ângulo de contato com a água e a forma isomérica da molécula fotocromicas no sistema polimérico, uma vez que ângulos de contato menores foram observados para o filme irradiado por UV, indicando a presença de moléculas na forma MC na superfície do filme. Esses resultados estão de acordo com outros já publicados na literatura.²¹² Com o objetivo de confirmar a presença do polímero sobre a superfície de vidro no qual os filmes foram obtidos, medidas de ângulo de contato da água com esse suporte foram obtidas, $23 \pm 1^\circ$. Esse resultado demonstra que a placa de vidro apresenta um grande caráter hidrofílico, confirmando que os valores de ângulo de

contato da água medidos anteriormente são oriundos do filme polimérico. Além disso, a variação no ângulo de contato da água com as duas superfícies distintas, nanofibras e filmes oriundos do mesmo polímero, indicam a dependência do ângulo de contato da água com a radiação incidente e com a rugosidade da superfície.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

5.2.3. Espectroscopia de Infravermelho – FTIR-ATR

Com o objetivo de confirmar a presença da β CD_{SP} na superfície das nanofibras, a técnica de espectroscopia de infravermelho por reflectância atenuada foi utilizada. Nas Figuras 5.23a e 5.23b estão apresentados os espectros de FTIR-ATR para a nanofibra de PMAA e de PMAA β CD_{SP}.

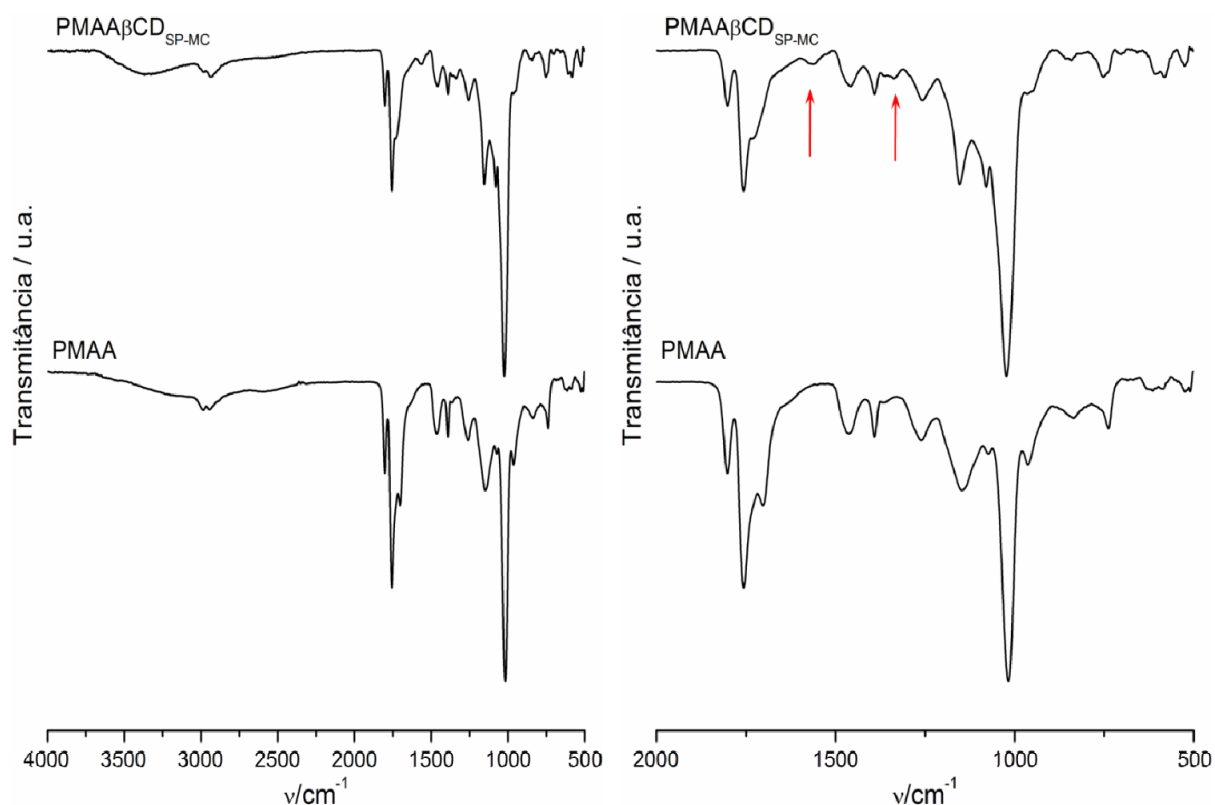


Figura 5.23: Espectros de infravermelho para as nanofibras de PMAA e PMAA β CD_{SP}: a) região de 4000 a 500 cm^{-1} e b) região de 2000 a 1000 cm^{-1} .

O espectro de FTIR-ATR para a nanofibra de PMAA apresentou três bandas de C=O distinguíveis em 1802, 1756 e 1701 cm^{-1} , onde essas duas últimas são atribuídas à presença de C=O livres (1756 cm^{-1}) e aquelas que estão interagindo com outros grupos fazendo ligações de hidrogênio (1701 cm^{-1}).²¹³ Além disso, ocorreu o surgimento de uma nova banda em 1017 cm^{-1} como consequência do tratamento térmico, banda essa que está relacionada à interação entre os grupos

carbonílicos. No espectro de FTIR-ATR para as nanofibras de PMAA β CD_{SP} são observadas bandas referentes às moléculas de PMAA e ainda da β -ciclodextrina. Mais ainda, duas bandas referentes à molécula de espiropirano também foram verificadas no espectro, como destacado na Figura 5.23b. Essas duas bandas de (C=C) em 1575 e (CN) em 1337 cm⁻¹ demonstram a existência de moléculas de espiropirano na superfície das nanofibras, ou a uma distância muito pequena. Embora, a identificação dessas bandas referentes à molécula fotocromica tenha sido possível as mesmas apresentam baixa intensidade, uma vez que a concentração de espiropirano na cadeia polimérica é pequena, com substituição da cadeia lateral de 1,3 % de β CD_{SP}.

Os resultados de infravermelho confirmam que a variação nos valores obtidos para o ângulo de contato da água com a superfície das nanofibras em função da irradiação de luz se deve a presença da ciclodextrina fotocromica na superfície. Essa modificação das propriedades de superfície em função da irradiação de luz visível ou UV e com possibilidade de foto-reversibilidade do sistema pode tornar a aplicação desse material muito interessante. Esse material poderia ser aplicado como matrizes para crescimento celular, onde a mudança de hidrofobicidade da superfície pode favorecer ou não a adesão das células na superfície das nanofibras. Filmes finos com diferentes materiais fotocromicos têm sido utilizados para esse fim nos quais alternando a irradiação de luz UV por visível tem modificado as propriedades de adesão celular na superfície.^{120,212,214} Uma vantagem que as nanofibras apresentam sobre os filmes finos está relacionada a sua maior área superficial o que favorece a interação entre a célula e a superfície.^{215,216}

Capítulo 6

Conclusões

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos para os sistemas estudados no presente trabalho é possível concluir que a β -ciclodextrina pode ser utilizada como molécula hospedeira para sistemas supramoleculares envolvendo o peptídeo BPP10c, apresenta ainda características de sistemas auto-organizáveis e pode ser associada à sistemas poliméricos.

De maneira específica, para o sistema envolvendo a interação entre o peptídeo (BPP10c) e a β -ciclodextrina, a utilização de técnicas de RMN uni- e bidimensionais possibilitou confirmar a estrutura primária do peptídeo. Os resultados de RMN demonstraram a existência de pelo menos duas estruturas secundárias para esse peptídeo em solução aquosa. A interação entre o BPP10c e a molécula de β -ciclodextrina foi confirmada por RMN, através de correlações dipolares entre os hidrogênios aromáticos do resíduo de triptofano e os hidrogênios internos da β -ciclodextrina. Esses resultados indicam a formação preferencial de um complexo de inclusão na razão molar 1:1. Embora a interação entre as moléculas hóspede e hospedeira tenha sido confirmada em solução por RMN, a inclusão do resíduo de triptofano na cavidade da β CD não modificou significativamente a estrutura secundária do peptídeo.

Os parâmetros termodinâmicos de interação entre a β CD e o BPP10c foram obtidos por calorimetria de titulação isotérmica, demonstrando a espontaneidade do processo com uma variação entálpica favorável, porém, com uma baixa constante de formação. Os tipos de estruturas secundárias do BPP10c e as respectivas contribuições foram identificadas por FTIR-HATR em solução. O espectro de FTIR-HATR do BPP10c em solução de DMSO demonstrou que o peptídeo possui uma estrutura estendida, entretanto, em presença de β -ciclodextrina diferentes tipos de estrutura secundária foram identificadas. A existência de pelo menos três estruturas secundárias diferentes foi verificada para o sistema envolvendo a β CD, para os solventes utilizados. A técnica de dicroísmo circular confirmou essas estruturas secundárias identificadas por FTIR-HATR.

Com base nas medidas de espalhamento de luz dinâmico foram obtidos os valores de concentração de agregação crítica (*cac*) da β CD e a distribuição de tamanho das partículas antes e após o ponto de agregação, demonstrando a existência de nanoagregados na ordem de 1,5 nm antes da *cac* de 60 a 120 nm após esse ponto. A partir dos valores de *cac* foram calculados os parâmetros termodinâmicos da auto-agregação para a β CD, evidenciando a espontaneidade do processo, com uma contribuição entálpica favorável.

Os resultados de espalhamento de luz estático determinaram que três moléculas de β CD compõem os agregados antes da *cac*, e ainda a afinidade entre as moléculas em solução através dos valores negativos obtidos para o segundo coeficiente do virial.

A auto-agregação da β CD foi estudada em presença da molécula hóspede Ampicilina e as interações intermoleculares para esse sistema investigadas por técnicas físico-químicas de análise. Experimentos de UV-visível determinaram o valor da *cac* para o sistema e este foi equivalente ao obtido por espalhamento de luz. As técnicas de RMN e de ITC demonstram a inclusão da molécula hóspede na cavidade da β CD e identificou os parâmetros termodinâmicos de interação para o sistema supramolecular, respectivamente. Para o sistema auto-organizado foi identificada a dependência da forma do agregado em função da concentração de β -ciclodextrina na presença da molécula hóspede, demonstrada pela presença de estruturas globulares antes da *cac* e arranjos lineares após a este ponto de agregação.

Com base nos resultados experimentais, os cálculos de dinâmica molecular identificaram os arranjos estruturais tanto dos agregados formados por três moléculas de β CD, quanto para os sistemas supramoleculares com a molécula hóspede. Os resultados dessas simulações demonstraram a estabilidade dos arranjos estudados e a importância da molécula hóspede para estabilizar os arranjos lineares.

Para o sistema polimérico, as rotas de síntese escolhidas permitiram obter as moléculas de interesse para o presente trabalho. As estruturas dessas moléculas foram confirmadas por RMN e espectrometria de massa (MALDI-TOF). As moléculas sintetizadas associadas à Espiropirano apresentaram propriedades fotocromicas e termocromicas em solução e no estado sólido. Em solução, foi observado o fotocromismo reverso para as moléculas de β CD_{SP}, PMAA_{SP} e PMAA β CD_{SP}. A reversibilidade da isomerização desses três sistemas foi observada e caracterizada, indicando que o processo pode ser repetido pelo menos 10 vezes em solução. As curvas cinéticas de isomerização para esses sistemas demonstraram que a β CD_{SP} apresentou o processo de isomerização mais rápido, enquanto que o polímero PMAA_{SP} possui a isomerização mais lenta. Porém, a combinação as duas moléculas (β CD e PMAA) no polímero PMAA β CD_{SP} leva a uma taxa de isomerização intermediária a observada para os sistemas anteriores.

Desta forma, foram obtidas nanofibras por eletrofiação utilizando o polímero modificado com a β CD_{SP}, fibras estas que também apresentaram propriedades fotocromicas. Essas nanofibras possuem características hidrofóbicas, principalmente quando são comparadas com àquelas obtidas a partir do polímero PMAA não modificado. Além disso, mediante os diferentes tipos de irradiações (luz UV ou visível) sobre a superfície das nanofibras o ângulo de contato da água pode ser alterado, sugerindo a presença da molécula de espiropirano na superfície do material. Esse mesmo fenômeno foi verificado para filmes obtidos utilizado esse mesmo polímero. A presença da molécula de SP na superfície das nanofibras de PMAA β CD_{SP} foi confirmada por FTIR-ATR, através da identificação dos modos vibracionais da molécula de espiropirano.

Capítulo 7

Referências

7. Referências

- (1) Hall, N. *Neoquímica - A química moderna e suas aplicações*; 1ª ed.; Bookman: Porto Alegre, 2004.
- (2) Micali, N.; Villari, V.; Mazzaglia, A.; Scolaro, L. M.; Valerio, A.; Rencurosi, A.; Lay, L. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3239-3244.
- (3) Cabaleiro-Lago, C.; Nilsson, M.; Söderman, O. *Langmuir* **2005**, *21*, 11637-11644.
- (4) He, Y.; Fu, P.; Shen, X.; Gao, H. *Micron* **2008**, *39*, 495-516.
- (5) Tamerler, C.; Sarikaya, M. *MRS Bulletin* **2008**, *33*, 504-512.
- (6) Lee, Y. S. *Self-Assembly and Nanotechnology: A Force Balance Approach*; 1ª ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2008.
- (7) Pelesko, J. A. *Self-Assembly: The Science of Things that Put Themselves Together*; 1ª ed.; Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, 2007.
- (8) Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, *295*, 2418-2421.
- (9) Moore, J. S.; Kraft, M. L. *Science* **2008**, *320*, 620-621.
- (10) Pashley, R. M.; Karaman, M. E. *Applied Colloid and Surface Chemistry*; 1ª ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, 2004.
- (11) Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*; 2ª ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, 2002.
- (12) Tomczak, M. M.; Slocik, J. M.; Stone, M. O.; Naik, R. R. *MRS Bulletin* **2008**, *33*, 519-523.
- (13) Thassu, D.; Deleers, M.; Pathak, Y. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*; 1ª ed.; Informa HealthCare: New York, 2007.
- (14) Tan, J. P. K.; Wang, Q.; Tam, K. C. J. *Controlled Release* **2008**, *128*, 248-254.
- (15) Lavelle, E. C. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2001**, *18*, 341-386.
- (16) Sood, A.; Panchagnula, R. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3275-3303.
- (17) Goldberg, M.; Gomez-Orellana, I. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 289-295.
- (18) Soares, A. F.; Carvalho, R. A.; Veiga, F. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 183-202.
- (19) Camenisch, G.; Alsenz, J.; Waterbeemd, H. v. d.; Folkers, G. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *6*, 313-319.
- (20) Denadai, Â. M. L.; Ianzer, D.; Alcantara, A. F. C.; Santoro, M. M.; Santos, C. F. F.; Lula, I. S.; de Camargo, A. C. M.; Faljoni-Alario, A.; dos Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D. *Inter. J. Pharm.* **2007**, *336*, 90-98.
- (21) Lula, I.; Denadai, Â. L.; Resende, J. M.; De Sousa, F. B.; de Lima, G. F.; Pilo-Veloso, D.; Heine, T.; Duarte, H. A.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D. *Peptides* **2007**, *28*, 2199-2210.

-
- (22) Denadai, Â. M. L.; Santoro, M. M.; Lopes, M. T. P.; Chenna, A.; De Sousa, F. B.; Avelar, G. M.; Gomes, M. R. T.; Guzman, F.; Salas, C. E.; Sinisterra, R. D. *Biodrugs* **2006**, *20*, 283-291.
- (23) De Sousa, F. B.; Denadai, Â. M. L.; Lula, I. S.; Ianzer, D.; Malaspina, E. R.; Camargo, A. C. M.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* **2010**, *67*, 407-422.
- (24) Bala, I.; Hariharan, S.; Kumar, M. R. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* **2004**, *21*, 387-422.
- (25) Hedges, A. R. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035-2044.
- (26) Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076.
- (27) Loftsson, T.; Duchene, D. *Inter. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1-11.
- (28) Gomes, C. L.; Konno, K.; Conceição, I. M.; Ianzer, D.; Yamanouye, N.; Prezoto, B. C.; Assakura, M. T.; Rádís-Baptista, G.; Yamane, T.; Santos, R. A.; Camargo, A. C. M.; Hayashi, M. A. F. *Biochem. Pharm.* **2007**, *74*, 1350-1360.
- (29) Ianzer, D.; Konno, K.; Marques-Porto, R.; Vieira Portaro, F. C.; Stocklin, R.; Martins de Camargo, A. C.; Pimenta, D. C. *Peptides* **2004**, *25*, 1085-1092.
- (30) Ianzer, D.; Santos, R. A. S.; Etelvino, G. M.; Xavier, C. H.; Santos, J. d. A.; Mendes, E. P.; Machado, L. T.; Prezoto, B. C.; Dive, V.; Camargo, A. C. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 795-805.
- (31) Silva, C. A.; Portaro, F. C. V.; Fernandes, B. L.; Ianzer, D. A.; Guerreiro, J. R.; Gomes, C. L.; Konno, K.; Serrano, S. M. T.; Nascimento, N.; Camargo, A. C. M. *Toxicon* **2008**, *51*, 515-523.
- (32) Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871-892.
- (33) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*; 1^a ed.; Wiley-VCH, 1995.
- (34) Schlick, T. L.; Ding, Z.; Kovacs, R. W.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718-3723.
- (35) Ciferri, A. *Supramolecular Polymers*; 1^a ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000.
- (36) Szejtli, J. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1825-1845.
- (37) Greef, T. F. A.; Meijer, E. W. *Nature* **2008**, *453*, 171-173.
- (38) Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 1023-1035.
- (39) Bonini, M.; Rossi, S.; Karlsson, G.; Almgren, M.; Nostro, P. L.; Baglioni, P. *Langmuir* **2006**, *22*, 1478-1484.
- (40) Rossi, S.; Bonini, M.; Nostro, P. L.; Baglioni, P. *Langmuir* **2007**, *23*, 10959-10967.
- (41) Messner, M.; Kurkov, S. V.; Jansook, P.; Loftsson, T. *Inter. J. Pharm.* **2010**, *387*, 199-208.
- (42) Bardi, L.; Mattei, A.; Steffan, S.; Marzona, M. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *27*, 709-713.
- (43) González-Gaitano, G.; Rodríguez, P.; Isasi, J. R.; Fuentes, M.; Tardajos, G.; Sánchez, M. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* **2002**, *44*, 101-105.
- (44) Sun, S. F. *Physical Chemistry of Macromolecules: Basic Principles and Issues*; 2^a ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2004.

-
- (45) Kuykendall, D. W.; Zimmerman, S. C. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 201-202.
- (46) Choisnard, L.; Gèze, A.; Putaux, J.-L.; Wong, Y.-S.; Wouessidjewe, D. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 515-520.
- (47) Sowmiya, M.; Purkayastha, P.; Tiwari, A. K.; Jaffer, S. S.; Saha, S. K. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, *205*, 186–196.
- (48) Choisnard, L.; Gèze, A.; Yaméogo, B. G. J.; Putaux, J.-L.; Wouessidjewe, D. *Inter. J. Pharm.* **2007**, *344*, 26-32.
- (49) Lombardo, D.; Longo, A.; Darcy, R.; Mazzaglia, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 1057-1064.
- (50) De Sousa, F. B.; Lima, A. C.; Denadai, Â. M. L.; Anconi, C. P. A.; De Almeida, W. B.; Novato, W. T. G.; Dos Santos, H. F.; Drum, C. L.; Langer, R.; Sinisterra, R. D. *Soft Matter* **2010**, Não publicado.
- (51) De Sousa, F. B.; Denadai, Â. M. L.; Lula, I. S.; Lopes, J. F.; Dos Santos, H. F.; De Almeida, W. B.; Sinisterra, R. D. *Inter. J. Pharm.* **2008**, *353*, 160-169.
- (52) De Sousa, F. B.; Denadai, Â. M. L.; Lula, I. S.; Nascimento Jr., C. S.; Fernandes Neto, N. S. G.; Lima, A. C.; De Almeida, W. B.; Sinisterra, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8426-8436.
- (53) Denadai, Â. M. L.; Santoro, M. M.; Da Silva, L. H.; Viana, A. T.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* **2006**, *55*, 41-49.
- (54) Denadai, Â. M. L.; Santoro, M. M.; Silva, L. H. D.; Viana, A. T.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* **2006**, *55*, 41-49.
- (55) Denadai, Â. M. L.; Santoro, M. M.; Texeira, A. V.; Sinisterra, R. D. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2010**, *30*, 417-422.
- (56) Aki, H.; Niiya, T.; Iwase, Y.; Kawasaki, Y.; Kumai, K.; Kimura, T. *Thermochim. Acta* **2004**, *416*, 87-92.
- (57) Tung, J. C.; Gonzales, A. J.; Sadowsky, J. D.; O'Leary, D. J. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 126–128.
- (58) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
- (59) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.
- (60) Koopmans, C.; Ritter, H. *Macromolecules* **2008**, *41*, 7418-7422.
- (61) Ramírez, H. L.; Valdivia, A.; Cao, R.; Torres-Labandeira, J. J.; Fragoso, A.; Villalonga, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1499–1501.
- (62) Burckbuchler, V.; Wintgens, V.; Leborgne, C.; Lecomte, S.; Leygue, N.; Scherman, D.; Kichler, A.; Amiel, C. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2311–2320.
- (63) Pouliquen, G.; Amiel, C.; Tribet, C. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 5587-5595.
- (64) Sandier, A.; Brown, W.; Mays, H.; Amiel, C. *Langmuir* **2000**, *16*, 1634-1642.
- (65) Davis, M. E. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 1189-1192.

-
- (66) Layre, A.-M.; Wintgens, V.; Gosselet, N.-M.; Dalmas, F.; Amiel, C. *Eur. Polymer J.* **2009**, *45*, 3016-3026.
- (67) De Sousa, F. B.; Guerreiro, J. D. T.; Ma, M.; Anderson, D. G.; Drum, C. L.; Sinisterra, R. D.; Langer, R. J. *Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9910-9917.
- (68) Hybl, A.; Rundle, R. E.; Williams, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2779-2788.
- (69) Saenger, W.; Noltemeyer, M.; Manor, P. C.; Hingerty, B.; Klar, B. *Bioorg. Chem.* **1976**, *5*, 187-195.
- (70) Loftsson, T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 63-67.
- (71) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *Pharm. Tech. Eur.* **1997**, *9*, 26-34.
- (72) Saenger, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 344-362.
- (73) Schneider, H.-J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 3924-3977.
- (74) Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 803-822.
- (75) Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782-817.
- (76) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1918.
- (77) Harada, A.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5974-6023.
- (78) Hirayama, F.; Uekama, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *36*, 125-141.
- (79) Irie, T.; Uekama, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *36*, 101-123.
- (80) Liu, Y.; Wang, H.; Chen, Y.; Ke, C.-F.; Liu, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 657-666.
- (81) Uekama, K. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 3-7.
- (82) Rezende, B. A.; Cortes, S. F.; De Sousa, F. B.; Lula, I. S.; Schmitt, M.; Sinisterra, R. D.; Lemos, V. S. *Inter. J. Pharm.* **2009**, *367*, 133-139.
- (83) Loftsson, T.; Másson, M.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1091-1099.
- (84) Rekharsky, M.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10949-10955.
- (85) De Sousa, F. B.; Oliveira, M. F.; Lula, I. S.; Sansiviero, M. T. C.; Cortes, M. E.; Sinisterra, R. D. *Vib. Spectrosc.* **2008**, *46*, 57-62.
- (86) Renard, E.; Deratini, A.; Volet, G.; Seville, B. *Eur. Polym. J.* **1996**, *33*, 49-57.
- (87) Breslow, R.; Zhang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8495-8496.
- (88) Yue, I. C.; Poff, J.; Cortes, M. E.; Sinisterra, R. D.; Faris, C. B.; Hildgen, P.; Langer, R.; Shastri, V. *P. Biomaterials* **2004**, *25*, 3743-3750.
- (89) Domingues, Z. R.; Cortes, M. E.; Gomes, T. A.; Diniz, H. F.; Freitas, C. S.; Gomes, J. B.; Faria, A. M. C.; Sinisterra, R. D. *Biomaterials* **2004**, *25*, 327-333.
- (90) Zhang, D.; Chang, J. *Nano Letters* **2008**, *10*, 3283-3287.
- (91) Sill, T. J.; Recum, H. A. v. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1989-2006.
- (92) Greiner, A.; Wendorff, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 5670-5703.

-
- (93) Doshi, J.; Reneker, D. H. *J. Electrostatics* **1995**, *35*, 151-160.
- (94) Li, D.; Xia, Y. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1151-1170.
- (95) Zhang, W.; Sprafke, J. K.; Ma, M.; Tsui, E. Y.; Sydlík, S. A.; Rutledge, G. C.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8446–8454.
- (96) Ma, M.; Titievsky, K.; Thomas, E. L.; Rutledge, G. C. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1678-1683.
- (97) Vohra, V.; Calzaferri, G.; Destri, S.; Pasini, M.; Porzio, W.; Botta, C. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1409-1416.
- (98) Lu, X.; Wang, C.; Wei, Y. *Small* **2009**, *5*, 2349-2370.
- (99) Dong, B.; Smith, M. E.; Wnek, G. E. *Small* **2009**, *5*, 1508–1512.
- (100) Wang, M.; Vail, S. A.; Keirstead, A. E.; Marquez, M.; Gust, D.; Garcia, A. A. *Polymer* **2009**, *50*, 3974–3980.
- (101) Uyar, T.; Balan, A.; Toppare, L.; Besenbacher, F. *Polymer* **2009**, *50*, 475–480.
- (102) Kuraishi, K.; Iwata, H.; Nakano, S.; Kubota, S.; Tonami, H.; Toda, M.; Toma, N.; Matsushima, S.; Hamada, K.; Ogawa, S.; Taki, W. *J. Biomed. Mater. Res.: Part B Appl. Biomaterials* **2009**, *88B*, 230-239.
- (103) Taylor, G. *Proc. R. Soc. London. Series A, Math. Phys. Sci.* **1969**, *313*, 453-475.
- (104) Ma, M.; Krikorian, V.; Yu, J. H.; Thomas, E. L.; Rutledge, G. C. *Nano Letters* **2006**, *12*, 2969-2972.
- (105) Yoshimoto, H.; Shin, Y. M.; Terai, H.; Vacanti, J. P. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2077–2082.
- (106) Baumgarten, P. K. *Journal of Colloid and Interface Science* **1971**, *36*, 71-79.
- (107) Choi, A. T. W.; Ma, M.; Mabry, J. M.; Mazzella, S. A.; Rutledge, G. C.; McKinley, G. H.; Cohen, R. E. *Science* **2007**, *318*, 1618-1622.
- (108) Han, D.; Steckl, A. J. *Langmuir* **2009**, *25*, 9454-9462.
- (109) Ma, M.; Mao, Y.; Gupta, M.; Gleason, K. K.; Rutledge, G. C. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9742-9748.
- (110) Uyar, T.; Havelund, R.; Hacaloglu, J.; Zhou, X.; Besenbacher, F.; Kingshott, P. *Nanotechnol.* **2009**, *20*, 1-14.
- (111) Rutledge, G. C.; Fridrikh, S. V. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1384-1391.
- (112) Gu, S.-Y.; Wu, Q.-L.; Ren, J.; Vancso, G. J. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 716-720.
- (113) Evans, R. A.; Hanley, T. L.; Skidmore, M. A.; Davis, T. P.; Such, G. K.; Yee, L. H.; Ball, G. E.; Lewis, D. A. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 249-253.
- (114) Berkovic, G.; Krongauz, V.; Weiss, V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1741-1753.
- (115) Swansburg, S.; Buncel, E.; Lemieux, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6594-6600.
- (116) Elsässer, C.; Vüllings, A.; Karcher, M.; Fumagalli, P. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 19193-19198.

-
- (117) Chibisov, A. K.; Görner, H. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4305-4312.
- (118) Vlassioun, I.; Park, C.-D.; Vail, S. A.; Gust, D.; Smirnov, S. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1013-1017.
- (119) Zhu, M.-Q.; Zhu, L.; Han, J. J.; Wu, W.; Hurst, J. K.; Li, A. D. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4303-4309.
- (120) Cole, M. A.; Voelcker, N. H.; Thissen, H.; Griesser, H. J. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1827-1850.
- (121) Fischer, E.; Hirshberg, Y. *J. Chem. Soc.* **1952**, 5422-4524.
- (122) Spagnoli, S.; Block, D.; Botzung-Appert, E.; Colombier, I.; Baldeck, P. L.; Ibanez, A.; Corval, A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8587-8591.
- (123) Byrne, R.; Coleman, S.; Gallagher, S.; Diamond, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 895-1904.
- (124) Biteau, J.; Chaput, F.; Boilot, J.-P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 9024-9031.
- (125) Zhang, S.-X.; Fan, M.-G.; Liu, Y.-Y.; Ma, Y.; Zhang, G.-J.; Yao, J.-N. *Langmuir* **2007**, *23*, 9443-9446.
- (126) Grofcsik, A.; Baranyai, P.; Bitter, I.; Grün, A.; Kőszegi, É.; Kubinyi, M.; Pál, K.; Vidóczy, T. *J. Mol. Struct.* **2002**, *614*, 69-73.
- (127) Koçer, A.; Walko, M.; Meijberg, W.; Feringa, B. L. *Science* **2005**, *309*, 755-758.
- (128) Stitzel, S.; Byrne, R.; Diamond, D. *J. Mater. Sci.* **2006**, *41*, 5841-5844.
- (129) Such, G.; Evans, R. A.; Yee, L. H.; Davis, T. P. *J. Macromol. Sci., Polym. Rev.* **2003**, *C43*, 547-579.
- (130) Giordano, F.; Novak, C.; Moyano, J. R. *Thermochimica Acta* **2001**, *380*, 123-151.
- (131) Fissi, A.; Pieroni, O.; Ruggeri, G.; Ciardelli, F. *Macromolecules* **1995**, *28*, 302-309.
- (132) Raymo, F. M.; Giordani, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4651-4652.
- (133) Liu, Y.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Yang, Y.-W.; Ding, F.; Liu, S.-X.; Wu, X.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8345-8352.
- (134) Liu, Y.; Yang, Y.-W.; Yang, E.-C.; Guan, X.-D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6590-6602.
- (135) Wu, S.; Luo, Y.; Zeng, F.; Chen, J.; Chen, Y.; Tong, Z. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7015-7018.
- (136) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 7^a ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Danvers, 2005.
- (137) Wartewig, S.; Neubert, R. H. H. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, *57*, 1144-1170.
- (138) Stancanelli, R.; Crupi, V.; De Luca, L.; Ficarra, P.; Ficarra, R.; Gitto, R.; Guardo, M.; Iraci, N.; Majolino, D.; Tommasini, S.; Venuti, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8706-8712.
- (139) Grdadolnik, J. *Acta Chim. Slov.* **2002**, *49*, 631-642.

-
- (140) Andrushchenko, V. V.; Vogel, H. J.; Prenner, E. J. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2006**, *1758*, 1596-1608.
- (141) Byler, D. M.; Susi, H. *Biopolymers* **1986**, *25*, 469-487.
- (142) Dong, A.; Matsuura, J.; Allison, S. D.; Chrisman, E.; Manning, M. C.; Carpenter, J. F. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1450-1457.
- (143) Haris, P. I.; Chapman, D. *Biopolymers* **1995**, *37*, 251-263.
- (144) Navea, S.; Tauler, R.; Juan, A. d. *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 231-242.
- (145) Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 622-630.
- (146) Zetasizer Nano Series User Manual; Malvern: Worcestershire, 2003.
- (147) Sun, W.; Mao, S.; Mei, D.; Kissel, T. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 417-425.
- (148) Choi, J.-K.; Girek, T.; Shin, D.-H.; Lim, S.-T. *Carbohydr. Polymers* **2002**, *49*, 289-296.
- (149) Jiang, P.; McFarland, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13778-13786.
- (150) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755-1785.
- (151) Wüthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 715-740.
- (152) Wüthrich, K.; Wider, G.; Wagner, G.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 311-319.
- (153) Denadai, Â. M. L.; Teixeira, K. I.; Santoro, M. M.; Pimenta, A. M. C.; Cortes, M. E.; Sinisterra, R. D. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2286-2296.
- (154) Loftsson, T.; Olafsdottir, B. J.; Friethriksdottir, H.; Jonsdottir, S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1993**, *1*, 95-101.
- (155) Uccello-Barretta, G.; Balzano, F.; Paolino, D.; Ciaccio, R.; Guccione, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 6502-6512.
- (156) Jullian, C.; Miranda, S.; Zapata-Torres, G.; Mendizabal, F.; Olea-Azar, C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 3217-3224.
- (157) Guerrero-Martínez, A.; González-Gaitano, G.; Viñas, M. H.; Tardajos, G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13819-13828.
- (158) Guerrero-Martínez, A.; González-Gaitano, G.; Viñas, M. H.; Tardajos, G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13819-13828.
- (159) Ohta, A.; Toda, K.; Morimoto, Y.; Asakawa, T.; Miyagishi, S. *Colloids and Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *317*, 316-322.
- (160) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859-14866.
- (161) De, M.; You, C.-C.; Srivastava, S.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10747-10753.
- (162) Rekharsky, M.; Inoue, Y.; Metzger, S. T.; Anslyn, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *126*, 14959-14967.

-
- (163) Rekharsky, M. V.; Goldberg, R. N.; Schwarz, F. P.; Tewari, Y. B.; Ross, P. D.; Yamashoji, Y.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8830-8840.
- (164) Barth, A. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073–1101.
- (165) Hollósi, M.; Majer, Z.; Rónai, A. Z.; Magyar, A.; Medzihradzsky, K.; Holly, S.; Perczel, A.; Fasman, G. D. *Biopolymers* **1994**, *34*, 177-185.
- (166) Mantsch, H. H.; Perczel, A.; Hollósi, M.; Fasman, G. D. *Biopolymers* **1993**, *33*, 201-207.
- (167) Choi, Y. Y.; Jang, J. H.; Park, M. H.; Choi, B. G.; Chi, B.; Jeong, B. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 3416–3421.
- (168) Greenfield, N. J.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.
- (169) Reed, J.; Reed, T. A. *Anal. Biochem.* **1997**, *254*, 36-40.
- (170) Brahm, S.; Brahm, J. *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 149-178.
- (171) Pelton, J. T.; McLean, L. R. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167–176.
- (172) Nascimento Jr., C. S.; Anconi, C. P. A.; Santos, H. F. D.; Almeida, W. B. D. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3209-3219.
- (173) Nostro, P. L.; Giustini, L.; Fratini, E.; Ninham, B. W.; Ridi, F.; Baglioni†, P. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1071-1081.
- (174) Bonnet, P.; Jaime, C.; Morin-Allory, L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 689-692.
- (175) Bonnet, P.; Jaime, C.; Morin-Allory, L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8602–8609.
- (176) Alexandridis, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A. *Macromolecules* **1994**, *27*, 2414-2425.
- (177) Yang, C.; Li, J. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 682-690.
- (178) Gaitano, G. G.; Brown, W.; Tardajos, G. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 710-719.
- (179) Riske, K. A.; Politi, M. J.; Reed, W. F.; Lamy-Freund, M. T. *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *89*, 31-44.
- (180) HadjSadok, A.; Pitkowski, A.; Nicolai, T.; Benyahia, L.; Moulai-Mostefa, N. *Food Hydrocolloids* **2008**, *22*, 1460-1466.
- (181) Anconi, C. P. A.; Nascimento Jr., C. S.; De Almeida, W. B.; Dos Santos, H. F. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9762-9769
- (182) Miyawaki, A.; Kuad, P.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17062–17069.
- (183) Zhang, C.; Shen, X.; Gao, H. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *363*, 515-522.
- (184) Aki, H.; Niiya, T.; Iwase, Y.; Goto, M.; Kimura, T. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2004**, *77*, 423-435.
- (185) Wenz, G. *J. Polym. Sci. A* **2009**, *47*, 6333-6341.
- (186) Miyauchi, M.; Hoshino, T.; Yamaguchi, H.; Kamitori, S.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2034–2035.

-
- (187) Kamitori, S.; Matsuzaka, O.; Kondo, S.; Muraoka, S.; Okuyama, K.; Noguchi, K.; Okada, M.; Harada, A. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1500-1502.
- (188) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Macromolecules* **1993**, *26*, 5698-5703.
- (189) Harada, A.; Li, J.; Suzuki, S.; Kamachi, M. *Macromolecules* **1993**, *26*, 5267-5268.
- (190) Gratton, S. E. A.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11613-11618.
- (191) Champion, J. A.; Mitragotri, S. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4930-4934.
- (192) Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D. E. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249-255.
- (193) Mitragotri, S. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 232-234.
- (194) Aki, H.; Sawai, N.; Yamamoto, K.; Yamamoto, M. *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 119-112.
- (195) Keum, S.-R.; Choi, H.-J. R. Y.-K.; Lim, S.-S.; Kim, S.-H.; Koh, K. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 873-876.
- (196) Liu, Y.; Chen, Y.; Bin Li; Wada, T.; Inoue, Y. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2528-2535.
- (197) Bouas-Laurent, H.; Dürr, H. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 639-665.
- (198) Tanaka, T.; Nagao, S.; Ogawa, H. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, i1081-i1084.
- (199) Egyed, O. *Vib. Spectrosc.* **1990**, *1*, 225-227.
- (200) Uznanski, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 1919-1922.
- (201) Bulanov, A. O.; Popov, L. D.; Shcherbakov, I. N.; Kogan, V. A.; Barachevsky, V. A.; Lukov, V. V.; Borisenko, S. N.; Tkachenko, Y. N. *Spectrochim. Acta Part A* **2008**, *71*, 1146-1152.
- (202) Fries, K. H.; Driskell, J. D.; Samanta, S.; Locklin, J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3306-3314.
- (203) Wang, G.; Yan, D. *J. Appl. Poly. Sci.* **2001**, *82*, 2381-2386.
- (204) García, D. M.; Escobar, J. L.; Bada, N.; Casquero, J.; Hernández, E.; Katime, I. *Eur. Poly. J.* **2004**, *40*, 1637-1643.
- (205) Coleman, S.; Byrne, R.; Minkovska, S.; Diamond, D. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15589-15596.
- (206) Hamada, F.; Hoshi, K.; Higuchi, Y.; Murai, K.; Akagami, Y.; Ueno, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, *12*, 2567-2570.
- (207) Zhu, L.; Khairutdinov, R. F.; Cape, J. L.; Hurst, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 825-835.
- (208) Levy, D.; Avnir, D. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 4734-4738.
- (209) Meechaisue, C.; Dubin, R.; Supaphol, P.; Hoven, V. P.; Kohn, J. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2006**, *17*, 1039-1056.
- (210) Rosario, R.; Gust, D.; Hayes, M.; Jahnke, F.; Springer, J.; Garcia, A. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 8062-8069.
- (211) Ichimura, K.; Oh, S.-K.; Nakagawa, M. *Science* **2000**, *288*, 1624-1626.

-
- (212) Higuchi, A.; Hamamura, A.; Shindo, Y.; Kitamura, H.; Yoon, B. O.; Mori, T.; Uyama, T.; Umezawa, A. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1770-1774.
- (213) Huang, C.-F.; Chang, F.-C. *Polymer* **2003**, *44*, 2965–2974.
- (214) Edahiro, J.-i.; Sumaru, K.; Tada, Y.; Ohi, K.; Takagi, T.; Kameda, M.; Shinbo, T.; Kanamori, T.; Yoshimi, Y. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 970–974.
- (215) Stevens, M. M.; George, J. H. *Science* **2005**, *310*, 1135 - 1138.
- (216) Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. *Polymer* **2008**, *49*, 5603-5621.