

José Manuel Costa Dias

# Promoção da solubilidade de cromonas recorrendo ao uso de ciclodextrinas



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de  
Mestre em Química*

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
SETEMBRO/2012

José Manuel Costa Dias

# Promoção da solubilidade de cromonas recorrendo ao uso de ciclodextrinas



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de  
Mestre em Química*

## **Júri:**

Prof. Doutor Alexandre Magalhães  
Prof. Doutor Manuel Monte  
Prof. Doutora Maria Fernanda Borges  
Prof. Doutora Maria João Sottomayor

**Sob a orientação de:**  
  
Prof. Doutor Jorge Garrido  
Prof. Doutora Maria João Sottomayor

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
SETEMBRO/2012

## Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Jorge Garrido e à Prof. Doutora Maria João Sottomayor vão os meus maiores agradecimentos pela oportunidade, pelo incentivo e pela boa relação mantida. Um enorme obrigado por tudo.

À Prof. Doutora Fernanda Borges um longo e sentido obrigado por me ter aberto as portas da área e por todo o conhecimento transmitido.

À Alexandra um agradecimento especial pelos ensinamentos que me proporcionou dentro do laboratório e que em muito me enriqueceram.

A todos os meus colegas de laboratório, em ambas as Faculdades, um sincero obrigado pelo convívio e por me terem recebido de braços abertos.

Aos meus amigos dos diversos círculos dos quais faço parte, um muito obrigado pela amizade demonstrada em todos os momentos.

À minha família, agradeço o apoio incondicional ao longo de toda a minha vida.

Finalmente, agradeço aos meus pais pelo amor, carinho e dedicação com que me brindaram ao longo dos anos e pelos sacrifícios que passaram para que eu chegasse até aqui. Devo-vos tudo.

## Resumo

As cromonas são compostos que contêm um núcleo benzopirânico, aos quais foi atribuída uma notória importância enquanto potenciais inibidores da enzima monoaminoxidase (MAO). A possibilidade de uma inibição eficaz desta enzima pode desbloquear uma nova metodologia de tratamento ou abrir as portas para a descoberta de uma cura para algumas doenças neurodegenerativas, nomeadamente a Doença de Parkinson. No entanto a sua reduzida solubilidade em meio aquoso inviabilizava a sua maior utilização em estudos biológicos.

Com base nestes conhecimentos, foram planeadas e estabelecidas as vias sintéticas adequadas à obtenção de compostos derivados de cromonas (N-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4H-benzopiran-2-carboxamida, N-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-oxo-4H-benzopiran-2-carboxamida e N-(4-metoxifenil)-4-oxo-4H-benzopiran-2-carboxamida). Estes foram obtidos através de uma reação de amidação entre cromonas funcionalizadas de um ácido carboxílico em C2 e a anilina com o padrão de substituição pretendido para o composto final. O método sintético escolhido envolveu a ativação por micro-ondas mas também um outro processo de síntese que consistia numa ativação prévia dos ácidos carboxílicos de cromonas através de reagentes de acoplamento, como o BOP ou PyBOP. Depois de obtidos a intenção passava por experimentar uma metodologia capaz de fazer aumentar a sua solubilidade.

A ideia centrou-se na utilização de um derivado da  $\beta$ -ciclodextrina (2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), composto obtido por degradação do amido, extremamente solúvel em água e com uma estrutura em forma de cone que permite incorporar moléculas hóspedes no seu interior. Os estudos efetuados conduziram a um aumento significativo da solubilidade dos compostos em estudo tendo-se obtido constantes de estabilidade que variaram entre 40 e 646 M<sup>-1</sup> para as amidas de cromonas testadas.

Os complexos cromona/ciclodextrina foram sintetizados e analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup>H) e por Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC), o que permitiu concluir que a encapsulação das cromonas no interior da ciclodextrina foi bem-sucedida.

**Palavras Chave:** cromona, ciclodextrina, solubilidade, complexo de inclusão.

## Abstract

Chromones are compounds which contain a benzopyran nucleus, to which is assigned a remarkable importance as potential inhibitors of the enzyme monoamine oxidase (MAO). The possibility of effective inhibition of this enzyme can unlock a new method of treatment as well as opening the door to find a cure for some neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease. However its low solubility in aqueous mean precluded their wider use in biological studies.

Based on this fact, suitable synthetic routes have been planned and established to obtaining compounds derived from chromones (N-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-benzopyran-2-carboxamide, N-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-benzopyran-2-carboxamide and N-(4 - methoxyphenyl)-4-oxo-4H-benzopyran-2-carboxamide). These were obtained via an amidation reaction between functionalized chromones of a carboxylic acid at C2 position and an aniline with the substitution pattern desired for the final compound. The synthetic methods chosen involved an activation by microwaves but also another synthetic procedure that consisted of a prior activation of the carboxylic acids of chromones using coupling reagents such as BOP or PyBOP. After obtaining the desired compounds, the intention was to develop a methodology able to increase their solubility.

The idea focused on the use of a  $\beta$ -cyclodextrin derivative (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin), a compound obtained from the starch degradation, extremely soluble in water and with a cone-shaped structure allowing the incorporation of guest molecules. The studies carried out led to a significant increase in the solubility of the compounds and equilibrium stability constants (K) between 40 and 646 M<sup>-1</sup> were obtained for the chromone amides tested.

The chromone/cyclodextrin complexes were synthesized and analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (<sup>1</sup>H NMR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), which allowed to conclude that the desirable encapsulation of chromones within the cyclodextrin cavity was successful.

**Key Words:** chromone, cyclodextrin, solubility, inclusion complex.

# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice.....	vi
Abreviaturas.....	xiv
Símbolos.....	xv
Objetivo da Dissertação.....	xvii
1 - Introdução.....	1
1.1 - Cromonas, importância e estrutura.....	1
1.2 - Monoaminoxidase (MAO).....	2
1.3 - Doença de Parkinson.....	3
1.4 - Pró-fármacos.....	3
1.5 - Ciclodextrinas e suas propriedades.....	4
1.6 - Complexos de Inclusão.....	5
1.7 - Métodos de preparação de complexos de inclusão e aplicações.....	7
2 - Contextualização no trabalho.....	8
2.1 - Cromonas escolhidas para o trabalho.....	8
2.2 - Métodos de síntese de cromonas.....	10
2.2.1 - Método de Baker-Ventkatamaran.....	10
2.2.2 - Método de Kostanecki-Robinson.....	10
2.2.3 - Método via ácido de Meldrum.....	11
2.2.4 - Método de adição intramolecular de Michael.....	11
2.3 - Amidas de cromonas.....	12

3 - Parte Experimental.....	14
3.1 - Síntese de Cromonas.....	14
3.1.1 - Instrumentação.....	14
3.1.2 - Reagentes e Solventes.....	15
3.1.3 - Síntese de cromonas.....	15
3.1.3.1 - Síntese da <i>N</i> -(4-hidroxifenil)-4-oxo-4 <i>H</i> -benzopiran-2-carboxamida a frio (0 °C) (A1).....	15
3.1.3.2 - Síntese da <i>N</i> -(4-hidroxifenil)-4-oxo-4 <i>H</i> -benzopiran-2-carboxamida à temperatura ambiente (25 °C ) (A1).....	16
3.1.3.3 - Síntese da <i>N</i> -(4-hidroxifenil)-4-oxo-4 <i>H</i> -benzopiran-2-carboxamida a quente (50 °C) (A1).....	17
3.1.3.4 - Síntese da <i>N</i> -(4-hidroxifenil)-4-oxo-4 <i>H</i> -benzopiran-2-carboxamida em micro-ondas (A1).....	18
3.1.3.5 - Síntese da <i>N</i> -(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-oxo-4 <i>H</i> -benzopiran-2-carboxamida em microondas (A2).....	19
3.1.3.6 - Síntese da <i>N</i> -(4-metoxifenil)-4-oxo-4 <i>H</i> -benzopiran-2-carboxamida em microondas (A3).....	20
3.1.4 - Elucidação Estrutural dos compostos sintetizados.....	21
3.2 - Estudos de Complexação.....	22
3.2.1 - Instrumentação.....	24
3.2.2 - Soluções.....	24
3.2.3 - Reagentes e Solventes.....	25
3.2.4 - Estudos Prévios.....	25
3.2.5 - Estudos de complexação.....	30
3.3 - Síntese dos Complexos Cromona/HP- $\beta$ -CD.....	38
3.3.1 - Instrumentação.....	39
3.3.2 - Reagentes e Solventes.....	39

3.3.3 - Preparação dos Complexos.....	39
3.3.3.1 - Síntese do complexo [Composto A1/HP-β-CD].....	40
3.3.3.2 - Síntese do complexo [Composto A2/HP-β-CD].....	41
3.3.3.3 - Síntese do complexo [Composto A3/HP-β-CD].....	43
3.4 - Titulação de RMN para o complexo [A1/HP-β-CD].....	44
3.4.1 - Instrumentação.....	44
3.4.2 - Soluções.....	45
3.4.3 - Titulação.....	45
3.5 - Calorimetria Diferencial de Varrimento.....	47
3.5.1 - Instrumentação.....	48
3.5.2 - Experiências de DSC.....	48
4- Conclusão.....	52
5 - Perspetivas Futuras.....	53
6 - Bibliografia.....	54

# Índice de Figuras

Figura 1.1 – Estrutura e numeração da cromona segundo a IUPAC.....	1
Figura 1.2 – Relação entre a estrutura da cromona e as estruturas da flavona e isoflavona.....	1
Figura 1.3 – Comparação da MAO-A de rato com a MAO-B humana.....	2
Figura 1.4 – Estruturas da $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -CD respetivamente.....	4
Figura 1.5 – Representação da inclusão de uma molécula hóspede na cavidade de uma CD.....	5
Figura 2.1 – Reagentes de fósforo e sua estrutura, BOP e PyBOP.....	8
Figura 2.2 – Estrutura química do Composto A.....	8
Figura 2.3 – Estrutura base e numeração das amidas sintetizadas.....	9
Figura 2.4 – Estruturas químicas das amidas de cromona sintetizadas.....	13
Figura 3.1 – Espetro de RMN $^1\text{H}$ obtido na síntese do Composto A1 a 0 °C.....	15
Figura 3.2 – Espetro de RMN $^1\text{H}$ obtido para a síntese do Composto A1 a 25 °C.....	16
Figura 3.3 – Espetro de RMN $^1\text{H}$ obtido para a síntese do Composto A1 a 50 °C.....	17
Figura 3.4 – Espetro de RMN $^1\text{H}$ obtido na síntese do Composto A1 por micro-ondas.....	18
Figura 3.5 – Espetro de RMN $^1\text{H}$ obtido na síntese do Composto A2 por micro-ondas.....	20
Figura 3.6 – Espetro de RMN $^1\text{H}$ obtido na síntese do Composto A3 por micro-ondas.....	21
Figura 3.7 – Estrutura da HP- $\beta$ -CD.....	23
Figura 3.8 – Respostas tipo do método de Higuchi e Connors.....	23
Figura 3.9 – Estudos prévios.....	26
Figura 3.10 - Reta de calibração do Composto A1 em 0,5% de etano/água.....	27
Figura 3.11 - Reta de calibração do Composto A1 em 10% de etano/tampão fosfato.....	27
Figura 3.12 - Reta de calibração do Composto A1 em 1% de DMSO/tampão fosfato.....	27
Figura 3.13 - Reta de calibração do Composto A1 em 0,5% de DMSO/água.....	28
Figura 3.14 - Reta de calibração do Composto A2 em 1% de DMSO/tampão fosfato.....	28

Figura 3.15 - Retas de calibração do Composto A2 em 1% de DMSO/água.....	28
Figura 3.16 - Retas de calibração do Composto A3 em 5% de etanol/água.....	29
Figura 3.17 - Retas de calibração do Composto A3 em 10% de etanol/tampão fosfato.....	29
Figura 3.18 - Retas de calibração do Composto A3 em 10% de DMSO/tampão fosfato.....	29
Figura 3.19 - Retas de calibração do Composto A3 em 1% de DMSO/água.....	30
Figura 3.20 – Estudo temporal da complexação do Composto A1/HP-β-CD em etanol/água.....	31
Figura 3.21 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP-β-CD em etanol/água.....	31
Figura 3.22 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP-β-CD em etanol/tampão fosfato....	32
Figura 3.23 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP-β-CD em DMSO/tampão fosfato...32	
Figura 3.24 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP-β-CD em DMSO/água.....	33
Figura 3.25 - Estudo da solubilidade do Composto A2 em HP-β-CD em DMSO/tampão fosfato...34	
Figura 3.26 - Estudo da solubilidade do Composto A2 em HP-β-CD em DMSO/água.....	34
Figura 3.27 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD em etanol/água.....	35
Figura 3.28 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD em etanol/tampão fosfato....36	
Figura 3.29 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD em DMSO/tampão fosfato...36	
Figura 3.30 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD em DMSO/água.....	37
Figura 3.31 – Estrutura e numeração da HP-β-CD.....	39
Figura 3.32 – Espetro de RMN <sup>1</sup> H da mistura de solventes (50% DMSO/50% D <sub>2</sub> O).....	40
Figura 3.33 – Espetros RMN <sup>1</sup> H relativos à complexação do Composto A1.....	41
Figura 3.34 – Espetros RMN <sup>1</sup> H relativos à complexação do Composto A2.....	42
Figura 3.35 – Espetros RMN <sup>1</sup> H relativos à complexação do Composto A3.....	43
Figura 3.36 – Resultados para a titulação de RMN <sup>1</sup> H.....	46
Figura 3.37 – Sobreposição dos termogramas do Composto A1.....	49
Figura 3.38 – Sobreposição dos termogramas do Composto A2.....	50
Figura 3.39 – Sobreposição dos termogramas do Composto A3.....	51

# Índice de Esquemas

Esquema 2.1 – Método de Baker-Ventkatamaran.....	10
Esquema 2.2 – Método de Kostanecki-Robinson.....	11
Esquema 2.3 – Síntese via ácido de Meldrum.....	11
Esquema 2.4 – Adição intramolecular de Michael.....	11
Esquema 2.5 – Reações de obtenção de amidas de cromona.....	12
Esquema 2.6 – Síntese de amidas através do uso de agentes de acoplamento de fósforo.....	13

# Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Propriedades físicas das ciclodextrinas.....	5
Tabela 3.1 – Rendimentos obtidos na síntese do Composto A1 em diferentes métodos.....	19
Tabela 3.2 – Resultados de RMN <sup>1</sup> H para os Compostos A1, A2 e A3.....	22
Tabela 3.3 – Ensaio prévios do Composto A1 a partir de uma solução-mãe de 10 <sup>-4</sup> M.....	25
Tabela 3.4 - Quantidades de cromona e de HP-β-CD utilizadas nos ensaios de complexação....	30
Tabela 3.5 – Constantes de estabilidade obtidas e respetivas percentagens de solvente.....	38
Tabela 3.6 – Desvios químicos associados à complexação do Composto A1.....	41
Tabela 3.7 – Desvios químicos associados à complexação do Composto A2.....	42
Tabela 3.8 – Desvio químicos associados à complexação do Composto A3.....	43
Tabela 3.9 – Concentrações para a Titulação de RMN <sup>1</sup> H.....	45
Tabela 3.10 – Desvios químicos associados à titulação do Composto A1 e HP-β-CD.....	46
Tabela 3.11 – Temperaturas de Fusão para os Compostos A1, A2 e A3.....	49

## Abreviaturas

<b>B-CD</b>	β-ciclodextrina
<b>BOP</b>	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino) fosfónio
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCF</b>	Cromatografia em camada fina
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Água deuterada
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DIPEA</b>	Diisopropiletilamina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DSC</b>	Calorimetria Diferencial de Varrimento
<b>HP-β-CD</b>	(2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”
<b>MAO</b>	Monoaminoxidase
<b>PyBOP</b>	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (oxitripirrolidino) fosfónio
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vis</b>	Visível

# Símbolos

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>μS</b>	Microsiemens
<b>λ</b>	Comprimento de onda
<b>δ</b>	Desvio químico
<b>Φ</b>	Fluxo
<b>cm</b>	Centímetro
<b>d</b>	Dupleto
<b>dd</b>	Duplo dupleto
<b>ddd</b>	Duplo duplo dupleto
<b>g</b>	Gramma
<b>h</b>	Hora
<b>Hz</b>	Hertz
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>K</b>	Constante de estabilidade
<b>L</b>	Litro
<b>m</b>	Multiplete
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramma
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar

**mW** MiliWatt

**nm** Nanómetro

**ppm** Partes por milhão

**s** Singleto

## Objetivo da Dissertação

O objetivo do presente trabalho consiste na síntese de cromonas substituídas na posição C2 e da promoção da sua solubilidade através da encapsulação em ciclodextrinas. Para atingir esta meta serão realizados ensaios de complexação, as respetivas sínteses dos complexos e a análise e caracterização dos mesmos por Ressonância Magnética Nuclear e Calorimetria Diferencial de Varredura.

# 1 - Introdução

## 1.1 – Cromonas, importância e estrutura

As cromonas constituem um conjunto importante de substâncias biologicamente ativas, maioritariamente de origem natural, estando presentes em grande abundância no reino vegetal<sup>1</sup>. São compostos heterocíclicos que de um ponto de vista químico consistem na fusão de um anel benzénico com um anel de pirona. O composto mais simples desta família é a própria cromona (4*H*-cromen-4-ona, 4*H*-1-benzopiran-4-ona), que segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) se numera de acordo com o representado na figura 1.1<sup>2</sup>.

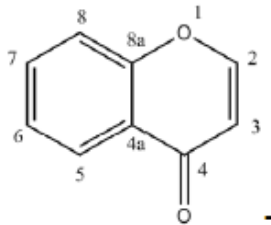


Figura 1.1 – Estrutura e numeração da cromona segundo a IUPAC.

As cromonas naturais mais abundantes são aquelas que possuem substituintes nas posições C2 e C3 por outro anel benzénico, sendo designadas por flavonas e isoflavonas respetivamente, e por esse motivo é recorrente a sua inclusão no grupo dos flavonóides<sup>3</sup> (Figura 1.2).

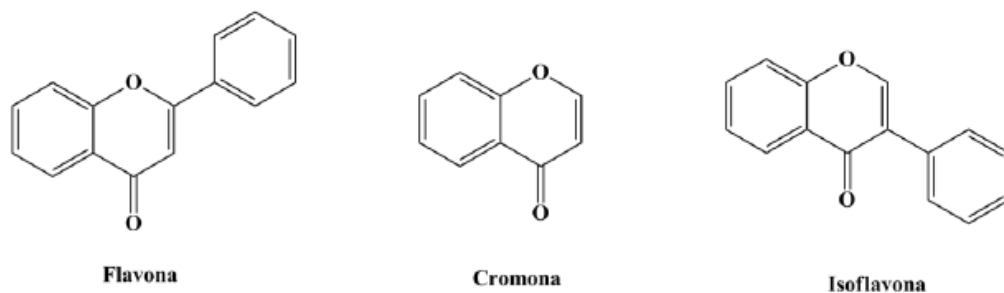


Figura 1.2 – Relação entre a estrutura da cromona e as estruturas da flavona e isoflavona.

Recentemente, esta família de compostos foi associada a inúmeros efeitos biológicos, nomeadamente atividades antitumoral, antioxidante, antiviral, antifúngica e antialérgica, propriedades que apresentam um elevado interesse para o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos inovadores<sup>4</sup>. A estes compostos foi ainda reconhecida a capacidade de inibição a algumas enzimas, tais como oxidoredutases, tirosinases e lipoxigenases<sup>5-7</sup>.

Hoje em dia, o principal objetivo na utilização de cromonas está associado ao desenvolvimento de novos compostos derivados uma vez que alguns ácidos carboxílicos de cromonas foram associados à inibição da monoaminoxidase (MAO). Estes estudos indicaram uma associação entre a atividade enzimática e a localização da função ácido carboxílico no núcleo da pirona bem como a possibilidade da função -CONH- envolver-se numa ponte de hidrogénio<sup>8</sup>. Deste modo, um estudo mais intensivo deste aspeto poderá permitir a síntese de novos compostos até à obtenção de um candidato ideal que potencie ao máximo a inibição desta enzima e desta forma evitar a ocorrência de processos que conduzem à degeneração do Sistema Nervoso Central (SNC).

## 1.2 – Monoaminoxidase (MAO)

A MAO é uma das enzimas responsável pela catálise *in vivo* da reação de desaminação oxidativa de monoaminas biológicas (Equação 1.1).



Equação 1.1

Esta enzima é essencial no processo de inativação *in vivo* de aminas biogénicas, tanto no SNC como em neurónios e tecidos periféricos, e são-lhe conhecidas duas isoformas (Figura 1.3) cuja distinção é baseada na interação com inibidores específicos e na sua preferência pelo substrato<sup>9-10</sup>.

- MAO-A, seletiva e irreversivelmente inibida por pequenas concentrações de clorgilina.
- MAO-B, inibida seletivamente pela rasagilina.

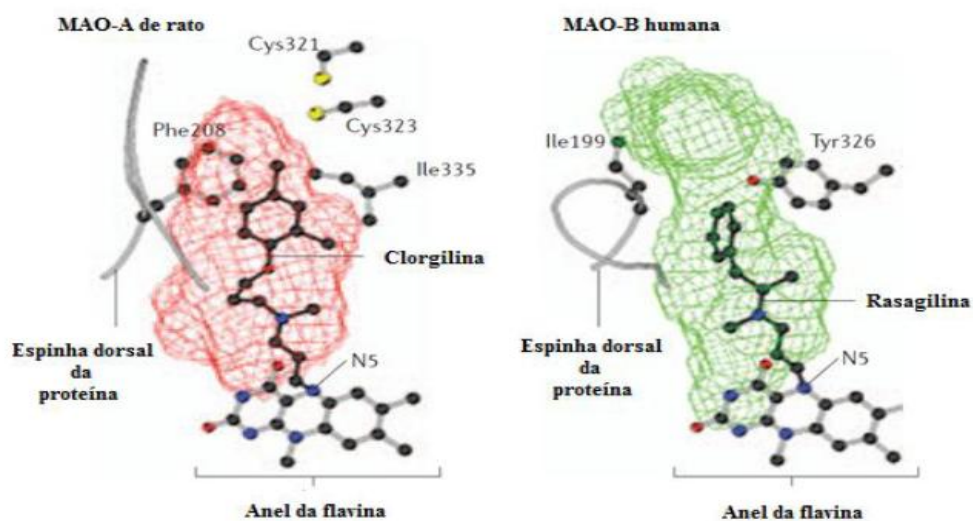


Figura 1.3 – Comparação da MAO-A de rato com a MAO-B humana<sup>11</sup>.

De acordo com alguns estudos prévios, constatou-se que a atividade da MAO-B no SNC aumenta com a idade<sup>12</sup>, e que simultaneamente se tem verificado um aumento da sua atividade no diagnóstico positivo de algumas doenças, nomeadamente na doença de Parkinson<sup>13</sup>.

### 1.3 – Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) e seus sintomas foram enunciados pela primeira vez por James Parkinson, médico inglês, em 1871<sup>14</sup>. Esta doença neurodegenerativa cujos primeiros sinais se fazem sentir por tremores e problemas de locomoção, afeta aproximadamente 2% da população com idade superior a 65 anos<sup>15</sup>. Deste modo, estima-se que em Portugal cerca de vinte mil pessoas sofram de sintomas de DP.

Os portadores deste síndrome apresentam uma destruição em cerca de 80% do número de neurónios<sup>16</sup>, e para se ter uma ideia geral, um estudo de 1994 revelou que existe uma prevalência de 1,3 em 1000 para o sexo feminino e de 1,4 em 1000 para indivíduos do sexo masculino. Mais ainda, o estudo revela que acima dos 70 anos de idade, esta prevalência aumenta significativamente para cerca de 7 em 1000 indivíduos<sup>17</sup>, números preocupantes para uma população mundial cada vez mais envelhecida.

Nos dias de hoje, todos os tratamentos conhecidos para a DP têm como objetivo o alívio de alguns sintomas e o abrandamento da propagação da doença, pelo que o reconhecimento da não existência de uma terapia eficaz conduz à necessidade de mais investigação, bem como ao desenvolvimento de mais pró-fármacos numa tentativa de encontrar um novo composto que possa ser utilizado para o tratamento desta doença.

### 1.4 – Pró-fármacos

O termo pró-fármaco foi introduzido em 1958 e aplica-se a um composto biologicamente inativo que *in vivo* se converte num fármaco ativo, através de uma transformação química que tem lugar no interior do organismo de forma a tentar suprir as limitações farmacológicas e farmacocinéticas que o composto apresentava<sup>18</sup>. De uma forma resumida podemos dizer que os pró-fármacos se destinam a melhorar os seguintes inconvenientes:

- Aumentar a durabilidade de ação do fármaco;
- Promover a sua libertação controlada no local desejado;
- Diminuir a sua toxicidade;
- Facilitar a sua absorção e distribuição;
- Eliminar eventuais problemas de formulação.

Para além destes aspetos, é necessário ter em conta a eventual toxicidade do grupo transportador do pró-fármaco, bem como assegurar que os mecanismos necessários para a sua bioativação se encontrem disponíveis no organismo.

O facto de se ter associado propriedades de inibição da MAO-B às cromonas<sup>8</sup>, abre as portas à possibilidade de desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos baseados nesta família de compostos. No entanto, para potenciar a sua utilização no futuro é necessário ultrapassar algumas barreiras existentes, nomeadamente a fraca solubilidade da maioria das cromonas em meio aquoso, para que seja possível realizar estudos de atividade biológica.

## 1.5 – Ciclodextrinas e suas propriedades

Um dos campos mais recentes e promissores a ser explorado na tentativa de superar a pouca solubilidade de alguns compostos é através do uso de ciclodextrinas. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacáridos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas alfa (1,4), obtidos a partir da degradação enzimática do amido. Estas estruturas em forma de cone podem ter uma ciclização de seis, sete ou oito unidades de glicose, originando respetivamente a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD (Figura 1.4)<sup>19</sup>. A primeira referência às ciclodextrinas data de 1891 quando Villiers conseguiu obter uma porção de composto cristalino a partir do amido da batata<sup>20</sup>. Ao longo dos anos seguintes, Schardinger isolou uma a uma as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs e com a passagem do tempo as suas estruturas foram solucionadas e conhecidas<sup>20-23</sup>.

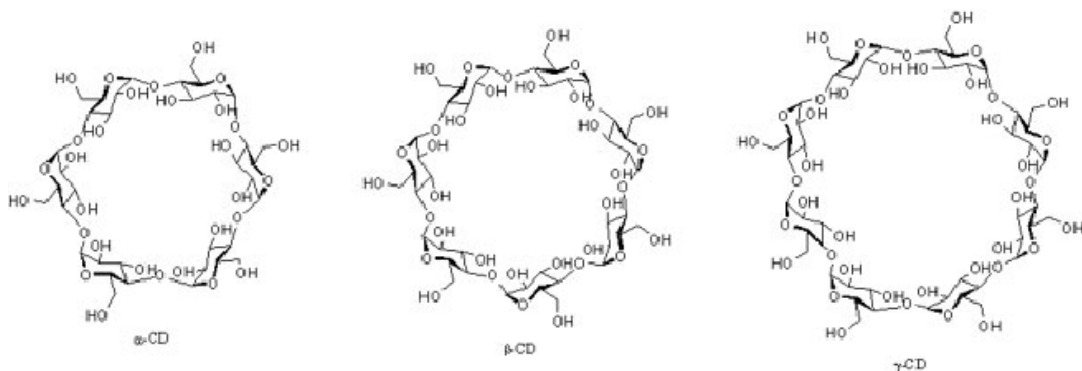


Figura 1.4 – Estruturas da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD respetivamente<sup>24</sup>.

A sua forma única contendo uma cavidade interior hidrofóbica permite a incorporação de moléculas hóspedes e a formação de complexos não covalentes<sup>20-22</sup>. De acordo com o tamanho do grupo de inclusão, é possível optar pela CD que em tamanho melhor poderá acomodar os compostos pretendidos. As principais características de cada uma delas encontram-se resumidas na Tabela 1.1:

Tabela 1.1 – Propriedades físicas das ciclodextrinas<sup>25</sup>.

Propriedades	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de Glicose	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/100mL) 25°C	14,5	18,6	23,2
Diâmetro Interno (Å)	4,9	6,2	7,9
Diâmetro Externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Altura do Cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da Cavidade (Å <sup>3</sup> )	176	346	510

Como podemos verificar, com o aumento do número de unidades de glicose verifica-se um aumento da solubilidade, dos diâmetros e do volume. Ainda assim, e apesar de não ser a mais solúvel, a  $\beta$ -CD é a mais utilizada em estudos de encapsulamento por ser mais acessível e mais económica<sup>20</sup>. Várias outras CDs têm sido sintetizadas partindo das de origem natural<sup>26</sup>, sendo as mais comuns as  $\beta$ -CDs substituídas. Como exemplo temos a (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina, uma variante da  $\beta$ -CD, constituída por sete monómeros iguais, que foi a escolhida para dar seguimento ao trabalho por apresentar um tamanho de cavidade interior adequado à incorporação de compostos heterocíclicos.

## 1.6 – Complexos de Inclusão

As ciclodextrinas têm a capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos, sejam eles líquidos, sólidos ou até mesmo gasosos<sup>20</sup>. Para além do anteriormente citado no que diz respeito ao tamanho da molécula hóspede, outro aspeto importante na escolha da CD mais conveniente prende-se com os eventuais grupos funcionais que a molécula hóspede possui, uma vez que é necessário que haja interação entre o composto e a cavidade da CD para que existam condições favoráveis à formação do complexo pretendido<sup>20</sup>.

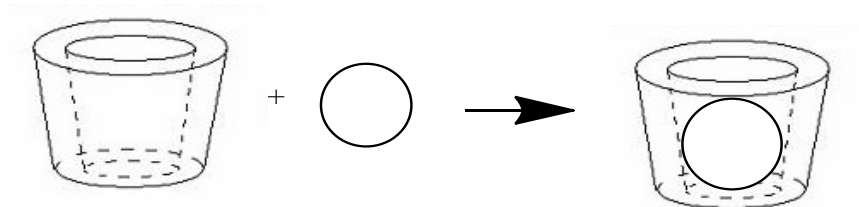


Figura 1.5 – Representação da inclusão de uma molécula hóspede na cavidade de uma CD.

De acordo com alguns investigadores, as moléculas de água presentes no interior da cavidade da CD não são suficientes para satisfazer todas as pontes de hidrogénio que a parte interior da CD pode efetuar e como tal acabam por ser libertadas com uma entalpia elevada, fenómeno que vai

facilitar a eventual complexação com a molécula hóspede e dessa forma também contribuir para uma maior estabilidade da CD<sup>20-22</sup>. Estes complexos podem ser formados no estado cristalino ou em solução, sendo a água o principal solvente utilizado. No entanto, caso a solubilidade da molécula hóspede neste solvente seja muito baixa, pode ser necessária a presença de um outro co-solvente, ou até mesmo a presença de um solvente orgânico,. Neste caso é preciso ter em atenção que o solvente adicionado possa ser facilmente removido por evaporação e que não possa complexar ele mesmo com a CD. Um ótimo exemplo de um solvente que cumpre estas características é o etanol<sup>20-22</sup>.

A encapsulação de um determinado hóspede na cavidade da CD apresenta inúmeras vantagens, nomeadamente:

- Aumento significativo da solubilidade de substâncias pouco solúveis;
- Proteção de substâncias contra hidrólises, oxidações, etc;
- Melhorias ao nível da biodegradação de alguns compostos quando complexados;
- Possibilidade de mascarar determinados sabores e/ou odores menos agradáveis.

A complexação não apresenta um caráter permanente, mas sim um equilíbrio dinâmico que depende das interações existentes bem como da estabilidade do complexo. Este equilíbrio geralmente assume proporções estequiométricas de 1:1, podendo no entanto também apresentar outras proporções. Para além desse aspeto, a capacidade de encapsulamento pode ser influenciada pela temperatura e pela quantidade de solvente. No que à temperatura diz respeito, um aumento considerável pode traduzir-se num aumento da solubilidade e conseqüentemente uma maior extensão de complexação, no entanto um aumento excessivo pode porém conduzir à desestabilização e degradação do complexo formado com a ocorrência da quebra das ligações entre o composto e a CD. A quantidade de solvente a utilizar para este processo deve ser a mínima necessária uma vez que um aumento significativo na quantidade de solvente pode conduzir a uma diluição excessiva fazendo com que a reação de complexação seja menos extensa do que o desejável<sup>20-22</sup>.

## 1.7 – Métodos de preparação de complexos de inclusão e aplicações

Na preparação de complexos em CDs podem ser utilizados diferentes métodos dependendo do composto hóspede, da cinética de equilíbrio, do fim a que se destinam os complexos pretendidos, entre outros fatores.

O método da co-precipitação é o mais utilizado para esta finalidade. Este método consiste na adição, com agitação constante, do composto hóspede a uma solução de CD previamente preparada, sendo o complexo posteriormente recolhido por filtração<sup>22</sup>.

O método de preparação de pastas consiste na mistura da CD, do composto hóspede e de uma quantidade mínima de solvente que são levados a um misturador durante tempo variável, e o complexo é recolhido depois de seco sem nenhum outro tipo de tratamento<sup>22</sup>.

O método de mistura a seco envolve a mistura da CD e da molécula hóspede sem a presença de solvente, o que torna este método menos eficaz e com tempos de mistura que variam entre diversas horas e dias<sup>22</sup>.

Os complexos formados podem posteriormente ser caracterizados por diversas técnicas, nomeadamente por Espectrometria UV-Visível, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), por Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC), entre outras, tendo em vista a determinação da proporção de complexação e das propriedades físico-químicas dos complexos formados<sup>21</sup>.

Dadas as possibilidades e às vantagens que a utilização das CDs apresentam, o interesse a aplicação destas moléculas tem tido um aumento exponencial. De entre diversas aplicações, destaca-se o seu uso na indústria alimentar, na indústria têxtil, na indústria cosmética<sup>20-23</sup>, na indústria agrícola e na proteção ambiental<sup>27-28</sup>. A utilização de CDs tem crescido largamente na indústria farmacêutica com o intuito de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis ou de melhorar as propriedades físico-químicas dos mesmos. De entre diversas utilizações bem-sucedidas, salienta-se a presença de CDs nas formulações da Hidrocortisona, do Voltarem e das pastilhas Nicorette<sup>22</sup>.

## 2 – Contextualização no trabalho

Do que foi dito anteriormente, é possível inferir que o desenvolvimento de novos inibidores da MAO-B constitui um dos maiores desafios da atualidade e que há margem para inúmeras novas descobertas nesta área, nomeadamente com o efeito inibidor evidenciado pelas cromonas aliado à sua incorporação em CDs como forma de suprir o problema da solubilidade. O presente trabalho é uma primeira abordagem ao uso de CDs para promover a solubilidade de cromonas.

### 2.1 – Cromonas escolhidas para o trabalho

Estudos recentes mostraram que alguns ácidos carboxílicos de cromonas apresentam propriedades de inibição para com a MAO. A ideia base seria partir de um desses ácidos para a síntese dos compostos benzopirânicos apresentados neste trabalho, optando-se pela utilização do ácido presente na Figura 2.1, substituído na posição C2, como composto de partida para a síntese dos consequentes. Segundo a IUPAC, o seu nome é ácido 4-oxo-4*H*-benzopirano-2-carboxílico, que por uma questão de simplificação será designado de Composto A.

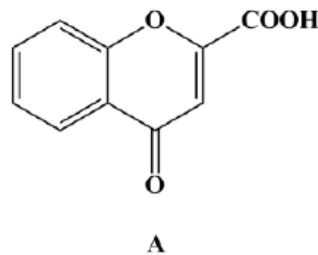


Figura 2.1 – Estrutura química do Composto A.

A partir do Composto A, que apresenta baixa toxicidade e tem presente a importante estrutura benzopirânica para que exista atividade, foram sintetizadas amidas para que haja versatilidade na formação de eventuais ligações com a enzima, e em virtude das mesmas estarem presentes na grande maioria dos sistemas biológicos mais importantes. Tendo por referência a estrutura base representada na Figura 2.2 procedeu-se à preparação de uma série de compostos para serem estudados.

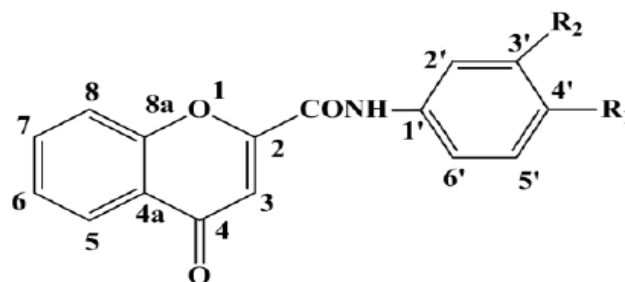


Figura 2.2 – Estrutura base e numeração das amidas sintetizadas.

As amidas de cromonas sintetizadas possuem diferentes substituintes nas posições R1 e R2 de acordo com a Figura 2.3:

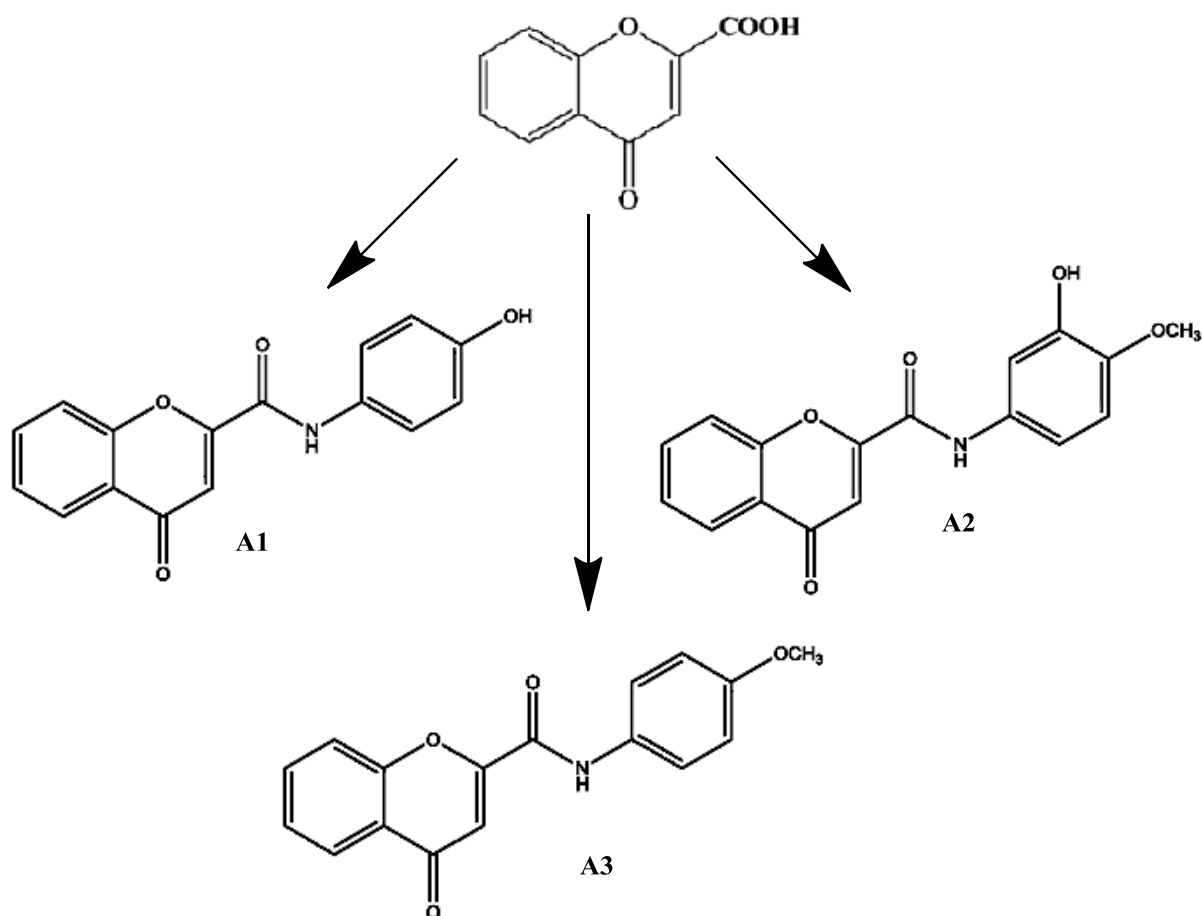


Figura 2.3 – Estruturas químicas das amidas de cromona sintetizadas.

As amidas sintetizadas serão designadas, segundo a nomenclatura da IUPAC, como:

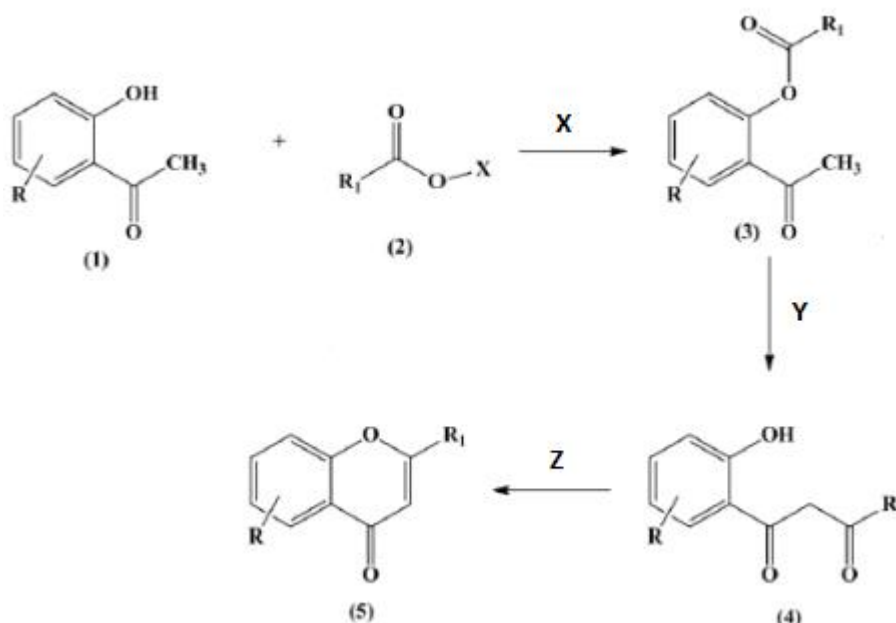
- Composto A1: *N*-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopiran-2-carboxamida
- Composto A2: *N*-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopiran-2-carboxamida
- Composto A3: *N*-(4-metoxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopiran-2-carboxamida

## 2.2 – Métodos de síntese de cromonas

Existem vários e diferentes métodos para a síntese de cromonas descritos na literatura. Serão apresentados e descritos os mais relevantes para a preparação de cromonas.

### 2.2.1 – Método de Baker-Ventkatamaran

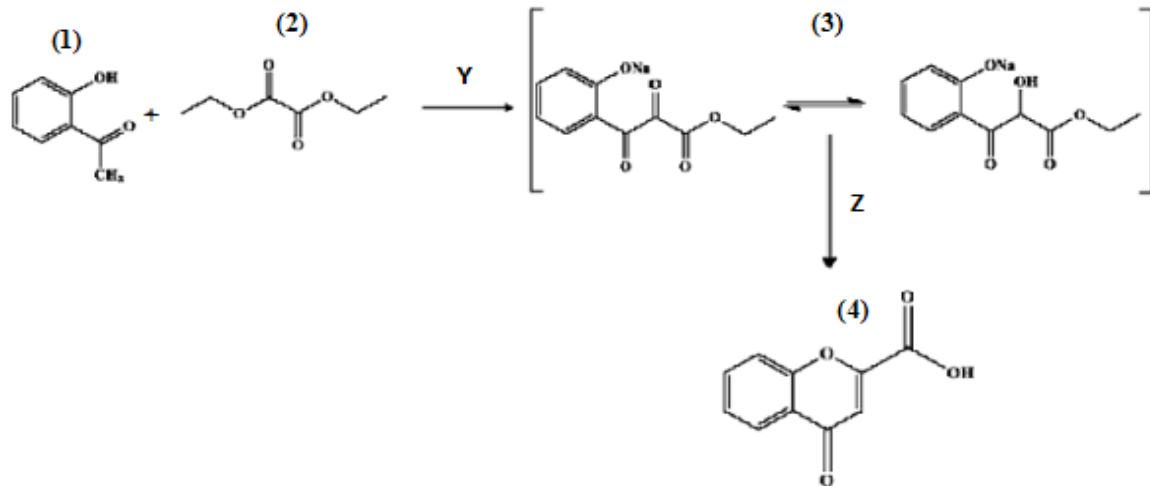
O método de Baker-Ventkatamaran (Esquema 2.1) consiste numa primeira fase na conversão da 2-hidroxiacetofenona num intermediário éster. Numa segunda etapa ocorre um rearranjo do éster numa dicetona, que na última fase da reação sofre a ciclização na presença de um ácido forte dando origem à cromona com o padrão de substituição correspondente. Este método tem sido bastante utilizado para a síntese de flavonas e de 3-acil cromonas, precursores de elevada utilidade na síntese de outros derivados de cromonas<sup>29</sup>.



Esquema 2.1 – Método de Baker-Ventkatamaran (1: 2-hidroxiacetofenona; 2: halogeneto de acilo; 3: éster; 4: dicetona; 5: cromona; X:  $POCl_3$ /Piridina; Y: KOH/Piridina ou NaH/DMSO; Z:  $H_2SO_4$ /ácido acético).

### 2.2.2 – Método de Kostanecki-Robinson

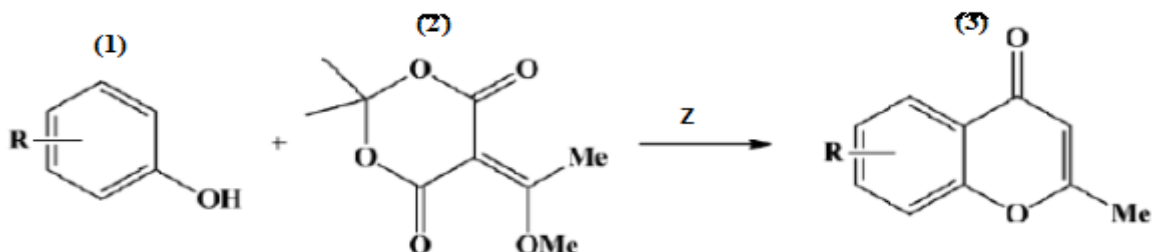
O método de Kostanecki-Robinson (Esquema 2.2) é semelhante ao anterior, diferindo no facto de ocorrer uma condensação de Claisen entre a 2-hidroxiacetofenona e oxalato de etilo conduzindo à formação de um intermediário correspondente a um sal sódico que sofre depois ciclização em meio ácido para a cromona com o padrão de substituição<sup>2</sup>. Este método tem sido bastante utilizado para sintetizar derivados do ácido 4-oxo-4H-benzopirano-3-carboxílico e também para a preparação de 3-alquil ou de 3-alcoxicromonas.



Esquema 2.2 – Método de Kostanecki-Robinson (1: 2-hidroxiacetofenona; 2: oxalato de etilo; 3: sal sódico; 4: cromona; Y: Na, NaOR ou NaH; Z: HCl/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).

### 2.2.3 – Método via ácido de Meldrum

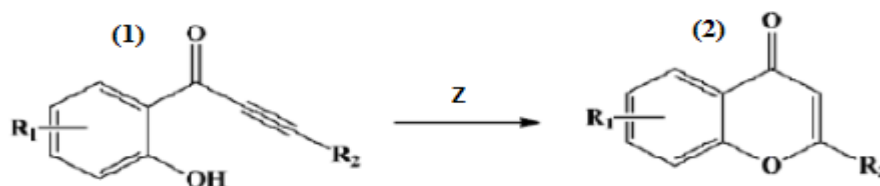
O método de síntese via ácido de Meldrum (Esquema 2.3) é uma metodologia mais recente e baseia-se na reação do ácido de Meldrum com um fenol substituído na presença de um catalisador, conduzindo à formação da cromona com o padrão de substituição pretendido<sup>30</sup>.



Esquema 2.3 – Síntese via ácido de Meldrum (1: fenol; 2: ácido de Meldrum; 3: cromona; Z: Yb(OTf)<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>).

### 2.2.4 – Método de adição intramolecular de Michael

Um outro método para a obtenção de cromonas é a adição de Michael intramolecular (Esquema 2.4). Esta reação envolve a adição intramolecular de 2-hidroxifenil-inonas nas 1,4-benzopironas e geralmente é possível obter bons rendimentos com a sua utilização, sendo no entanto de salientar que para tal é necessário recorrer a reagentes tóxicos, nomeadamente o HgCl<sub>2</sub> 18-coroa-6<sup>31</sup>.



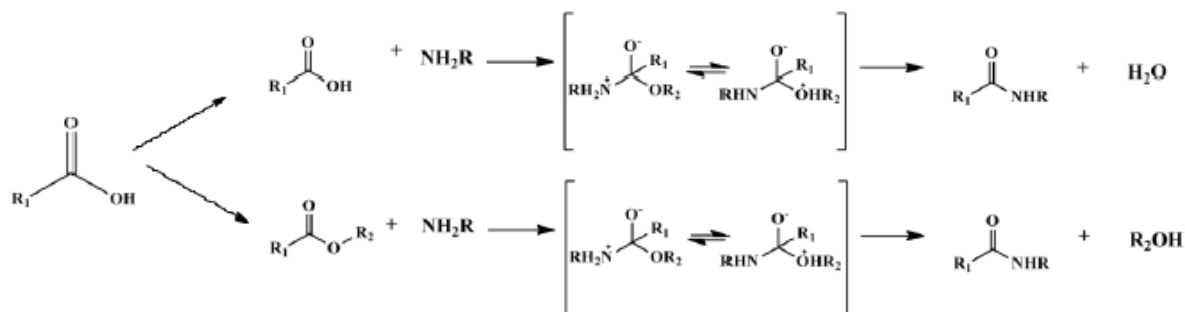
Esquema 2.4 – Adição intramolecular de Michael (1: 2-hidroxifenil.inona; 2: 1,4-benzopirona; Z: MeOH ou acetona).

## 2.3 – Amidas de cromonas

A generalidade dos sistemas biológicos é rica em grupos funcionais que assumem papéis preponderantes para o bom funcionamento dos mesmos. As amidas, presentes no DNA e em inúmeras proteínas e aminoácidos, fazem parte do rol de funções químicas mais importantes que servem de base para muitos fármacos. A formação de uma amida dá-se através de uma reação de condensação entre um ácido carboxílico e uma amina, havendo no entanto a necessidade de ocorrer uma ativação do ácido para um ataque eficaz por parte da amina.

O crescente interesse nesta função química tem originado o desenvolvimento de diversos métodos para a sua obtenção, no sentido de otimizar as reações e melhorar rendimentos, bem como aumentar a seletividade e facilitar os seus processos de purificação. Apesar de existirem diversas técnicas de síntese, as estratégias mais recentes passam por uma ativação do ácido carboxílico através da adição de um agente de acoplamento, envolvendo processos de acilação de aminas<sup>32</sup>.

De entre diversos métodos de acilação de aminas descritos na literatura, os mais usados (Esquema 2.5) passam por uma reação direta entre o ácido carboxílico e a amina desde que ambos os compostos de partida sejam estáveis a temperaturas elevadas, ou então da reação da amina com um éster metílico ou etílico com recurso a um ou mais reagentes de acoplamento<sup>32</sup>.



Esquema 2.5 – Reações de obtenção de amidas de cromona.

A utilização de um agente de acoplamento para ativar o ácido carboxílico diretamente no meio reacional na presença da amina é um procedimento cada vez mais atrativo para a síntese de amidas. Existem diferentes tipos de agentes de acoplamento com elevado índice de utilização no presente, nomeadamente sais de urónio, diimidazóis e principalmente os reagentes de fósforo que serão os utilizados no decurso do trabalho<sup>32</sup>.

De entre diversos reagentes de fósforo conhecidos, aquele mais vezes citado é o BOP, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfónio, que vai atuar na ativação do ácido carboxílico<sup>33</sup>. Recentemente, um outro reagente de fósforo com uma estrutura e mecanismo semelhantes ao BOP foi desenvolvido (Figura 2.4). Esse reagente é o hexafluorofosfato de

benzotriazol-1-iloitris (oxitripirrolidino) fosfónio, PyBOP, que permite que a reação de obtenção de amidas (Esquema 2.6) decorra com um menor índice de toxicidade pois o intermediário é menos tóxico que no caso do BOP<sup>34</sup>.

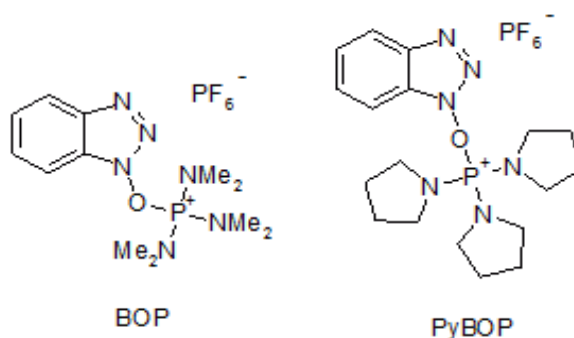
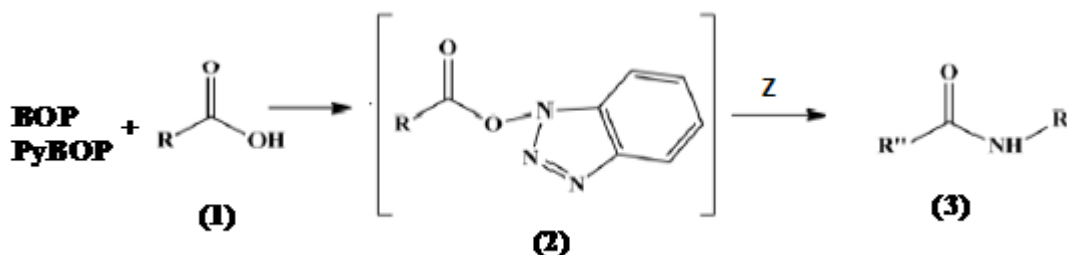


Figura 2.4 – Reagentes de fósforo e sua estrutura – BOP e PyBOP.



Esquema 2.6 – Síntese de amidas através do uso de agentes de acoplamento de fósforo (1: ácido carboxílico; 2: intermediário; 3: amida; Z: amina).

Um outro processo de acoplamento para a síntese de amidas com diversas utilizações tem sido a ativação por micro-ondas. Esta técnica também recorre a um reagente de fósforo,  $\text{PCl}_3\text{O}$ , e apresenta como grande vantagem a redução dos tempos de reação para uma questão de minutos apresentando rendimentos semelhantes aos obtidos pelos métodos mais morosos<sup>34-35</sup>. Esquemáticamente é semelhante ao Esquema 2.6, diferindo nos intermediários resultantes do passo de ativação.

As amidas de cromonas sintetizadas neste trabalho foram obtidas através de uma reação de amidação entre cromonas funcionalizadas de um ácido carboxílico em C2 e a anilina com o padrão de substituição pretendido para o composto final. O método sintético escolhido envolveu a ativação por micro-ondas mas também um outro processo de síntese para comparar com este método, que consistia numa ativação prévia dos ácidos carboxílicos de cromonas através de reagentes de acoplamento, como o BOP ou PyBOP.

## 3- Parte Experimental

### 3.1 - Síntese de Cromonas

A síntese das cromonas foi realizada nos laboratórios de investigação de Química Orgânica do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

#### 3.1.1 - Instrumentação

- As pesagens foram efetuadas numa balança Sartorius BP 221S;
- As sínteses por ativação em microondas foram realizadas num aparelho Biotage Initiator Microwave Synthesizer, num ambiente de ar comprimido entre 0,3 e 0,4 bar, em modo de alta absorvância, numa temperatura de 160 °C e em tubos específicos para este aparelho de 2-5 e de 10 -20 mL.
- Os solventes foram evaporados utilizando um evaporador rotativo Büchi R-210 com auxílio de pressão reduzida;
- Na cromatografia em camada fina (CCF) foram utilizadas placas pré-revestidas de gele de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck) com uma espessura de 0,2 mm. As fases móveis são especificadas em cada procedimento de síntese, bem como a respetiva proporção no caso de mistura de solventes. A revelação das placas de CCF foi realizada à luz ultravioleta (UV) em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 254 e/ou 366 nm.
- A cromatografia em coluna teve como fase estacionária gele de sílica 60 (0,2-0,5 mm). A fase móvel é especificada em cada síntese, bem como a respetiva proporção no caso de mistura de solventes. O volume das frações recolhidas foi cerca de 15 mL.
- Os compostos foram secos numa estufa de vácuo Vacuum Oven da MTI Corporation durante tempos variados.
- Os espetros de RMN (<sup>1</sup>H) foram obtidos num Bruker Avance III 400, à temperatura ambiente, em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) e usou-se TMS como referência interna. Os espetros foram registados a uma frequência de 400.15 MHz, a partir dos quais se obtém o desvio químico ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm), o número de prótons, a multiplicidade e as constantes de acoplamento (J).

### 3.1.2 - Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados em todas as sínteses, foram provenientes das marcas Sigma-Aldrich, Merck, Fluka e Riedel de Hæn, com a qualidade de “para síntese” ou *pro analysis*.

### 3.1.3 - Síntese de cromonas

#### 3.1.3.1 - Síntese da *N*-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopirano-2-carboxamida a frio (0°C) (A1)

**Procedimento:** Para um balão reacional em banho de gelo a 0 °C foram pesadas 1,00 g do Composto A posteriormente dissolvidas em 10,0 mL de DMF. Com o balão já em agitação adicionou-se 0,90 mL de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). De seguida, juntou-se à mistura 0,57 g de 4-aminofenol. Uma massa de 2,73 g de PyBOP previamente pesada foi dissolvida na quantidade mínima de diclorometano (DCM) possível e esta solução foi adicionada à mistura reacional, que permaneceu em agitação constante durante cerca de 4 h<sup>36</sup>. A reação foi controlada ao longo do tempo por CCF cujo eluente foi uma mistura de diclorometano/metanol (9:1) até se ter verificado o fim da reação. Esta mistura foi extraída com volumes de 10 mL de H<sub>2</sub>O, HCl e NaHCO<sub>3</sub>, a fase orgânica desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada com o auxílio de pressão reduzida. Posteriormente o sólido obtido foi controlado por CCF com eluente diclorometano/metanol (9:1). Verificou-se que o composto estava relativamente puro pelo que foi levado a secar na estufa. Após secagem, o composto obtido apresentava coloração amarela. Após caracterização por RMN (Figura 3.4) confirmou-se que o produto obtido correspondia ao Composto A1 (0,82 g).

**Rendimento:** 55,3%

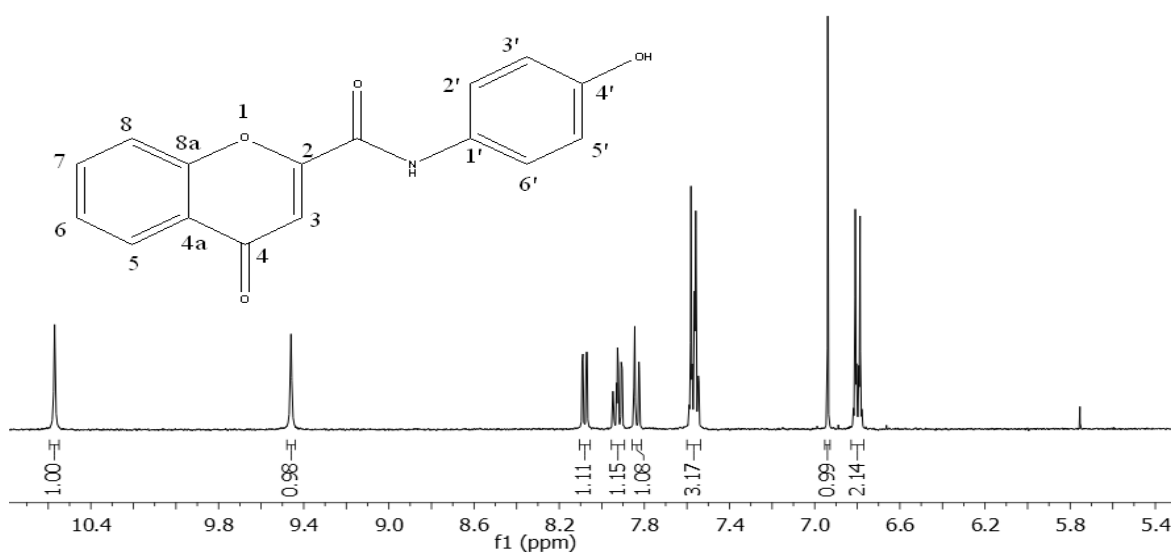


Figura 3.1 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H obtido para a síntese do Composto A1 a frio.

**RMN  $^1\text{H}$ :** 6,80 (2H, *d*,  $J=8,9$ , H(3'),H(5')), 6,94 (1H, *s*, H(3)), 7,57 (3H, *m*, H(6), H(2'), H(6')), 7,84 (1H, *dd*,  $J=8,5$ ; 0,7, H(8)), 7,93 (1H, *ddd*,  $J=8,5$ ; 7,1; 1,6, H(7)), 8,08 (1H, *dd*,  $J=8,0$ ; 1,4, H(5)), 9,46 (1H, *s*, OH), 10,56 (1H, *s*, CONH).

### 3.1.3.2 - Síntese da *N*-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopirano-2-carboxamida à temperatura ambiente (25 °C) (A1)

**Procedimento:** Para um balão reacional à temperatura ambiente (25 °C ) foram pesadas 1,00 g do Composto A posteriormente dissolvidas em 10,0 mL de DMF. Com o balão já em agitação adicionou-se 0,90 mL de DIPEA. De seguida, juntou-se à mistura 0,58 g de 4-aminofenol. Uma massa de 2,73 g de PyBOP previamente pesada foi dissolvida na quantidade mínima de DCM possível e esta solução foi adicionada à mistura reacional, que permaneceu em agitação constante durante cerca de 4 h<sup>36</sup>. A reação foi controlada ao longo do tempo por CCF cujo eluente foi uma mistura de diclorometano/metanol (9:1) até se ter verificado o fim da reação. Esta mistura foi posteriormente extraída com 10 mL de H<sub>2</sub>O, HCl e NaHCO<sub>3</sub>, mas durante este ciclo o composto insolubilizou na ampola de decantação. Desta forma, o composto foi filtrado e levado a secar na estufa. Posteriormente o sólido obtido foi controlado por CCF com eluente diclorometano/metanol (9:1). Verificou-se que o composto estava relativamente puro pelo que foi levado a secar na estufa. Após secagem, o composto obtido apresentava coloração amarela. Após caracterização por RMN (Figura 3.2) confirmou-se que o produto obtido correspondia ao Composto A1 (0,87 g).

**Rendimento:** 58,6%

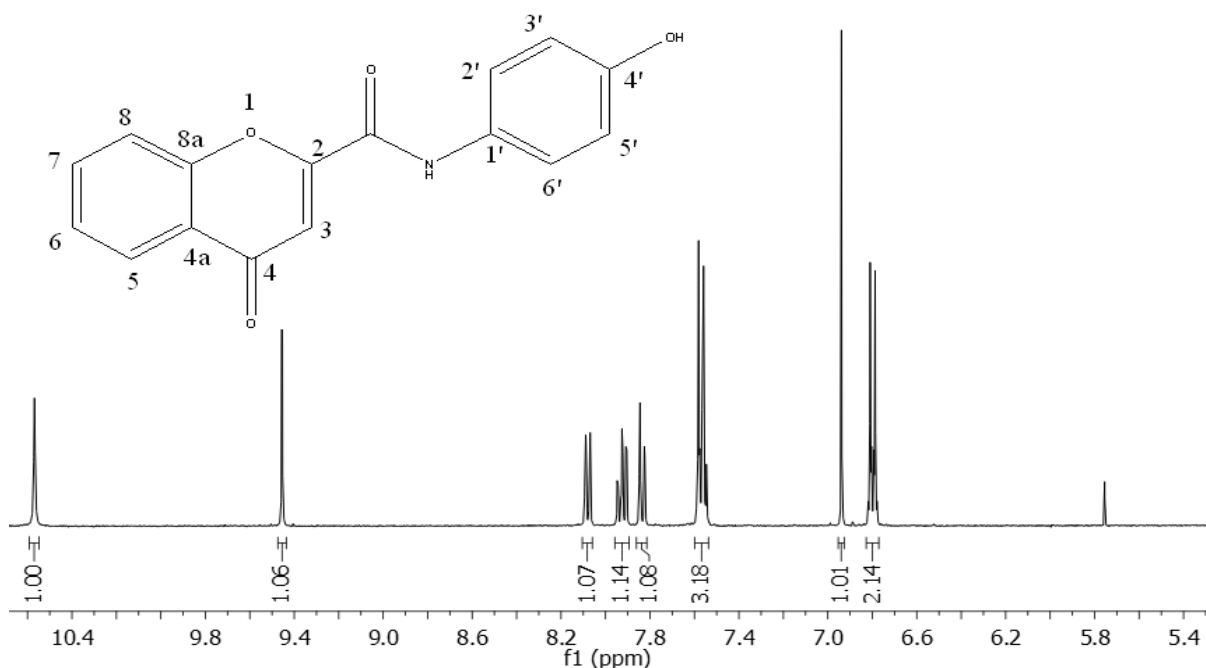


Figura 3.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para a síntese do Composto A1 à temperatura ambiente.

**RMN  $^1\text{H}$ :** 6,80 (2H, *d*,  $J=8,9$ , H(3'),H(5')), 6,94 (1H, *s*, H(3)), 7,57 (3H, *m*, H(6), H(2'), H(6')), 7,84 (1H, *dd*,  $J=8,5$ ; 0,7, H(8)), 7,92 (1H, *ddd*,  $J=8,5$ ; 7,1; 1,6, H(7)), 8,08 (1H, *dd*,  $J=8,0$ ; 1,4, H(5)), 9,45 (1H, *s*, OH), 10,57 (1H, *s*, CONH).

### 3.1.3.3 - Síntese da *N*-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopirano-2-carboxamida a quente (50 °C ) (A1)

**Procedimento:** Para um balão reacional em banho de água a 50 °C foram pesadas 1,00 g do Composto A posteriormente dissolvidas em 10,0 mL de DMF. Com o balão já em agitação adicionou-se 0,90 mL de DIPEA. De seguida, juntou-se à mistura 0,58 g de 4-aminofenol. Uma massa de 2,73 g de PyBOP previamente pesada foi dissolvida na quantidade mínima de DCM possível e esta solução foi adicionada à mistura reacional, que permaneceu em agitação constante durante cerca de 4 h<sup>36</sup>. A reação foi controlada ao longo do tempo por CCF de fase móvel diclorometano/metanol (9:1) até se ter verificado o fim da reação. Esta mistura foi posteriormente extraída em 10 mL de H<sub>2</sub>O, HCl e NaHCO<sub>3</sub>, mas durante este ciclo o composto insolubilizou na ampola de decantação. Desta forma, o composto foi filtrado e levado a secar na estufa. Posteriormente o sólido obtido foi controlado por CCF com eluente diclorometano/metanol (9:1). Verificou-se que o composto estava relativamente puro pelo que foi levado a secar na estufa. Após secagem, o composto obtido apresentava coloração amarela. Após caracterização por RMN (Figura 3.3) confirmou-se que o produto obtido correspondia ao Composto A1 (0,78 g).

**Rendimento:** 52,7%

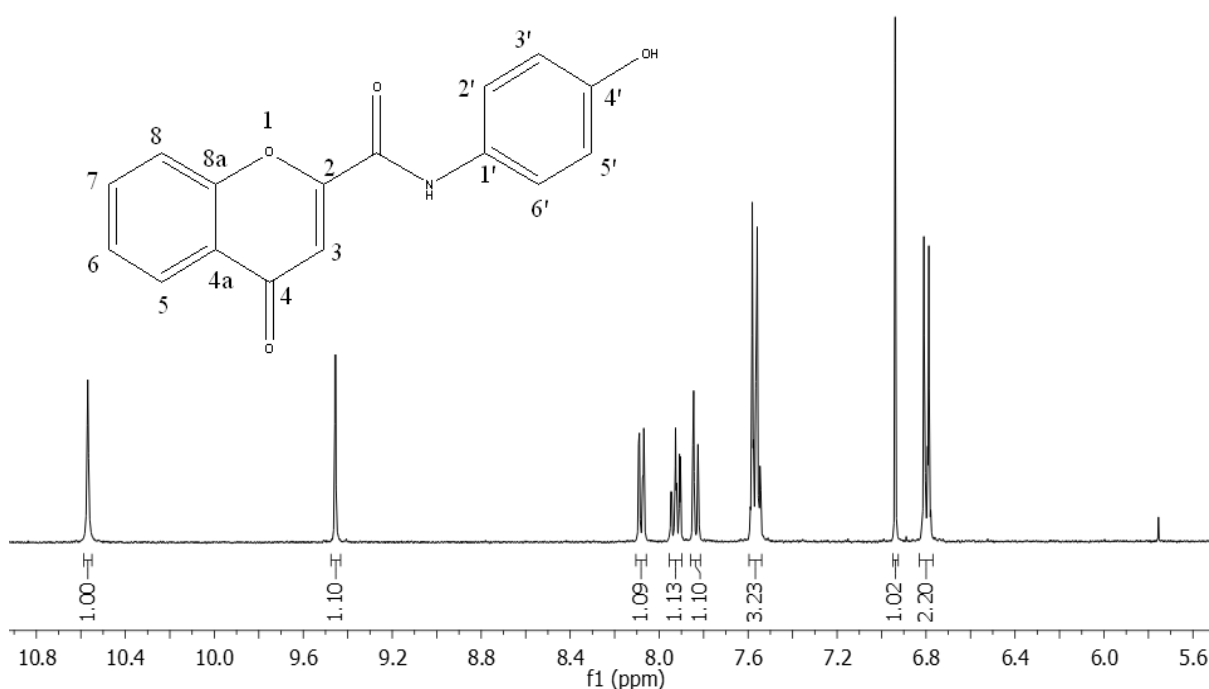


Figura 3.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para a síntese do Composto A1 a quente.

**RMN  $^1\text{H}$ :** 6,80 (2H, *d*,  $J=8,9$ , H(3'), H(5')), 6,94 (1H, *s*, H(3)), 7,57 (3H, *m*, H(6), H(2'), H(6')), 7,84 (1H, *dd*,  $J=8,5$ ; 0,7, H(8)), 7,93 (1H, *ddd*,  $J=8,5$ ; 7,1; 1,6, H(7)), 8,08 (1H, *dd*,  $J=8,0$ ; 1,4, H(5)), 9,46 (1H, *s*, OH), 10,57 (1H, *s*, CONH).

### 3.1.3.4 - Síntese da *N*-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopirano-2-carboxamida por microondas (A1)

**Procedimento:** Para um vial de microondas foram pesadas 0,50 g do Composto A posteriormente dissolvidas em 4,3 mL de dimetilformamida (DMF). Em agitação adicionou-se 0,24 mL de óxido de cloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3\text{O}$ ). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min. De seguida, juntou-se à mistura 0,28 g de 4-aminofenol. O vial foi devidamente selado e levado ao microondas. A mistura foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionada de água promovendo a formação do composto sólido. O sólido formado foi filtrado, lavado com metanol e os solventes eliminados por evaporação<sup>35</sup>. Posteriormente o sólido obtido foi controlado por CCF com eluente diclorometano/metanol (9:1). Verificou-se que o composto estava relativamente puro pelo que foi levado a secar na estufa. Após secagem, o composto obtido apresentava coloração amarela. Após caracterização por RMN (Figura 3.4) confirmou-se que o produto obtido correspondia ao Composto A1 (0,32 g).

**Rendimento:** 43,6%

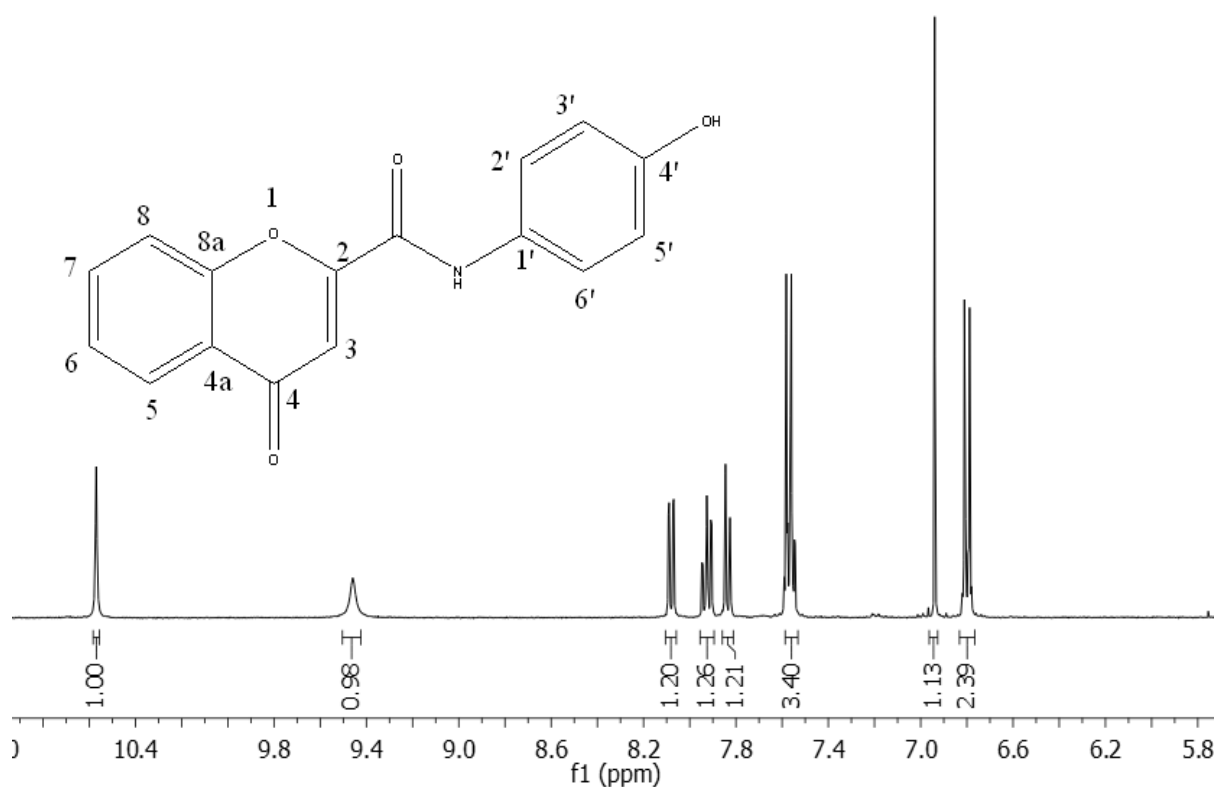


Figura 3.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido na síntese do Composto A1 por microondas.

**RMN <sup>1</sup>H:** 6,73 (2H, *d*, *J*=8,9, H(3'),H(5')), 6,94 (1H, *s*, H(3)), 7,56 (3H, *m*, H(6), H(2'), H(6')), 7,83 (1H, *dd*, *J*=8,5; 0,7, H(8)), 7,92 (1H, *ddd*, *J*=8,5; 7,1; 1,6, H(7)), 8,09 (1H, *dd*, *J*=8,0; 1,4, H(5)), 9,46 (1H, *s*, OH), 10,57 (1H, *s*, CONH).

Dos quatro processos de síntese testados verificou-se que a reação com o PyBOP como agente de acoplamento é ligeiramente superior ao obtido pela reação por microondas. Mais se acresce que o aumento de temperatura tem pouca expressão face ao rendimento do produto final. No entanto, apesar do rendimento por microondas ser ligeiramente inferior ao obtido pelo método do PyBOP este foi o escolhido para sintetizar os restantes compostos uma vez que é um método mais rápido e económico para a síntese dos compostos pretendidos. Na Tabela 1 encontram-se os resultados sumarizados das sínteses:

Tabela 3.1 – Rendimentos obtidos na síntese do Composto A1 em diferentes métodos.

Método	Rendimento (%)
0 °C	55,3
25 °C	58,6
50 °C	52,7
MW	43,6

### 3.1.3.5 - Síntese da *N*-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopiran-2-carboxamida por microondas (A2)

**Procedimento:** Para um vial de microondas foram pesadas 1,00 g do Composto A posteriormente dissolvidas em 8,8 mL de DMF. Em agitação adicionou-se 0,49 mL  $\text{PCl}_3\text{O}$ . A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min. De seguida, juntou-se à mistura 0,74 g de 5-amino-2-metoxifenol. O vial foi devidamente selado e levado ao microondas. A mistura foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionada de água promovendo a formação do composto sólido<sup>35</sup>. O sólido formado foi dissolvido em metanol e DCM, aos quais se juntou carvão ativado posteriormente filtrado. Esta mistura foi extraída em 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , HCl e  $\text{NaHCO}_3$ , e a fase orgânica desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada com o auxílio de pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, usando diclorometano/acetato de etilo (5:5) como eluente. As frações que continham o composto puro foram reunidas, o solvente evaporado e o composto levado a secar na estufa. Após secagem, o

composto obtido apresentava coloração amarela. Após caracterização por RMN (Figura 3.5) confirmou-se que o produto obtido correspondia ao Composto A2 (0,38 g).

**Rendimento:** 23,2%

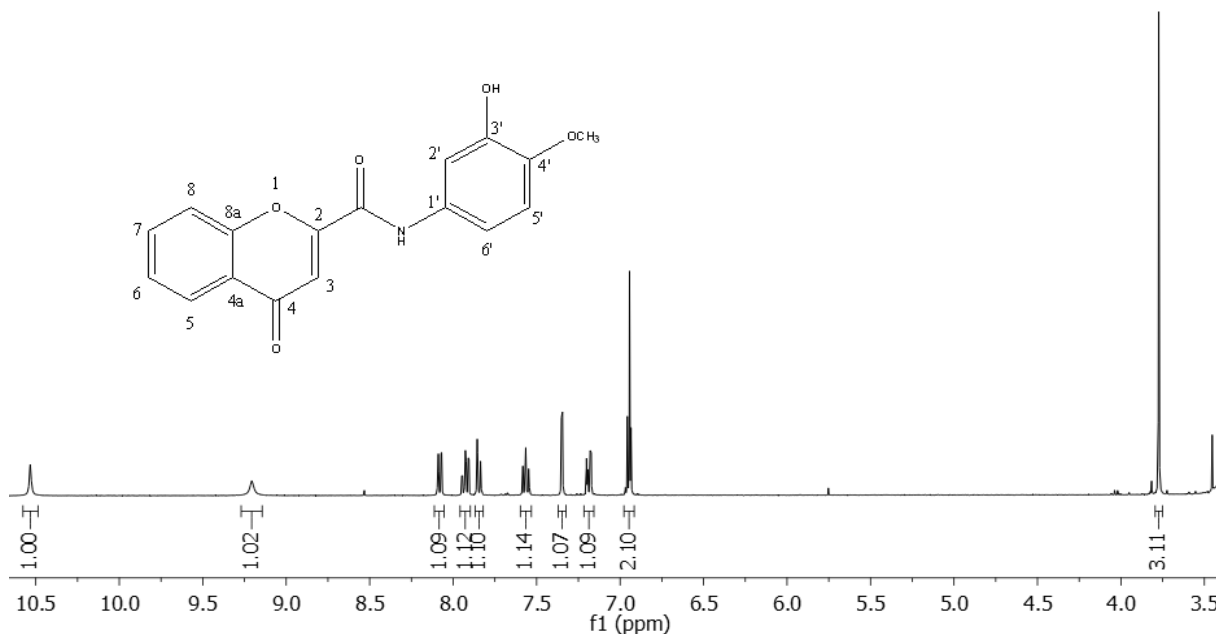


Figura 3.5 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para a síntese do Composto A2 por microondas.

**RMN  $^1\text{H}$ :** 3,77 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,95 (1H, d,  $J=8,8$ , H(5')), 6,97 (1H, s, H(3)), 7,18 (1H, dd,  $J=8,7$ ; 2,6, H(6')), 7,34 (1H, d,  $J=2,5$ , H(2')), 7,56 (1H, ddd,  $J=8,0$ ; 7,0; 1,0, H(6)), 7,89 (1H, dd,  $J=8,5$ ; 0,7, H(8)), 7,92 (1H, ddd,  $J=8,5$ ; 7,1; 1,6, H(7)), 8,08 (1H, dd,  $J=7,9$ ; 1,3, H(5)), 9,21 (1H, s, OH), 10,66 (1H, s, CONH).

### 3.1.3.6 - Síntese da *N*-(4-metoxifenil)-4-oxo-4*H*-benzopirano-2-carboxamida por microondas (A3)

**Procedimento:** Para um vial de microondas foram pesadas 1,00 g do Composto A posteriormente dissolvidas em 8,8 mL de DMF. Em agitação adicionou-se 0,49 mL de  $\text{PCl}_3\text{O}$ . A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min. De seguida, juntou-se à mistura 0,65 g de *p*-anisidina. O vial foi devidamente selado e levado ao microondas. A mistura foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionada de água promovendo a formação do composto sólido. O sólido formado foi filtrado, lavado com metanol e os solventes eliminados por evaporação e o balão reacional ao qual se juntou acetato de etilo foi levado a arrefecer no frigorífico<sup>35</sup>. Posteriormente o sólido obtido foi controlado por CCF com eluente diclorometano/metanol (9:1). Verificou-se que o composto estava relativamente puro pelo que foi levado a secar na estufa. Após secagem, o composto obtido apresentava coloração amarela esverdeada. Após caracterização por RMN (Figura 3.6) confirmou-se que o produto obtido correspondia ao Composto A3 (0,92 g).

**Rendimento:** 59,4%

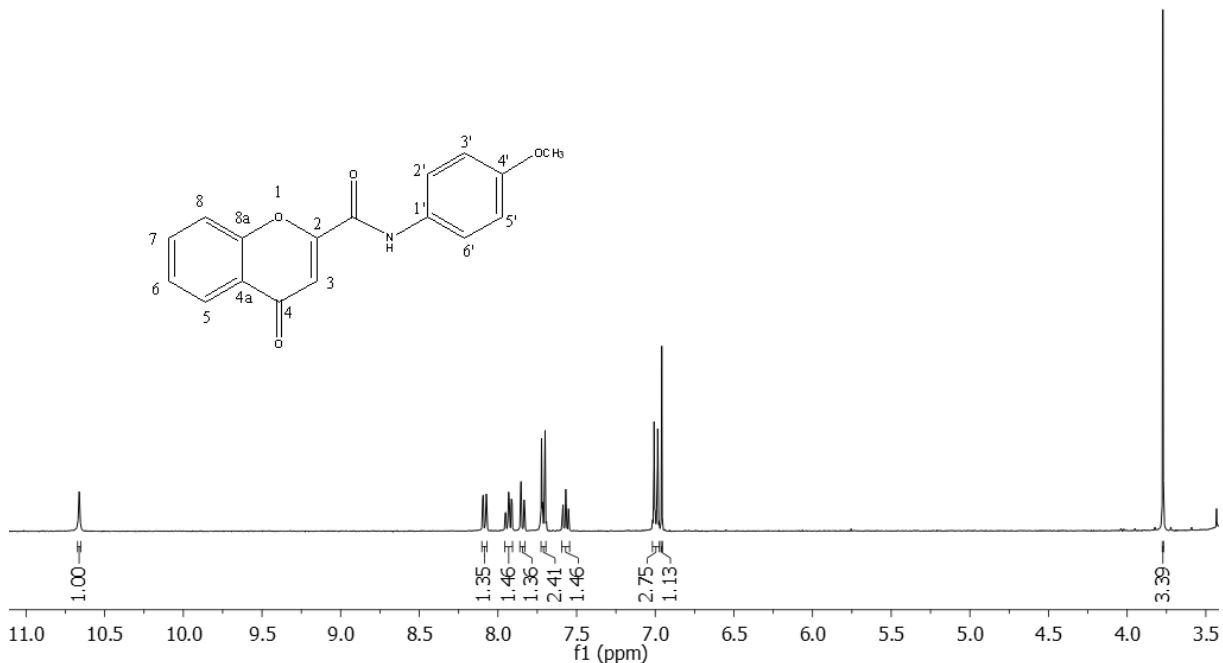


Figura 3.6 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para a síntese do Composto A3 por microondas.

**RMN  $^1\text{H}$ :** 3,77 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,96 (1H, s, H(3)), 6,99 (2H, d,  $J=9,2$  H(3')), H(5')), 7,57 (1H, ddd,  $J=8,0$ ; 7,0; 1,1, H(6)), 7,71 (2H, d,  $J=9,1$ , H(2''), H(6'')), 7,84 (1H, dd,  $J=8,5$ ; 0,7, H(8)), 7,93 (1H, ddd,  $J=8,0$ ; 7,0; 1,1, H(7)), 8,08 (1H, dd,  $J=7,9$ ; 1,3, H(5)), 10,66 (1H, s, CONH).

### 3.1.4 - Elucidação Estrutural dos compostos sintetizados

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi estabelecida por Ressonância Magnética Nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) para confirmar a sua identidade bem como aferir acerca da sua pureza. A análise por RMN é uma técnica eficaz utilizada na caracterização estrutural dos compostos sintetizados<sup>37</sup>.

Os resultados obtidos para os espectros de RMN  $^1\text{H}$  encontram-se na Tabela 3.2 tendo os desvios químicos correspondentes aos prótons dos anéis aromáticos sido assinalados com base na multiplicidade dos sinais e das constantes de acoplamento, sendo possível identificar alguns sinais característicos que são atribuídos à ressonância dos seus prótons, sumariamente:

- Os desvios químicos associados aos prótons presentes no núcleo benzopirânico das cromonas encontram-se de acordo com aqueles presentes na literatura<sup>8</sup>, indicando que não ocorreram alterações estruturais no núcleo da cromona;
- A transformação pretendida é evidenciada pelo aparecimento do sinal correspondente ao próton NH (singleto) a  $\delta$  10,56-10,66 ppm;

- O aparecimento dos sinais correspondentes aos prótons OH (singleto) a  $\delta$  9,21-9,46 ppm e aos prótons OCH<sub>3</sub> (singleto) a  $\delta$  3,77 ppm relativos aos grupos substituintes do anel aromático exocíclico permitem confirmar a introdução do substituinte pretendido.

Estes resultados permitiram a identificação dos compostos obtidos nas sínteses como sendo os pretendidos.

Tabela 3.2 – Resultados de RMN <sup>1</sup>H para os Compostos A1, A2 e A3.

Composto		H(3)	H(5)	H(6)	H(7)	H(8)	H(2')	H(3')	H(5')	H(6')	NH	OH	OCH <sub>3</sub>
A1	( $\delta$ )	6,94	8,09	7,56	7,92	7,83	7,56	6,73	6,73	7,56	10,57	9,46	-
	Int.	1H	1H	3H	1H	1H	3H	2H	2H	3H	1H	1H	-
	Mult.	s	dd	m	ddd	dd	m	d	d	m	s	s	-
	(J)	-	8,0;1,4	-	8,5;7,1;1,6	8,5;0,7	-	8,9	8,9	-	-	-	-
A2	( $\delta$ )	6,97	8,08	7,56	7,92	7,84	7,34	-	6,95	7,18	10,53	9,21	3,77
	Int.	1H	1H	1H	1H	1H	1H	-	1H	1H	1H	1H	3H
	Mult.	s	dd	ddd	ddd	dd	d	-	d	dd	s	s	s
	(J)	-	7,9;1,3	8,0;7,0;1,0	8,5;7,1;1,6	8,5;0,7	2,5	-	8,8	8,7;2,6	-	-	-
A3	( $\delta$ )	6,96	8,08	7,57	7,93	7,84	7,71	6,99	6,99	7,71	10,66	-	3,77
	Int.	1H	1H	1H	1H	1H	2H	2H	2H	2H	1H	-	3H
	Mult.	s	dd	ddd	ddd	dd	d	d	d	d	s	-	s
	(J)	-	7,9;1,3	8,0;7,0;1,1	8,6;7,0;1,7	8,5;0,7	9,1	9,2	9,2	9,1	-	-	-

### 3.2 - Estudos de Complexação

Como referido anteriormente, as  $\beta$ -CDs são as mais utilizadas quer por serem mais viáveis economicamente, mas também por apresentarem uma cavidade de tamanho ideal para encapsular compostos aromáticos e heterocíclicos. Neste trabalho, optou-se pela utilização de uma  $\beta$ -CD substituída, a (2-hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) (Figura 3.7), pelo facto de ser mais solúvel em solventes aquosos e também porque em estudos recentes apresentou bons resultados na encapsulação de outros compostos com o mesmo objetivo de aumentar a sua solubilidade<sup>28</sup>.

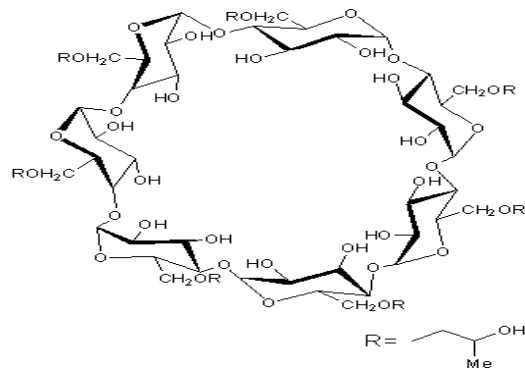


Figura 3.7 – Estrutura da HP-β-CD.

Após a inclusão da molécula hóspede na cavidade da CD, o complexo formado tem de ser caracterizado. O método mais utilizado na literatura para proceder a esta avaliação é o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>. Neste método, o cálculo da constante de estabilidade do complexo obtém-se a partir de um gráfico em que se representa a concentração do composto a incorporar em função da concentração de CD, no tempo ao final do qual o sistema atinge o equilíbrio (Figura 3.8).

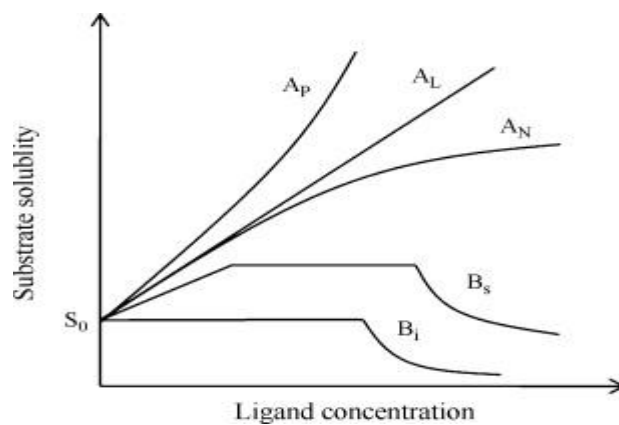


Figura 3.8 – Respostas tipo do método de Higuchi e Connors.

De entre as inúmeras respostas possíveis de serem obtidas, aquela que apresenta uma variação do tipo AL é a que se pretende para possibilitar o seguimento do método. Se o declive dessa reta for superior à unidade, significa que pelo menos uma das espécies está presente tornando-se impossível que em complexos 1:1 haja mais de uma mole de complexo para mais do que uma mole do composto em solução. Por outro lado, um declive menor que a unidade não significa que apenas um complexo 1:1 é formado, podendo-se formar complexos noutras proporções estequiométricas<sup>38</sup>.

A constante de estabilidade para cada complexo (K) pode ser calculada da equação da reta obtida, de acordo com a seguinte equação<sup>38</sup>:

$$K = \text{declive} / S_0 * (1-m)$$

onde  $S_0$  é a solubilidade da cromona na ausência de β-CD e m o declive.

Desta forma é possível avaliar o efeito que a CD tem na solubilidade do composto hóspede, mas também determinar a grandeza da constante de equilíbrio do sistema.

Os estudos de complexação foram realizados nos laboratórios do CIETI, no Instituto Superior de Engenharia do Porto.

### 3.2.1 - Instrumentação

- As pesagens foram efetuadas numa balança Mettler, modelo AE240;
- O pH foi determinado por um elétrodo de pH de marca Crison;
- Os espectros foram traçados e as absorvâncias medidas num espectrofotómetro UV-Vis de marca Shimadzu, modelo UV-1700 PharmaSpec, em cuvetes de quartzo. O branco utilizado é o solvente ou mistura de solventes na proporção indicada adiante para cada composto. Os dados foram tratados com o auxílio do software *UVProbe 2.10* instalado no computador;
- Os ensaios de complexação foram realizados com recurso a seis soluções de 25 mL com quantidade de cromona constante (0,01 g) e concentrações variadas de CD colocadas em agitação constante a durante o tempo necessário para cada estudo atingir o equilíbrio, num agitador orbital de marca IKA, modelo KS 4000 i control. As concentrações de CD e quantidades de solventes serão especificadas para cada estudo.
- Todas as amostras foram filtradas antes das medições por filtros de seringa da marca Chromafil, modelo Xtra PTFE e porosidade 0,45 µm.

### 3.2.2 - Soluções

- As soluções-mãe das cromonas foram preparadas por forma a obter uma concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M em 5 mL de etanol ou DMSO.
- As soluções-mãe de ciclodextrina foram preparadas com concentração de 35 mM em 50 mL de solução aquosa;
- O tampão fosfato a pH fisiológico foi preparado utilizando 1,41 g de fosfato de potássio dibásico e 0,26 g de fosfato de potássio monobásico para 100 mL de solução aquosa.
- As retas de calibração foram traçadas sempre a partir de 5 soluções padrão de volume final de 5 mL, variando o composto.

### 3.2.3 - Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados nos estudos de complexação, foram provenientes das marcas Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel de Hãen e Panreac, com a qualidade de “para síntese” ou *pro analysis*. Na preparação das soluções aquosas foi utilizada água de elevada pureza (condutividade  $<0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ )

### 3.2.4 - Estudos Prévios

Antes de iniciar os ensaios de complexação foi necessário efetuar algumas experiências com o objetivo de avaliar a solubilidade em água e em tampão fosfato com pH fisiológico das cromonas em estudo. Foram efetuados estudos tendo em vista a escolha do solvente mais apropriado para a preparação dos padrões a usar para a curva de calibração. Uma vez que as cromonas se mostraram solúveis em soluções etanólicas foi preparada uma solução-mãe  $10^{-4}$  M do Composto A1 em etanol a partir da qual foram preparadas diversas soluções aquosas contendo diferentes percentagens de solvente orgânico (etanol).

Foram preparadas três soluções diferentes em misturas de etanol/água a partir da solução-mãe de acordo com a Tabela 3.3:

Tabela 3.3 – Preparação de soluções do Composto A1 para ensaios prévios a partir de uma solução-mãe de  $10^{-4}$ M.

	$V_{\text{solução}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{etanol}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{água}} (\text{mL})$
15% Etanol	50	700	4,25
10% Etanol	50	450	4,50
5% Etanol	50	200	4,75

Os espectros destas 3 soluções foram traçados e como podemos verificar na Figura 3.8 há variações na intensidade dos picos com a percentagem de solvente relacionadas com a concentração das mesmas. Embora todas as soluções preparadas se apresentassem com um aspeto límpido, decidiu-se proceder a uma filtração de parte das soluções de forma a poder avaliar o efeito da filtração nas medições a efetuar. Para isso foi traçado o espectro das soluções com filtração e sem filtração, contendo 15% de etanol. Como se pode verificar pela Figura 3.9 existe uma ligeira diferença na intensidade dos picos presentes no espectro pelo que todas as soluções passaram a ser filtradas antes de efetuar as medições.

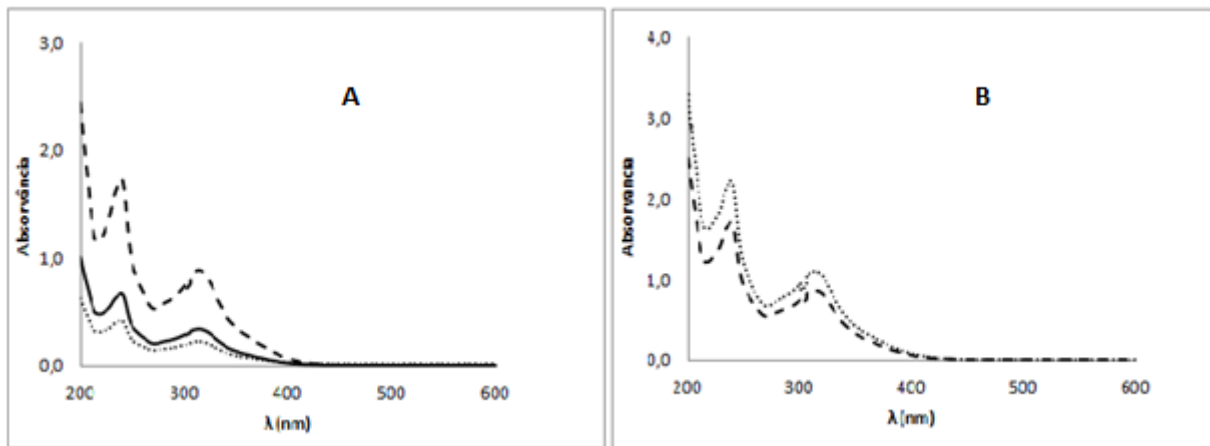


Figura 3.9 – **Figura A** – solução 15% etanol (---), solução 10% etanol (–) e solução 5% etanol (···); **Figura B** – solução 15% etanol filtrada (---) e não filtrada (···).

De salientar que foram realizados estudos até percentagens mais baixas de etanol (1%) não só com água mas também com tampão fosfato a pH fisiológico. Durante a realização destes ensaios, verificou-se que com o tempo a solução-mãe da cromona preparada em etanol começava a turvar, o que indicia que a cromona insolubilizava. Na tentativa de contornar este problema avaliou-se a possibilidade de substituir o etanol por um outro solvente, DMSO, na preparação das soluções-mãe das cromonas. A utilização de DMSO na preparação das soluções-mãe das cromonas permitiu não só ultrapassar o problema da insolubilização, como também preparar soluções padrão diluídas contendo percentagens mais baixas de DMSO do que no caso da utilização de etanol.

Estes estudos prévios permitiram também definir o máximo de absorção, 313 nm, a ser utilizado como ponto de medição para o estabelecimento das curvas de calibração e consequentemente nos ensaios de solubilidade para cada cromona.

Tendo em vista os estudos posteriores de complexação das cromonas com a HP- $\beta$ -CD, prepararam-se soluções padrão de cada uma das cromonas em quatro misturas distintas de solventes: etanol/água; etanol/tampão fosfato; DMSO/água e DMSO/tampão fosfato. Uma vez que nos ensaios prévios se verificou que as cromonas eram praticamente insolúveis em água, procedeu-se igualmente ao estudo de qual a percentagem mínima de solvente orgânico (etanol/DMSO) necessária para garantir que toda a cromona se encontre solubilizada nas soluções padrão.

Foram preparadas diversas retas de calibração para as cromonas (Fig 3.10 a 3.19), com percentagens de solvente orgânico entre os 0,5 e os 10% de modo a escolher a reta mais adequada em termos de gama e de linearidade para cada um dos ensaios de complexação.

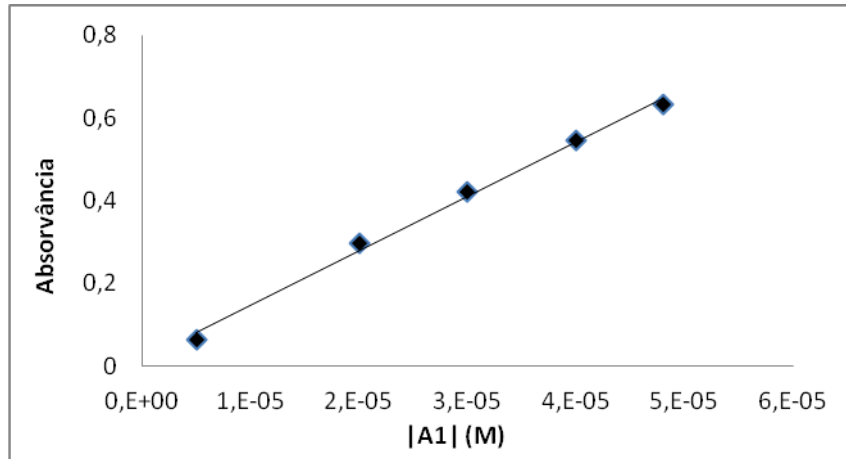


Figura 3.10 - Retas de calibração do Composto A1 em 0,5% de etanol/água.

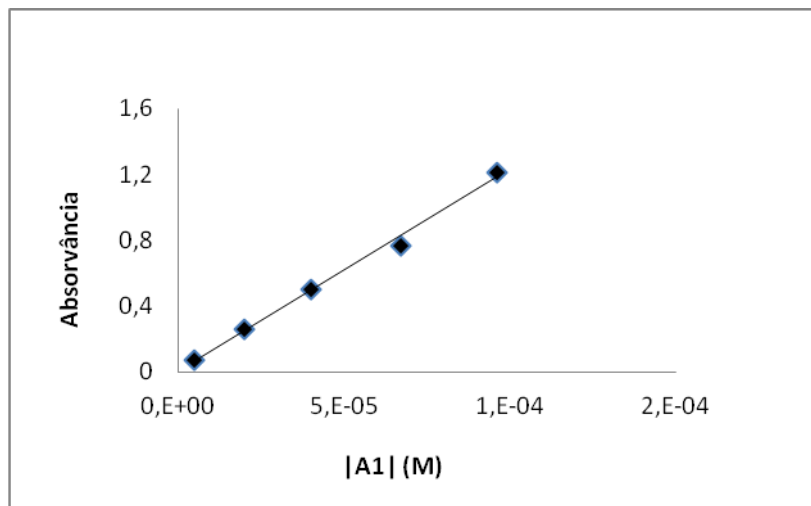


Figura 3.11 - Retas de calibração do Composto A1 em 10% de etanol/tampão fosfato.

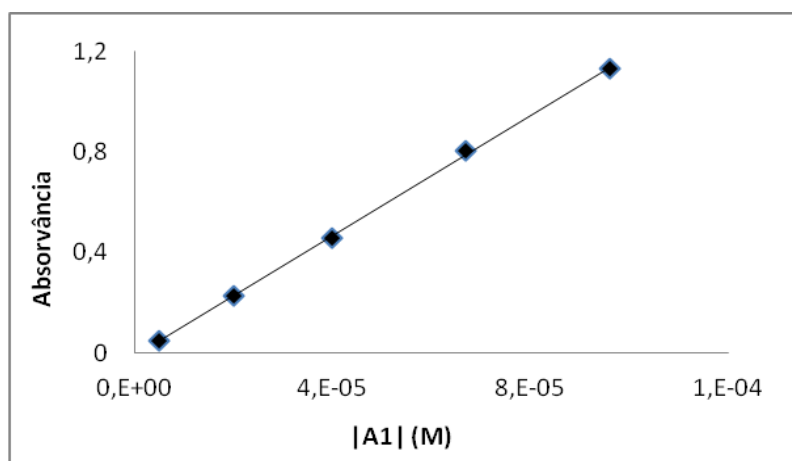


Figura 3.12 - Retas de calibração do Composto A1 em 1% de DMSO/tampão fosfato.

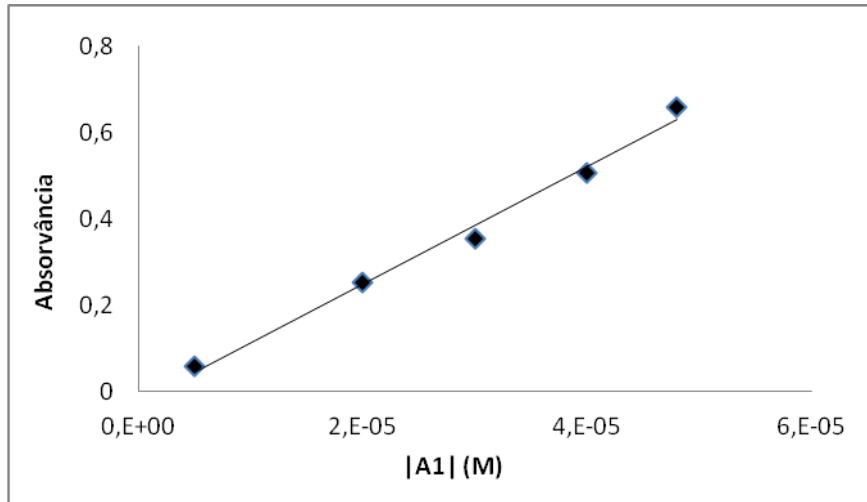


Figura 3.13 - Retas de calibração do Composto A1 em 0,5% de DMSO/água.

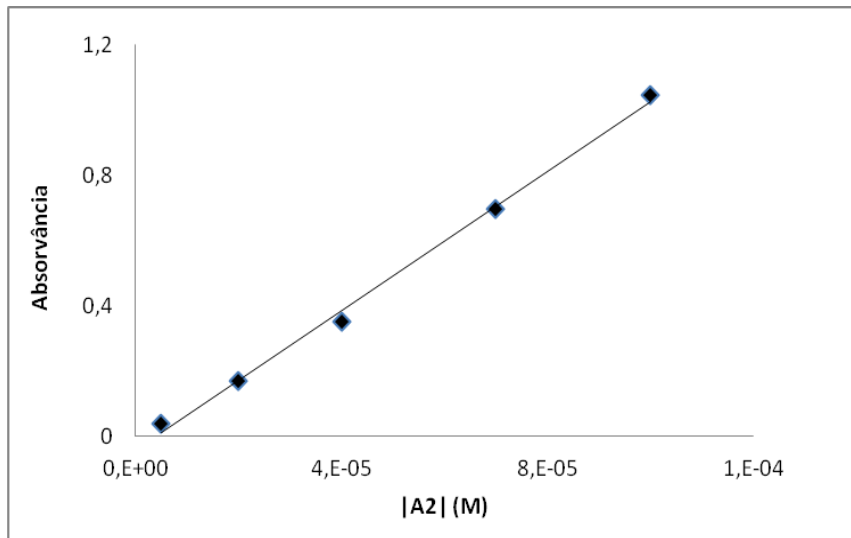


Figura 3.14 - Retas de calibração do Composto A2 em 1% de DMSO/tampão fosfato.

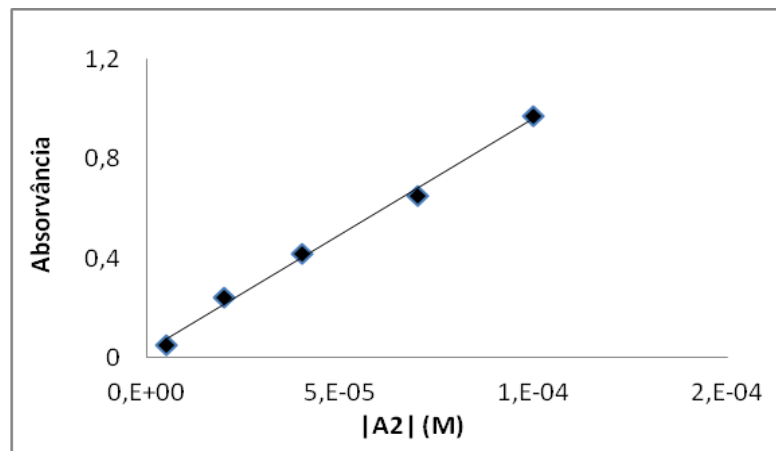


Figura 3.15 - Retas de calibração do Composto A2 em 1% de DMSO/água.

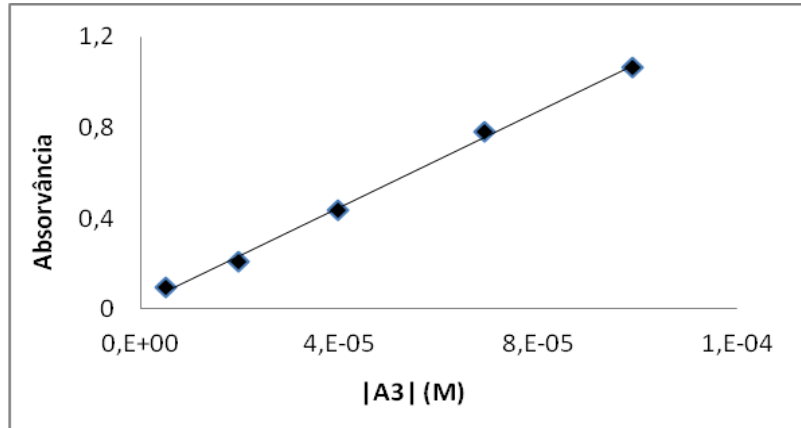


Figura 3.16 - Retas de calibração do Composto A3 em 5% de etanol/água.

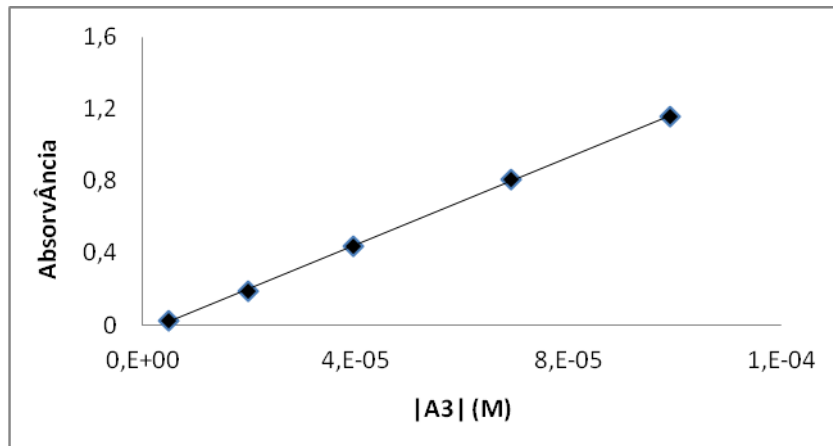


Figura 3.17 - Retas de calibração do Composto A3 em 10% de etanol/tampão fosfato.

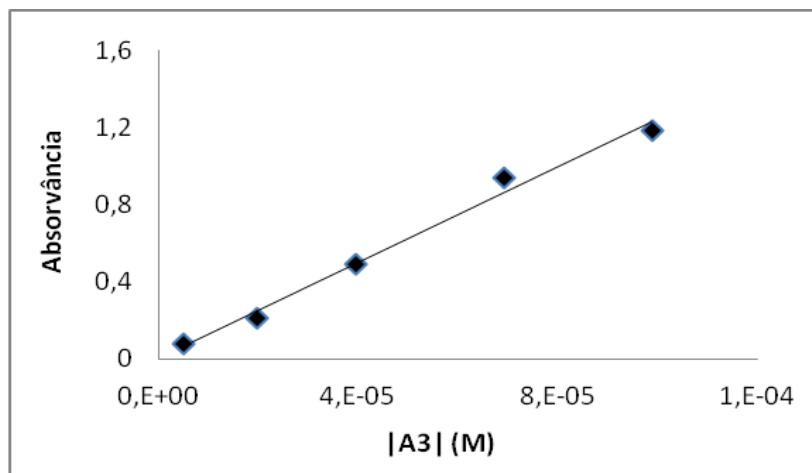


Figura 3.18 - Retas de calibração do Composto A3 em 10% de DMSO/tampão fosfato.

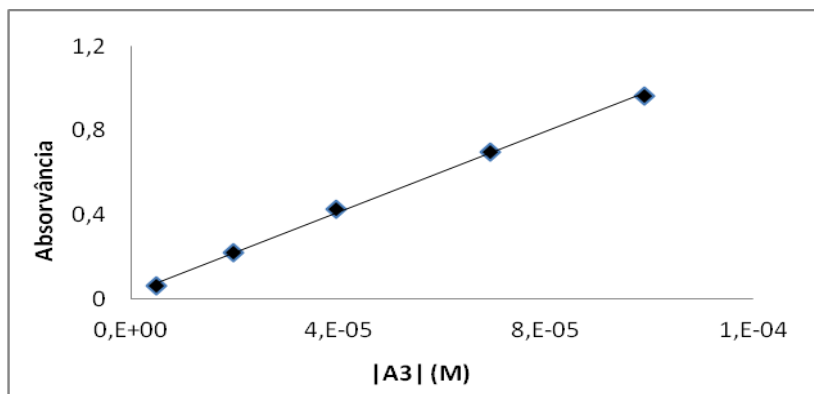


Figura 3.19 - Reta de calibração do Composto A3 em 1% de DMSO/água.

### 3.2.5 - Estudos de complexação

Para a realização dos ensaios de complexação procedeu-se à preparação de seis soluções contendo uma quantidade constante de cromona e concentrações crescentes de HP- $\beta$ -CD nas misturas de solventes (etanol/água, etanol/tampão fosfato, DMSO/água, DMSO/tampão fosfato) de acordo com a Tabela 3.4:

Tabela 3.4 - Quantidades de cromona e de HP- $\beta$ -CD utilizadas nos ensaios de complexação.

Quantidade cromona (mg)	Concentração HP- $\beta$ -CD (mM)
10	0
10	1
10	5
10	15
10	25
10	35

No estudo do Composto A1, para uma mistura de etanol/água, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,995 para uma percentagem de 0,5% de etanol. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância (Figura 3.20).

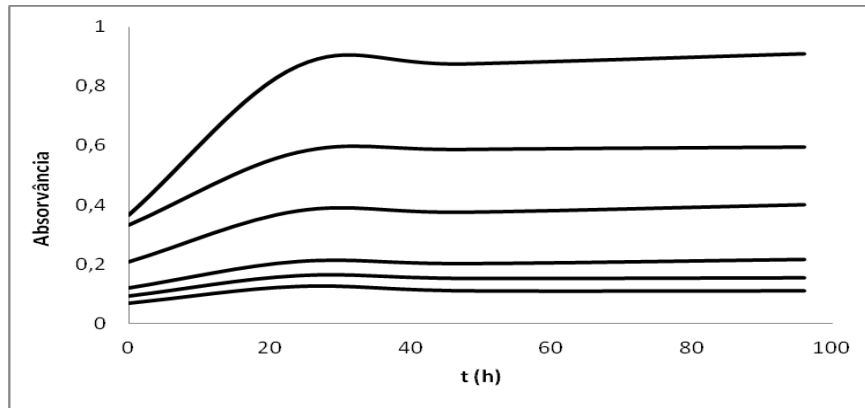


Figura 3.20 – Estudo temporal da complexação do Composto A1:HP-β-CD em etanol/água (de baixo para cima: 0 mM CD, 1 mM CD, 5 mM CD, 15 mM CD, 25 mM CD, 35 mM CD).

De acordo com os resultados obtidos podemos verificar que para qualquer concentração de CD se verifica um aumento de absorvância nas primeiras horas até atingir um máximo cerca das 40 horas, a partir do qual esta permanece constante (atingiu o equilíbrio). Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após 48 horas de agitação, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.21):

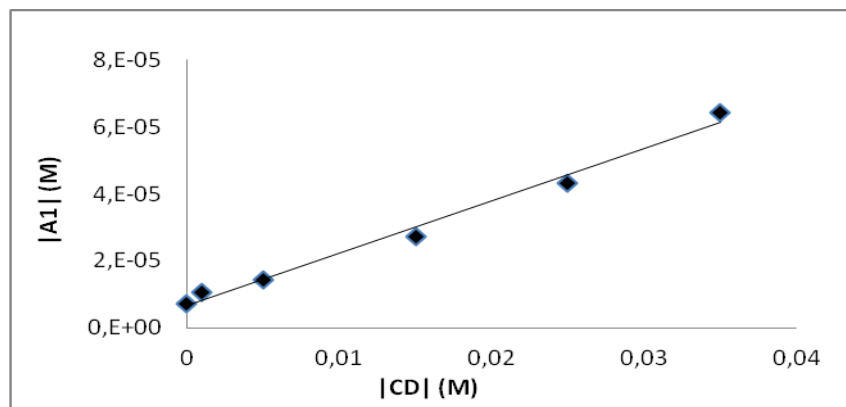


Figura 3.21 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP-β-CD na mistura etanol/água.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de  $230 \text{ M}^{-1}$ .

No estudo do Composto A1, para uma mistura de etanol/tampão fosfato, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,995 para uma percentagem de 10% de etanol. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o

cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP- $\beta$ -CD (Figura 3.22):

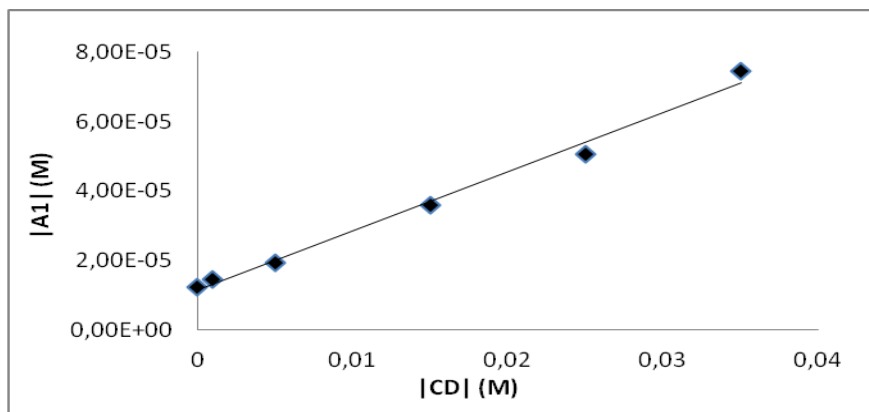


Figura 3.22 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP- $\beta$ -CD na mistura etanol/tampão fosfato.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 149 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A1, para uma mistura de DMSO/tampão fosfato, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,999 para uma percentagem de 1% de DMSO. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP- $\beta$ -CD (Figura 3.23):

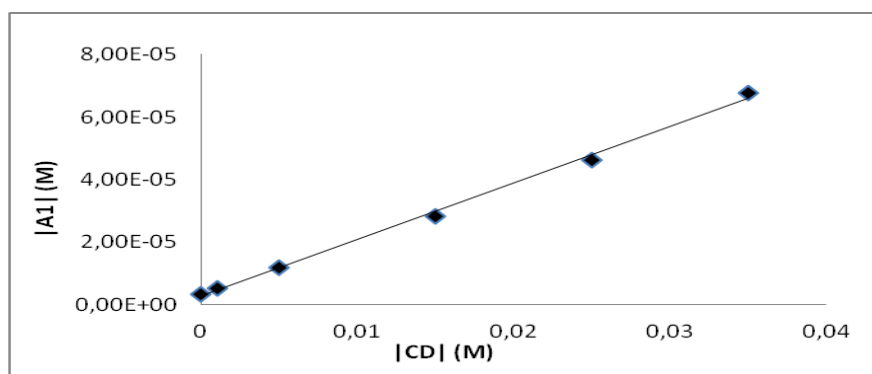


Figura 3.23 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP- $\beta$ -CD na mistura DMSO/tampão fosfato.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 646 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A1, para uma mistura de DMSO/água, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,991 para uma percentagem de 0,5% de DMSO. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.24):

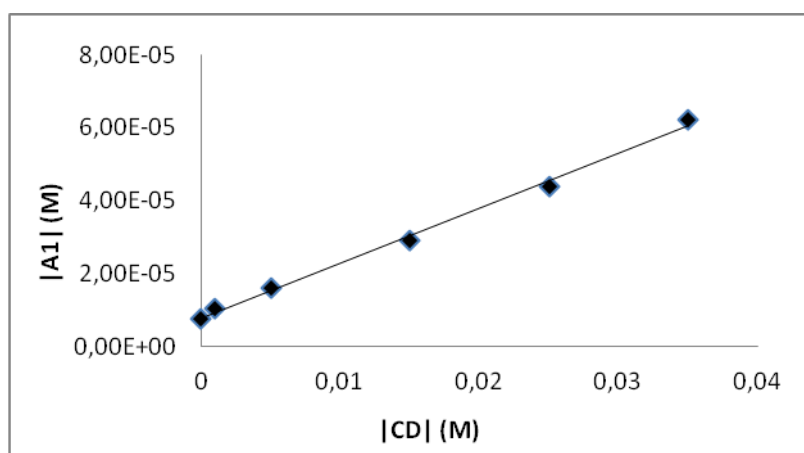


Figura 3.24 - Estudo da solubilidade do Composto A1 em HP-β-CD na mistura DMSO/água.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 188 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A2, para uma mistura de DMSO/tampão fosfato, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,996 para uma percentagem de 1% de DMSO. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais

foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.25):

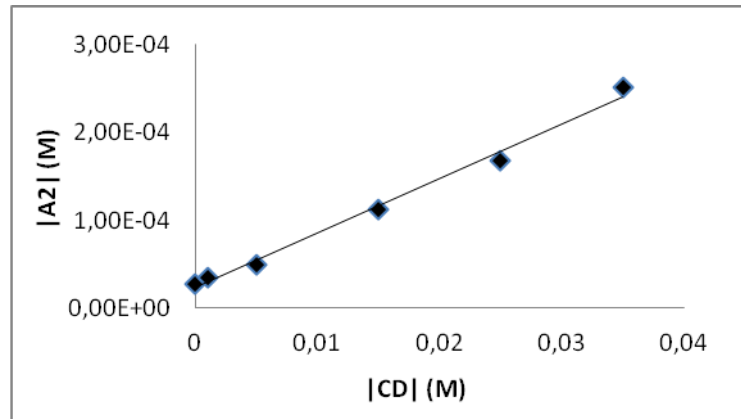


Figura 3.25 - Estudo da solubilidade do Composto A2 em HP-β-CD na mistura DMSO/tampão fosfato.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 263 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A2, para uma mistura de DMSO/água, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,995 para uma percentagem de 1% de DMSO. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.26):

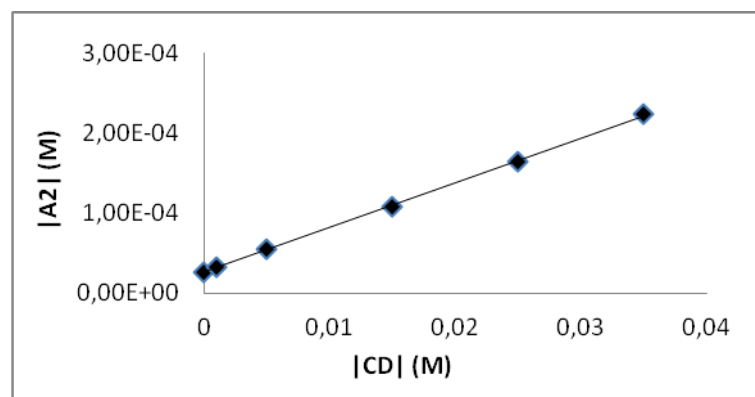


Figura 3.26 - Estudo da solubilidade do Composto A2 em HP-β-CD na mistura DMSO/água.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 214 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A3, para uma mistura de etanol/água, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,997 para uma percentagem de 5% de etanol. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.27):

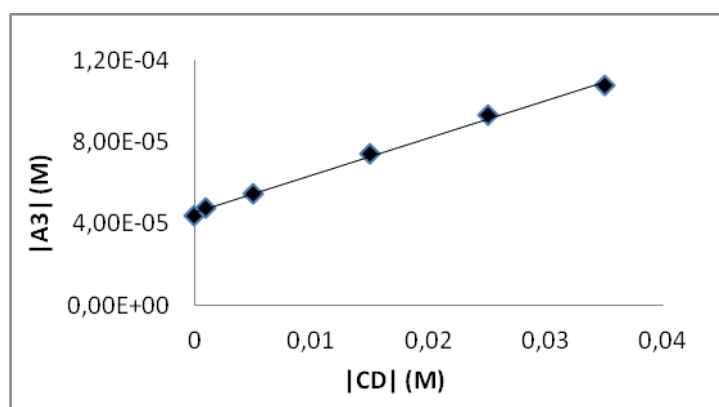


Figura 3.27 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD na mistura etanol/água.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 40 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A3, para uma mistura de etanol/tampão fosfato, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,999 para uma percentagem de 10% de etanol. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.28):

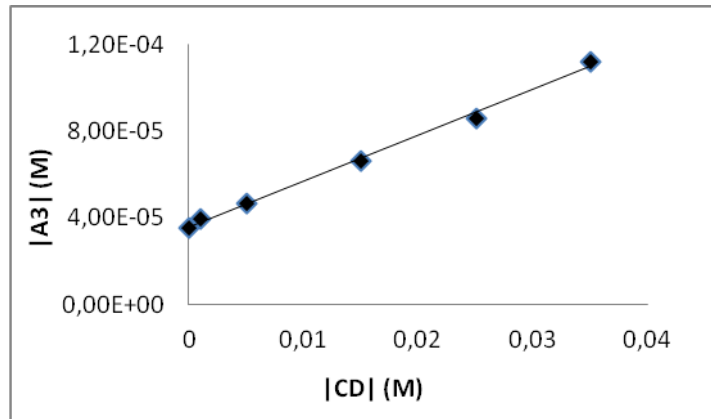


Figura 3.28 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD na mistura etanol/tampão fosfato.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 59 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A3, para uma mistura de DMSO/tampão fosfato, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,989 para uma percentagem de 10% de DMSO. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP-β-CD (Figura 3.29):

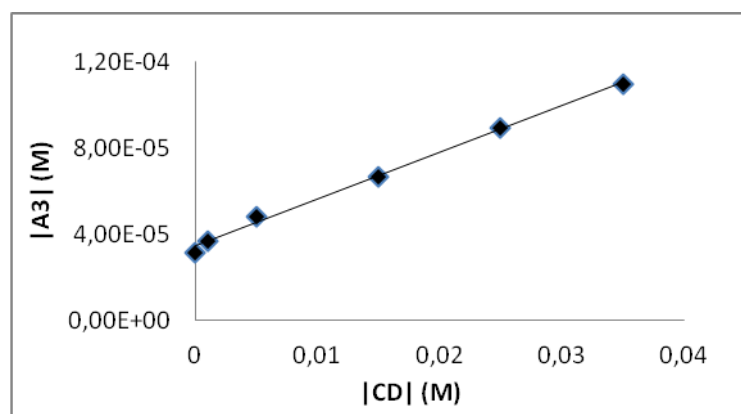


Figura 3.29 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP-β-CD na mistura DMSO/tampão fosfato.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 63 M<sup>-1</sup>.

No estudo do Composto A3, para uma mistura de DMSO/água, foi possível obter uma reta de calibração com coeficiente de correlação de 0,998 para uma percentagem de 1% de DMSO. Desta forma, as seis soluções referidas na Tabela 3.4 foram preparadas para esta percentagem de solvente. Estas soluções foram mantidas em agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente durante 96 horas. Durante este intervalo de tempo foram retiradas periodicamente pequenas alíquotas de cada solução e mediu-se a sua absorvância. Assim, para o cálculo da constante de estabilidade de acordo com o método de Higuchi e Connors<sup>38</sup>, foram utilizados os valores da absorvância obtidos após o equilíbrio ter sido alcançado, a partir dos quais foi traçado um gráfico da concentração de cromona em função da concentração de HP- $\beta$ -CD (Figura 3.30):

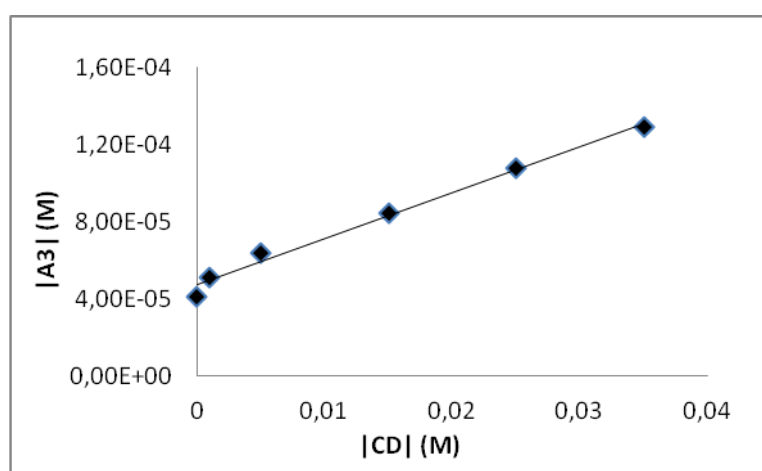


Figura 3.30 - Estudo da solubilidade do Composto A3 em HP- $\beta$ -CD na mistura DMSO/água.

A partir dos parâmetros da reta obtida foi possível utilizar a fórmula de Higuchi e Connors descrita anteriormente<sup>38</sup> para o cálculo da constante de estabilidade para este estudo, cujo valor foi de 51  $M^{-1}$ .

Os valores das constantes de estabilidade obtidos, bem como as percentagens de solvente utilizados em cada estudo encontram-se sumarizados na Tabela 3.5:

Tabela 3.5 – Constantes de estabilidade e respetivas percentagens de solvente para cada ensaio de complexação realizado.

Composto	Solventes	K (M <sup>-1</sup> )
A1	0,5% etanol, 99,5% água	230
	10% etanol, 90% tampão fosfato	149
	1% DMSO, 99% tampão fosfato	646
	0,5% DMSO, 99,5% água	188
A2	1% DMSO, 99% tampão fosfato	263
	1% DMSO, 99% água	214
A3	5% etanol, 95% água	40
	10% etanol, 90% tampão fosfato	59
	10% DMSO, 90% tampão fosfato	63
	1% DMSO, 99% água	51

Como podemos verificar nos resultados obtidos, a complexação das cromonas A1 e A2 com ciclodextrinas permite aumentar significativamente a sua solubilidade. Este aumento é mais significativo quando se utiliza a mistura de solventes DMSO/tampão fosfato. De fato, uma verificação mais atenta dos resultados, permite concluir que para todos os compostos a mistura DMSO/tampão fosfato foi a que deu origem aos valores mais elevados da constante de estabilidade, tornando-se a principal escolha para a síntese dos complexos no seguimento do trabalho. No entanto, o aumento da solubilidade do composto A3 com a HP- $\beta$ -CD é muito modesto uma vez que apresenta constantes de complexação relativamente baixas. A diferença observada, face às restantes cromonas em estudo, embora não sendo expetável pode ficar a dever-se a eventuais diferenças na estrutura conformacional, com a presença de um grupo metoxilo relativamente próximo ao grupo hidroxilo, que poderá dificultar a formação da ponte de hidrogénio esperada, inviabilizando uma melhor inclusão da cromona A3 na cavidade da CD.

### 3.3 - Síntese dos Complexos Cromona/HP- $\beta$ -CD

A síntese dos complexos foi realizada nos laboratórios de investigação de Química Orgânica do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

### 3.3.1 - Instrumentação

- As pesagens foram efetuadas numa balança Sartorius BP 221S;
- O tampão fosfato a pH fisiológico foi preparado utilizando 1,41 g de fosfato de potássio dibásico e 0,26 g de fosfato de potássio monobásico para 100 mL de solução aquosa.
- Os solventes foram evaporados utilizando um evaporador rotativo Büchi com auxílio de pressão reduzida;
- Os compostos foram secos numa estufa de vácuo Vacuum Oven da MTI Corporation durante tempos variados.
- Os espetros de RMN ( $^1\text{H}$ ) foram obtidos num Bruker Avance III 400, a temperatura ambiente, em misturas 50:50 de DMSO/água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), sempre com TMS como referência interna. Os espetros foram registados a uma frequência de 400.15 MHz, a partir dos quais se obtém o desvio químico ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm).

### 3.3.2 - Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados em todas as sínteses, foram provenientes das marcas Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel de Hæn e Panreac, com a qualidade de “para síntese” ou *pro analysis*.

### 3.3.3 - Preparação dos Complexos

Como foi dito anteriormente, a HP- $\beta$ -CD é constituída por sete monómeros iguais e assume uma estrutura em forma de cone, o que resulta em existirem zonas viradas para o interior da cavidade e zonas viradas para o exterior. A numeração destas zonas ao longo do presente trabalho teve em conta os dados existentes noutros estudos presentes na literatura<sup>39,40</sup> e apresentam-se na Figura 3.31:

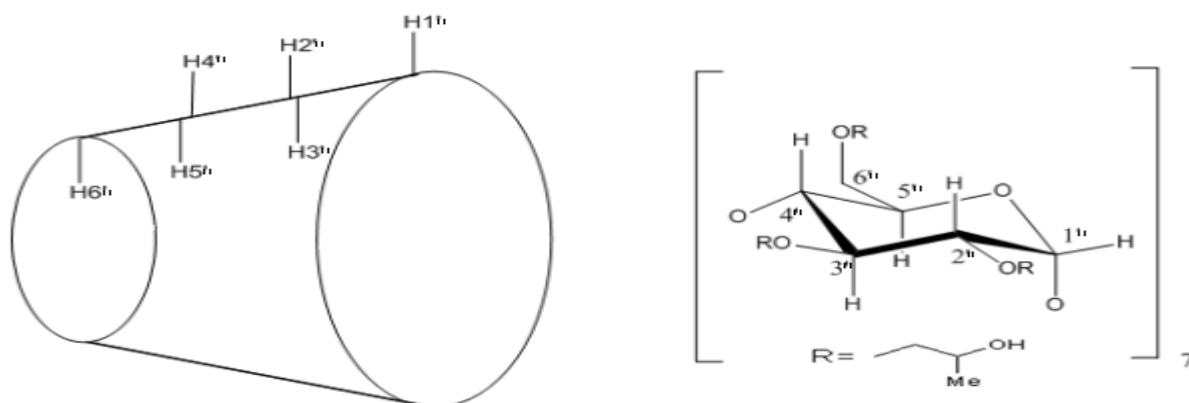


Figura 3.31 – Estrutura e numeração da HP- $\beta$ -CD.

Antes do elucidar acerca das sínteses dos complexos, foi obtido um espectro de RMN da mistura de solventes (Figura 3.32) que iria ser utilizada na caracterização dos complexos obtidos.

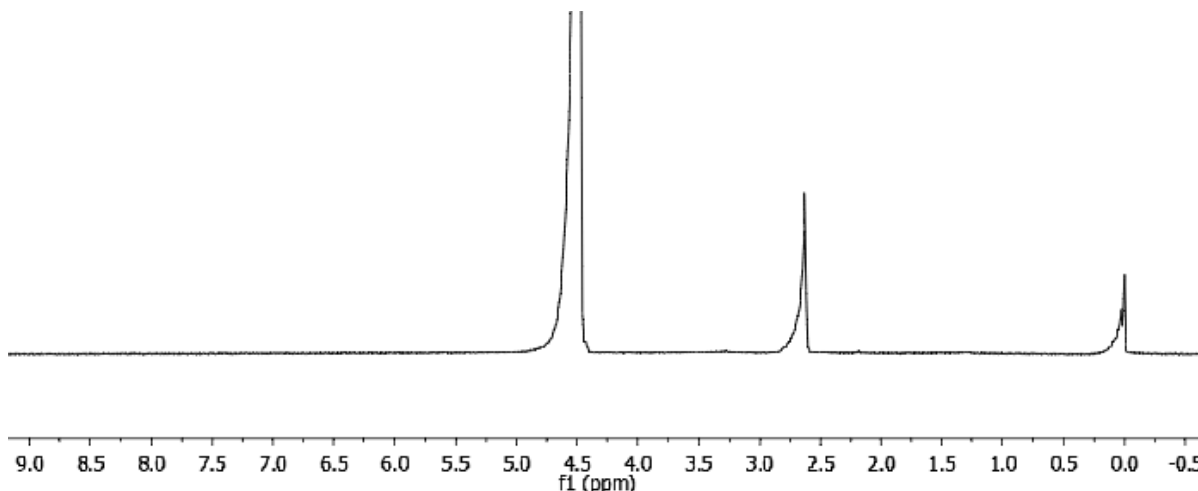


Figura 3.32 – Espectro de RMN<sup>1H</sup> da mistura de solventes (50% DMSO/50% D<sub>2</sub>O).

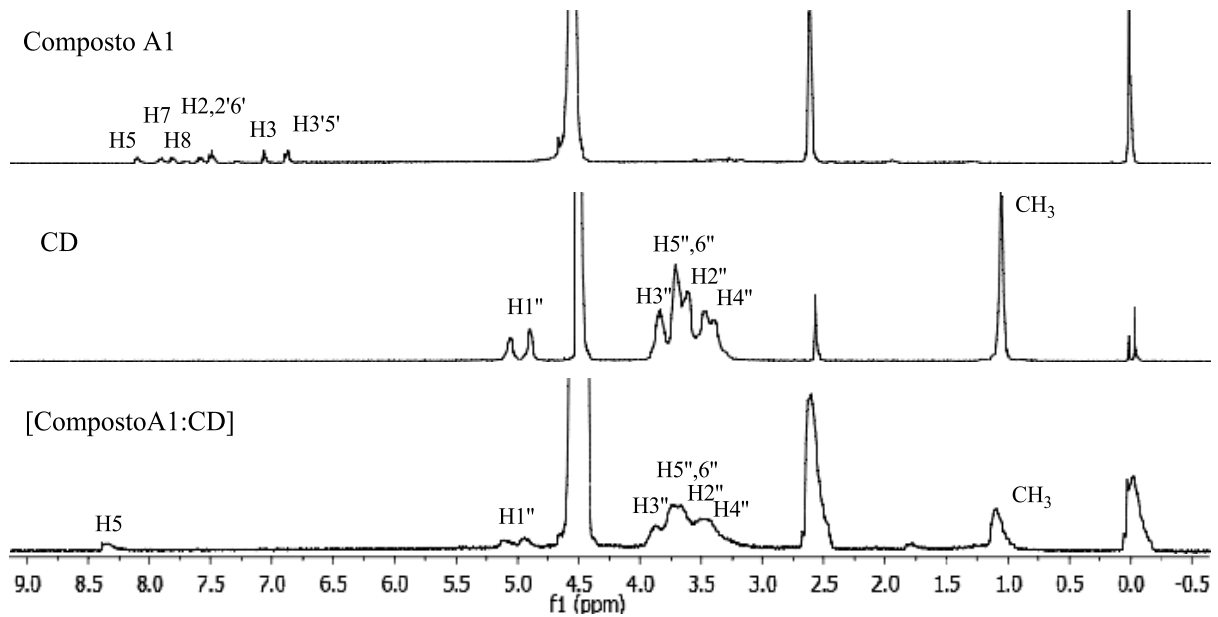
Como podemos observar surgem três picos distintos: o relativo ao TMS aos 0 ppm, o relativo ao DMSO aos 2,63 ppm e o relativo ao D<sub>2</sub>O aos 4,47 ppm. Desta forma podemos excluir a sua análise no estudo dos espectros da complexação mais adiante.

A escolha do método de síntese bem como a sua eficácia depende bastante da natureza da ciclodextrina e do hóspede<sup>41,42</sup>. No presente trabalho o método utilizado foi a síntese por co-evaporação, que como dito anteriormente é o mais utilizado na preparação de complexos deste género e que origina melhores taxas de complexação, utilizando os solventes que originaram melhores resultados nos ensaios de complexação (DMSO e tampão fosfato).

### 3.3.3.1 - Síntese do complexo [Composto A1/HP-β-CD]

**Procedimento:** Num balão reacional dissolveram-se completamente 0,0695 g do Composto A1 em 5 mL de DMSO. Num outro balão de reação foram dissolvidas 0,3606 g de HP-β-CD em 10 mL de tampão fosfato. De seguida juntou-se esta solução ao balão reacional onde se encontrava o Composto A1 dissolvido e deixou-se a reação em agitação constante durante três dias. Após o final da reação, o DMSO e o tampão foram evaporados em modo contínuo de redução de pressão e o sólido obtido lavado com tampão fosfato a frio e posteriormente transferido para a estufa onde permaneceu durante vinte e quatro horas. O sólido de cor branca foi enviado para RMN para caracterização.

**Rendimento:** 75,9%


 Figura 3.33 – Espectros RMN  $^1\text{H}$  relativos à complexação do Composto A1.

Para avaliar a possível ocorrência de complexação entre cromona e HP- $\beta$ -CD foram determinados alguns desvios químicos dos sinais obtidos para o complexo face aos mesmos sinais nos compostos puros foram calculados. (Tabela 3.6)

Tabela 3.6 – Desvios químicos, em ppm, associados à complexação do Composto A1.

	Composto A1	HP- $\beta$ -CD	[A1/HP- $\beta$ -CD]	$\Delta\delta$
H5	8,162	-	8,411	0,249
H3''	-	3,888	3,869	0,019
H5''	-	3,762	3,735	0,027

Como podemos verificar pelos resultados encontrados, observam-se desvios significativos entre os espectros do Composto A1 e CD livres e do respetivo complexo, o que parece indiciar a ocorrência de complexação.

### 3.3.3.2 - Síntese do complexo [Composto A2/HP- $\beta$ -CD]

**Procedimento:** Num balão reacional dissolveram-se completamente 0,0769 g do Composto A2 em 10 mL de DMSO. Num outro balão de reação foram dissolvidas 0,3608 g de HP- $\beta$ -CD em 10 mL de tampão fosfato. De seguida juntou-se esta solução ao balão reacional onde se encontrava o Composto A2 dissolvido e deixou-se a reação em agitação constante durante três dias. Após o final da reação, o DMSO e o tampão foram evaporados em modo contínuo de redução de pressão e o sólido obtido lavado com tampão fosfato a frio e posteriormente transferido para a estufa onde

permaneceu durante vinte e quatro horas. O sólido de cor branca foi enviado para RMN para caracterização.

**Rendimento:** 35,5%

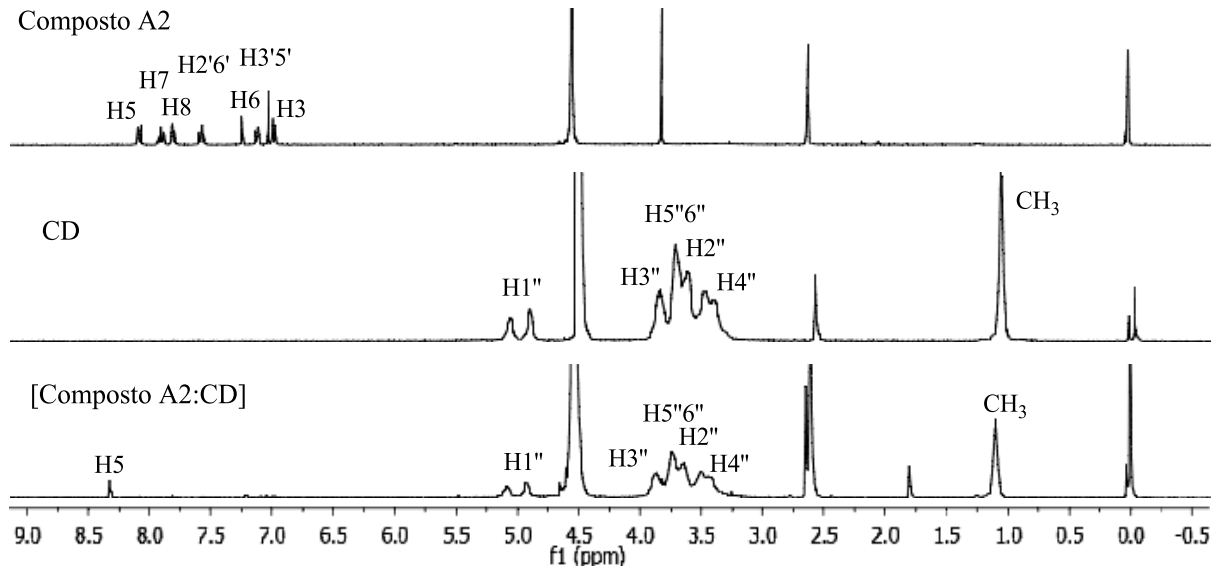


Figura 3.34 – Espectros RMN <sup>1</sup>H relativos à complexação do Composto A2.

Para avaliar a possível ocorrência de complexação entre cromona e HP-β-CD foram determinados alguns desvios químicos dos sinais obtidos para o complexo face aos mesmos sinais nos compostos puros foram calculados (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Desvios químicos, em ppm, associados à complexação do Composto A2.

	Composto A2	HP-β-CD	[A2/HP-β-CD]	Δδ
H5	8,147	-	8,411	0,264
H3''	-	3,888	3,902	0,013
H5''	-	3,762	3,776	0,014

Como podemos verificar pelos resultados encontrados, observam-se desvios significativos entre os espectros do Composto A2 e CD livres e do respetivo complexo, o que parece indiciar a ocorrência de complexação.

### 3.3.3.3 - Síntese do complexo [Composto A3/HP- $\beta$ -CD]

**Procedimento:** Num balão reacional dissolveram-se completamente 0,0728 g do Composto A3 em 7,5 mL de DMSO. Num outro balão de reação foram dissolvidas 0,3603 g de HP- $\beta$ -CD em 10 mL de tampão fosfato. De seguida juntou-se esta solução ao balão reacional onde se encontrava o Composto A3 dissolvido e deixou-se a reação em agitação constante durante três dias. Após o final da reação, o DMSO e o tampão foram evaporados em modo contínuo de redução de pressão e o sólido obtido lavado com tampão fosfato a frio e posteriormente transferido para a estufa onde permaneceu durante vinte e quatro horas. O sólido de cor branca foi enviado para RMN para caracterização.

**Rendimento:** 47,9%

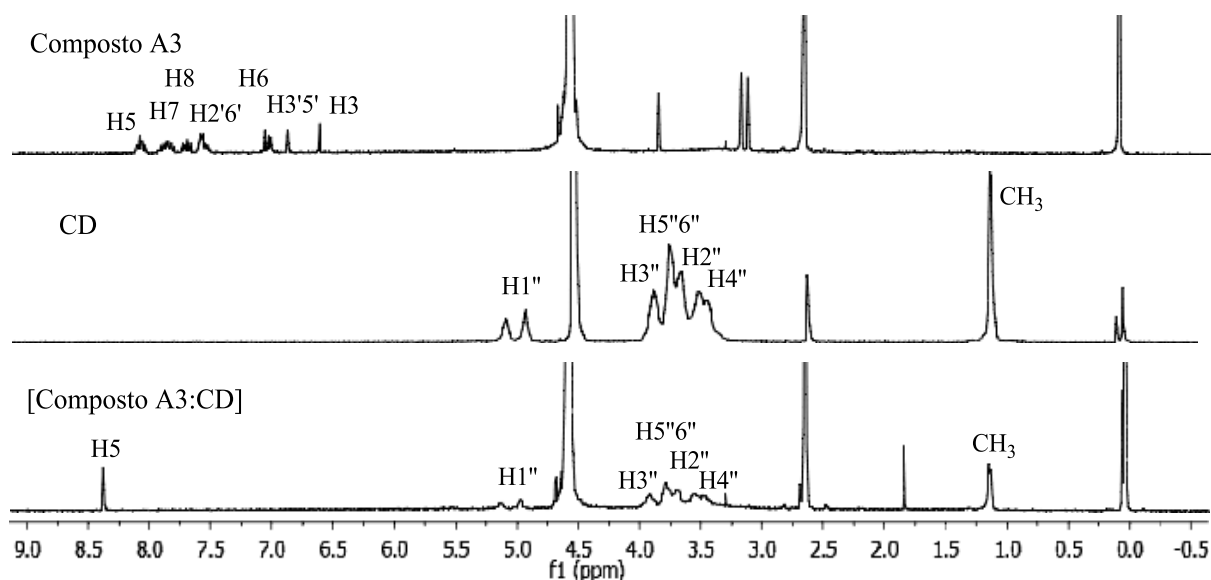


Figura 3.35 – Espectros RMN  $^1\text{H}$  relativos à complexação do Composto A3.

Para avaliar a possível ocorrência de complexação entre cromona e HP- $\beta$ -CD foram determinados alguns desvios químicos dos sinais obtidos para o complexo face aos mesmos sinais nos compostos puros foram calculados (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 – Desvios químicos, em ppm, associados à complexação do Composto A3.

	Composto A3	HP- $\beta$ -CD	[A3/HP- $\beta$ -CD]	$\Delta\delta$
H5	8,144	-	8,415	0,271
H3''	-	3,888	3,916	0,028
H3''	-	3,762	3,786	0,024

Como podemos verificar pelos resultados encontrados, observam-se desvios significativos entre os espectros do Composto A3 e CD livres e do respetivo complexo, o que parece indiciar a ocorrência de complexação.

A existência de apenas um pico relacionado com as cromonas nos espectros dos complexos não é normal pois os mesmos aparecem nas referidas condições no espectro do composto. Este fato pode dever-se à elevada intensidade que os picos dos solventes apresentam. Esta elevada intensidade poderia dever-se à contaminação dos mesmos ou ser esta intensidade responsável por mascarar os picos da cromona menos intensos. Assim sendo, os mesmos espectros foram repetidos com mais acumulações na tentativa de aumentar a intensidade dos picos relativos às cromonas. No entanto o problema persistiu, inviabilizando a obtenção de espectros melhor definidos que os aqui expostos.

Assim sendo, a atribuição do H5 ao pico presente nos complexos e não outro hidrogénio qualquer prende-se com o facto de ser o pico de cromona que aparece naquela zona do espectro nos compostos puros, conduzindo, na ausência de outros picos, ao cálculo dos desvios apenas nesse pico. Por outro lado, na região dos picos da ciclodextrina, os desvios foram calculados para as zonas H3'' e H5'' pois de acordo com a sua estrutura de cone, estes são os que se encontram voltados para o interior da cavidade e desta forma estão mais suscetíveis a ligar-se ao composto de inclusão. A avaliação destes espectros mostra igualmente a existência de desvios para os complexos relativamente aos sinais correspondentes somente à ciclodextrina o que indicia mais uma vez, a ocorrência de complexação com a consequente formação de complexos cromona/HP- $\beta$ -CD.

Os desvios calculados para estes picos foram significativos tal como constatado noutros estudos similares<sup>28,43,44</sup>, pelo que se pode concluir a ocorrência de complexação.

### 3.4 - Titulação de RMN para o complexo [A1/HP- $\beta$ -CD]

Para avaliar a proporção cromona/HP- $\beta$ -CD nos complexos efetuou-se uma titulação por RMN de um dos compostos sintetizados para este estudo (Composto A1).

A titulação de RMN foi realizada nos laboratórios de investigação de Química Orgânica do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

#### 3.4.1 - Instrumentação

- As pesagens foram efetuadas numa balança Sartorius BP 221S;
- O tampão fosfato deuterado foi preparado dissolvendo 0,0228 g de fosfato de potássio monobásico em 2,5 mL de D<sub>2</sub>O e 0,0292 g de fosfato de potássio dibásico em 2,5 mL de

D<sub>2</sub>O. Juntaram-se ambas as soluções e um volume final de 5 mL de tampão fosfato deuterado foi obtido.

- Os espetros de RMN (<sup>1</sup>H) foram obtidos num Bruker Avance III 400, a temperatura ambiente, em misturas 50:50 de DMSO/tampão fosfato deuterado, sempre com TMS como referência interna. Os espetros foram registados a uma frequência de 400.15 MHz, a partir dos quais se calcula o desvio químico ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm).

### 3.4.2 - Soluções

- Foi preparada uma solução 100 mM do Composto A1, dissolvendo 0,0140 g em 500  $\mu$ L de DMSO. Desta solução foram retirados 100  $\mu$ L, aos quais se adicionou 900  $\mu$ L de DMSO para obter uma solução de concentração 10 mM.
- Foi preparada uma solução de 10 mM de HP- $\beta$ -CD, dissolvendo-se 0,0146 g em 1 mL de tampão fosfato deuterado.

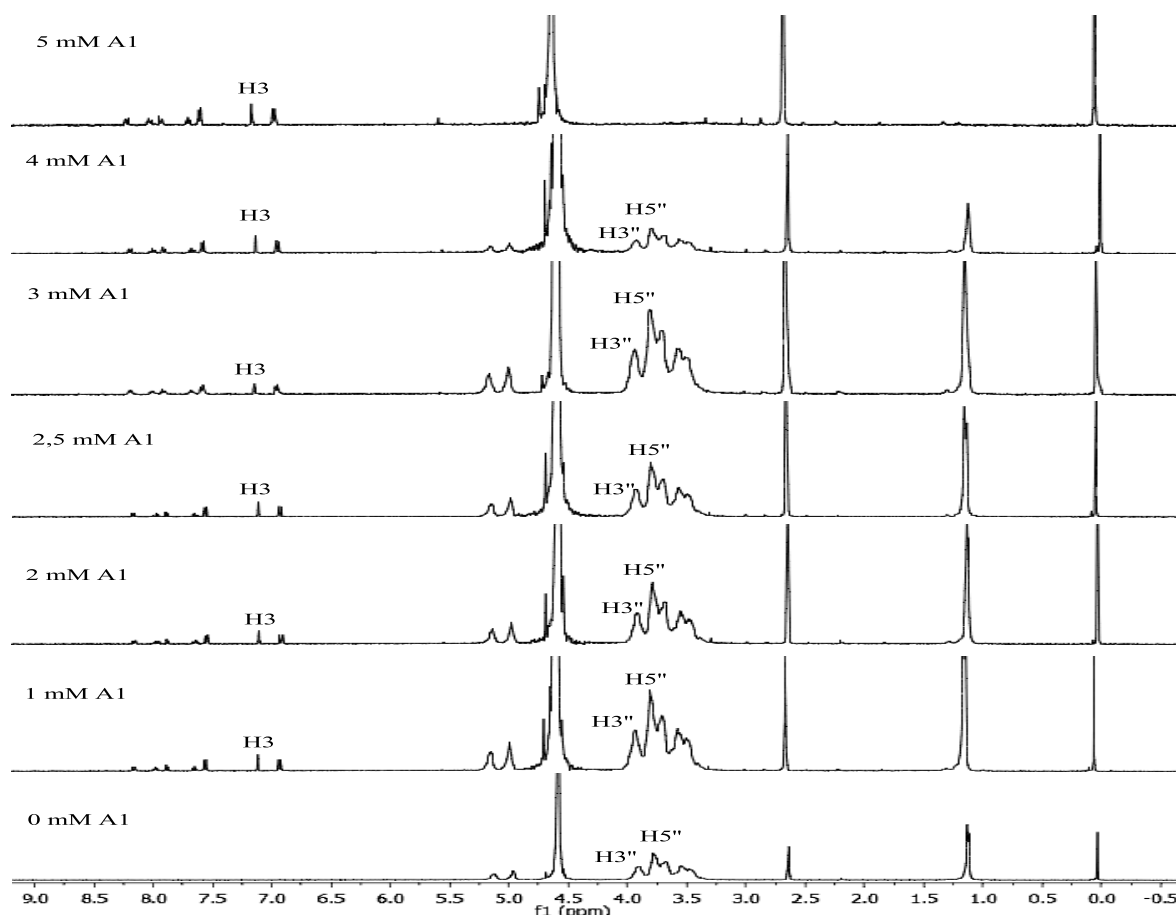
### 3.4.3 - Titulação

A partir destas soluções foram preparados sete tubos de RMN com concentrações diferentes de Composto A1 e HP- $\beta$ -CD. As concentrações utilizadas encontram-se na Tabela 3.9:

Tabela 3.9 – Concentrações para a Titulação de RMN.

Composto A1			HP- $\beta$ -CD		
C (mM)	V <sub>solução</sub> ( $\mu$ L)	V <sub>DMSO</sub> ( $\mu$ L)	C (mM)	V <sub>solução</sub> ( $\mu$ L)	V <sub>Tampão</sub> ( $\mu$ L)
0	-	250	5	250	-
1	50	200	4	200	50
2	100	150	3	150	100
2,5	125	125	2,5	125	125
3	150	100	2	100	150
4	200	50	1	50	200
5	250	-	0	-	250

Os tubos foram agitados durante três dias antes de irem a RMN para garantir que o equilíbrio de complexação fosse alcançado. Durante este período de tempo, os tubos foram agitados manualmente por diversas vezes. Os resultados de RMN <sup>1</sup>H encontram-se sumarizados na Figura 3.36:


 Figura 3.36 – Resultados para a titulação de RMN  $^1\text{H}$ .

Para avaliar a possível ocorrência de complexação, alguns desvios dos sinais obtidos para o complexo face aos mesmos sinais nos compostos puros foram calculados. (Tabela 3.10)

 Tabela 3.10 – Desvios químicos, em ppm, associados à titulação do Composto A1 e HP- $\beta$ -CD.

$ \text{A1} $ (mM)	H3	$\Delta\delta$ H3	H3''	$\Delta\delta$ H3''	H5''	$\Delta\delta$ H5''
0	-	-	<b>3,899</b>	-	<b>3,772</b>	-
1	7,105	0,015	3,900	0,001	3,773	0,001
2	7,109	0,011	3,902	0,003	3,775	0,003
2,5	7,109	0,011	3,902	0,003	3,776	0,004
3	7,112	0,008	3,900	0,001	3,770	0,002
4	7,114	0,006	3,905	0,006	3,781	0,009
5	<b>7,120</b>	-	-	-	-	-

Como podemos verificar na Figura 3.15, o espetro a 0 mM de A1 corresponde à ciclodextrina livre enquanto o espetro a 5 mM de A1 corresponde ao Composto A1 livre. Assim sendo, escolheu-se o hidrogénio H3 da cromona para o cálculo dos desvios por ser um singlete fácil de analisar. Por outro lado, na região dos picos da ciclodextrina, os desvios foram calculados para as zonas H3'' e

H5” pois de acordo com a sua estrutura de cone, estes são os que se encontram voltados para o interior da cavidade e desta forma estão mais suscetíveis a ligar-se ao composto de inclusão.

De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que se observa um desvio mais significativo no H3 da cromona para uma concentração de CD quatro vezes mais elevada, podendo significar a ocorrência de complexação numa proporção diferente de 1:1.

### 3.5 - Calorimetria Diferencial de Varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento, DSC, é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de calor associado a variações de propriedades físicas e/ou químicas de uma substância em função da temperatura, quando essa substância é submetida a um programa de aquecimento ou arrefecimento controlado<sup>45</sup>. Basicamente, consiste em medir a diferença do fluxo de calor entre uma amostra e um material de referência em função da temperatura, enquanto a amostra e a referência são submetidas ao mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado<sup>45-46</sup>.

A medição de calor pode ser feita segundo dois princípios: a compensação do efeito térmico ou a medição de diferenças de temperatura<sup>45</sup>. Consoante o princípio de medição de calor, existem dois tipos de DSC, com fluxo de calor e com compensação de calor<sup>45,47</sup>.

No DSC com fluxo de calor, a diferença de temperatura entre a amostra e a referência é medida em função da temperatura ou do tempo, sob condições de temperatura controlada, sendo a variação do fluxo de calor proporcional à diferença de temperatura. Neste tipo de DSC existe somente uma câmara que contém a amostra e a referência.

Numa curva de DSC, a linha de base pode ser definida como o sinal de fluxo de calor, em função do tempo ou da temperatura, que resulta da capacidade calorífica da amostra sem que ocorram transições<sup>45</sup>. Quando ocorre uma transformação térmica, verifica-se um desvio da linha de base, um pico, podendo esse desvio ser ascendente ou descendente. Em DSC com fluxo de calor o sentido endotérmico é o sentido descendente<sup>47</sup>.

A calorimetria diferencial de varrimento fornece dados qualitativos e quantitativos em processos endotérmicos e exotérmicos, permitindo obter informações relativas a alterações de propriedades físicas e/ou químicas como, por exemplo, temperaturas características (temperatura de fusão, cristalização, transição vítrea), grau de cristalinidade de polímeros, diagramas de fases, entalpias de transição de fase e de reação, estabilidade térmica, grau de pureza, cinética de reacções<sup>46</sup>.

Esta técnica foi desenvolvida e patenteada em 1962 por Watson e O'Neill<sup>48</sup> e desde então tem tido um grande desenvolvimento, constituindo nos dias de hoje uma técnica de elevada importância para a caracterização de materiais, sendo largamente utilizada em áreas de investigação muito

diferentes, assim como em diversas indústrias, por exemplo, indústrias farmacêuticas, alimentares e de cosmética.

Na área farmacêutica, a calorimetria diferencial de varrimento é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, em estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e na identificação de polimorfismo e caracterização das diferentes formas polimórficas, assim como no estudo da formação de complexos<sup>28,49</sup>.

As experiências de DSC foram realizadas nos laboratórios de Química Física do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

### 3.5.1 - Instrumentação

- Os termogramas foram obtidos num calorímetro de marca SETARAM, modelo DSC 141, em atmosfera de azoto com um fluxo de 0,050 L/min, entre 25 °C e 300 °C, com uma velocidade de varrimento de 2 °C/min. Os dados foram recolhidos e tratados com o auxílio do software *SETSOFT* fornecido pelo fabricante;
- Foram utilizados cadinhos de alumínio de 30 ou 100 µL da SETARAM;
- As pesagens dos cadinhos foram efetuadas numa microbalança Mettler Toledo UMT2;
- A calibração do aparelho foi efetuada previamente (2012) por outros utilizadores<sup>50</sup>.

### 3.5.2 - Experiências de DSC

**Procedimento:** Os cadinhos utilizados foram pesados previamente vazios para se obter um par de cadinhos de amostra/referência de massas idênticas, para cada experiência. Foram obtidos termogramas para os compostos A1, A2 e A3, para os respetivos complexos com a HP-β-CD, A1/HP-β-CD, A2/HP-β-CD e A3/HP-β-CD e também para a HP-β-CD. As massas usadas em cada experiência estavam compreendidas entre 5 e 15 mg.

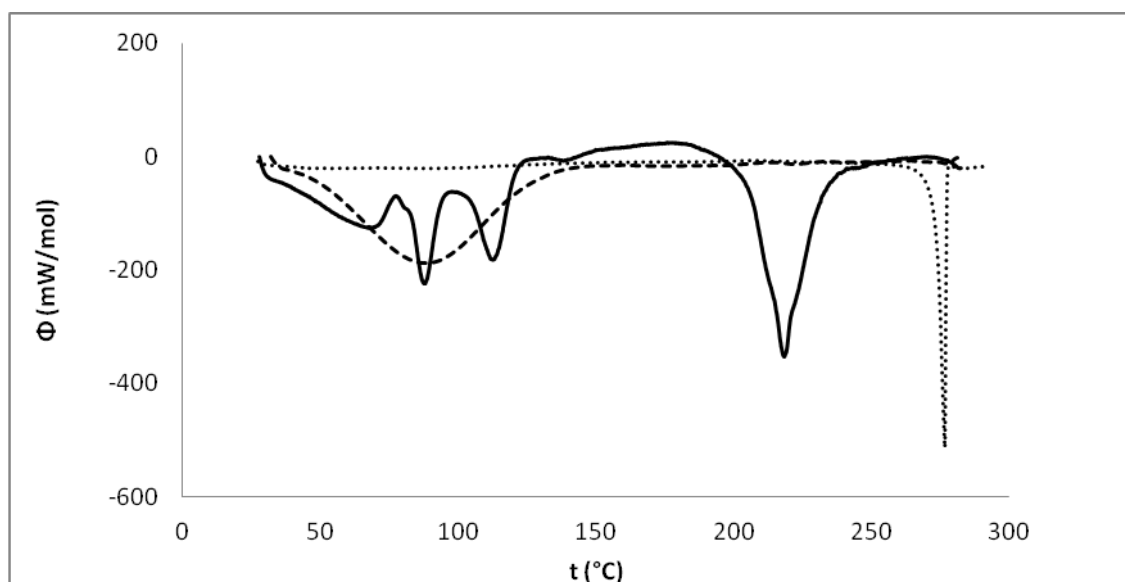
#### Temperaturas de Fusão

Utilizando o módulo *Processing* do software *SETSOFT*, foram determinadas as temperaturas de fusão dos compostos A1, A2 e A3 puros. Para cada experiência, foram efetuadas três integrações utilizando diferentes intervalos de temperatura. Os valores de temperatura de fusão, assim como temperatura do pico, obtidos para cada um dos compostos são apresentados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Temperaturas de Fusão para os Compostos A1, A2 e A3.

	Temperatura de fusão (°C)	Temperatura do Pico (°C)
Composto A1	272,3	275,6
Composto A2	243,3	244,7
Composto A3	213,1	216,8

**Resultados para o estudo da complexação do Composto A1:** Os termogramas obtidos para o conjunto Composto A1, [Composto A1/HP- $\beta$ -CD] e HP- $\beta$ -CD foram sobrepostos, resultando na Figura 3.37:


 Figura 3.37 – Termogramas do Composto A1 (···), do complexo [Composto A1:HP- $\beta$ -CD] (—), e da HP- $\beta$ -CD (---).

Como podemos observar, o termograma do Composto A1 apenas apresenta um pico endotérmico correspondente à sua fusão à temperatura de 276 °C, enquanto o termograma da HP- $\beta$ -CD até aos 300 °C apenas evidencia um pico endotérmico na zona dos 100 °C, que corresponde à saída de moléculas de água do interior da sua cavidade. O termograma do complexo formado evidencia duas zonas características: na primeira observamos dois picos, aos 90 e 115 °C, associados à perda de água do complexo e à perda de água de HP- $\beta$ -CD que eventualmente possa não ter complexado; numa segunda zona do termograma surge um pico endotérmico a 218 °C associado à fusão do Composto A1 complexado. De acordo com a figura podemos verificar a existência de deslocamentos nos picos presentes no complexo relativamente aos picos presentes para o Composto A1 e HP- $\beta$ -CD pura.

**Resultados para o estudo da complexação do Composto A2:** Os termogramas obtidos para o conjunto Composto A2, [Composto A2/HP- $\beta$ -CD] e HP- $\beta$ -CD foram sobrepostos, resultando na Figura 3.38:

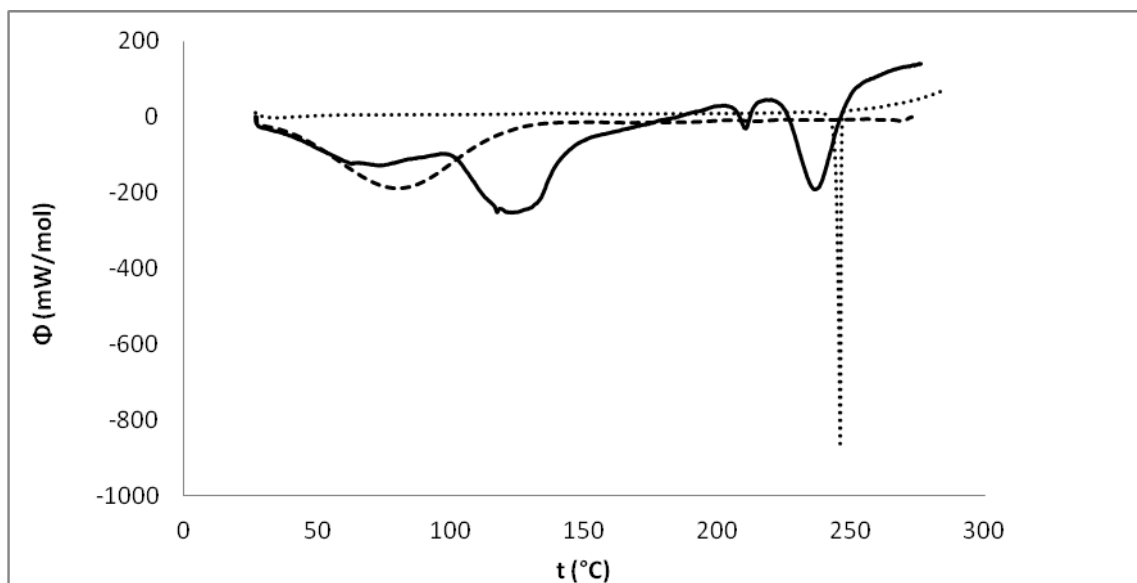


Figura 3.38 – Termogramas do Composto A2 (···), do complexo [Composto A2:HP- $\beta$ -CD] (-·-), e da HP- $\beta$ -CD (- -).

Como podemos observar, o termograma do Composto A2 apenas apresenta um pico endotérmico correspondente à sua fusão à temperatura de 245 °C enquanto o termograma da HP- $\beta$ -CD até aos 300 °C apenas evidencia um pico endotérmico antes dos 100 °C que diz respeito à saída de moléculas de água do interior da sua cavidade. No que diz respeito ao termograma do complexo formado, este evidencia duas zonas características: na primeira observamos um pico entre os 110 e os 130 °C associado à perda de água da HP- $\beta$ -CD complexada; numa segunda zona do termograma, surgem dois picos endotérmicos, a 209 e 235 °C, ambos a uma temperatura inferior à temperatura de fusão do Composto A2. No entanto pensa-se que o pico que surge aos 235 °C poderá corresponder a parte da cromona que não complexou por se encontrar muito próximo do pico de fusão da cromona livre, enquanto o pico que aparece a 209 °C provavelmente corresponde à fusão da cromona complexada, indicando a não ocorrência da total complexação do composto. De acordo com a figura podemos verificar a existência de deslocamentos nos picos presentes no complexo relativamente aos picos presentes para o Composto A2 e HP- $\beta$ -CD pura.

**Resultados para o estudo da complexação do Composto A3:** Os termogramas obtidos para o conjunto Composto A3, [Composto A3/HP- $\beta$ -CD] e HP- $\beta$ -CD foram sobrepostos, resultando na Figura 3.39:

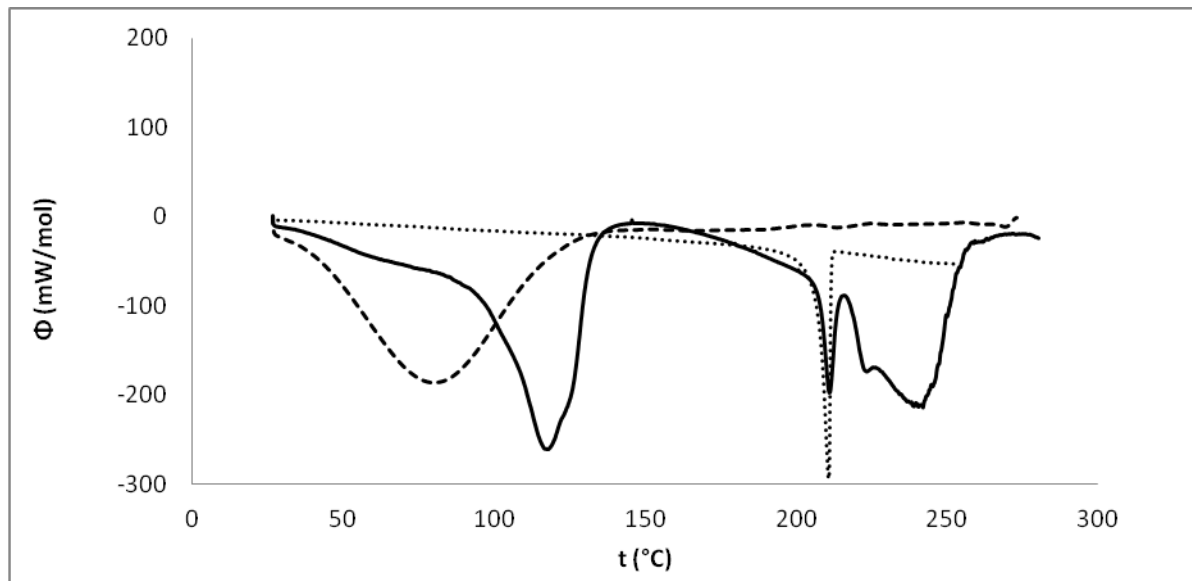


Figura 3.39 – Termogramas do Composto A3 (···), do complexo [Composto A3:HP-β-CD] (—), e da HP-β-CD (---).

Como podemos observar, o termograma do Composto A3 apenas apresenta um pico endotérmico correspondente à sua fusão à temperatura de 217 °C enquanto o termograma da HP-β-CD até aos 300 °C apenas evidencia um pico endotérmico antes dos 100 °C que corresponde à saída de moléculas de água do interior da sua cavidade. O termograma do complexo formado evidencia duas zonas características: na primeira observamos um pico aos 120 °C associado à perda de água da HP-β-CD complexada; numa segunda zona do termograma, surgem dois picos endotérmicos, a 211 e 240 °C associados à fusão do Composto A3. Pensa-se que o primeiro deles poderá corresponder à fusão do Composto A3 que não complexou por se encontrar sobreposto ao pico de fusão da cromona livre, e o segundo, consideravelmente maior, associado à fusão do Composto A3 complexado, indicando a não ocorrência da total complexação do composto. De acordo com a figura podemos verificar a existência de deslocamentos nos picos presentes no complexo relativamente aos picos presentes para o Composto A3 e HP-β-CD pura.

De acordo com um estudo similar<sup>28</sup>, é possível retirar algumas conclusões acerca da existência de complexação no caso de os termogramas dos complexos apresentarem desvios nos picos face aos compostos livres. De igual modo, uma diminuição da área ou desaparecimento do pico de fusão associado ao composto no termograma do complexo é também um sinal da provável ocorrência de complexação.

Com base no referido, a existência de desvios nos termogramas apresentados juntamente com as evidências proporcionadas pelos espetros de RMN <sup>1</sup>H permite afirmar que ocorreu complexação das cromonas com a HP-β-CD ainda que provavelmente não tenha ocorrido em grande extensão.

## 4- Conclusão

Com o objetivo de potenciar a utilização terapêutica das amidas de cromonas sintetizadas (N-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4H-benzopiran-2-carboxamida, N-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-oxo-4H-benzopiran-2-carboxamida e N-(4-metoxifenil)-4-oxo-4H-benzopiran-2-carboxamida), e desta forma torná-las mais biodisponíveis procedeu-se à sua inclusão na cavidade de uma  $\beta$ -ciclodextrina (2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina). A formação destes complexos poderá eventualmente originar um aumento de estabilidade e de solubilidade dos compostos hóspedes.

As amidas de cromonas foram sintetizadas por diversos processos tendo-se conseguido obter compostos puros com rendimentos moderados, e a sua identidade foi confirmada através dos espetros de RMN  $^1\text{H}$ .

Os estudos de complexação evidenciaram que na presença da HP- $\beta$ -CD, a solubilidade das cromonas sintetizadas aumentou significativamente, conduzindo em alguns casos à obtenção valores de constantes de estabilidade elevados. Usando como solvente uma mistura de DMSO/tampão fosfato (1%, 1% e 10% de DMSO respetivamente) obtiveram-se constantes de estabilidade de 646, 263 e 63  $\text{M}^{-1}$  respetivamente para os complexos da cromona A1, A2 e A3.

Os complexos sintetizados posteriormente foram analisados por RMN  $^1\text{H}$  e por DSC, que em conjunto indicam a ocorrência de complexação para cada um dos compostos ainda que não decorra na totalidade.

## 5 - Perspetivas Futuras

No seguimento do trabalho realizado penso que seria adequado realizar uma caracterização mais cuidada dos compostos obtidos de forma a obter informações melhor estruturadas e definidas, quer pelas mesmas técnicas, quer com a introdução de novas técnicas nomeadamente espectroscopia de infravermelho (FTIR), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e também eletroquímica.

Numa perspetiva futura seria interessante experimentar o efeito da utilização de outra  $\beta$ -CD, bem como sintetizar e testar a complexação com outras cromonas de forma a potenciar o aumento da solubilidade desta família de compostos de forma a permitir o seu melhor uso em ensaios biológicos sem perder a atividade que lhes é conhecida.

## 6 - Bibliografia

1. Peixoto, F.; Barros, A. I.; Silva, A. M., *Interactions of a new 2-styrylchromone with mitochondrial oxidative phosphorylation*, J. Biochem. Mol. Toxicol., **2002**, 16 (5), 220-226;
2. Bartel, D., *Comprehensive Organic Chemistry: the synthesis and reactions of organic compounds*. Pergamon Press ed.; **1979**; Vol. 4: Heterocyclic Compounds;
3. Mazzei, M.; Dondero, R.; Sottofattori, E.; Melloni, E.; Minafra, R., *Inhibition of neutrophil O(2)(-) production by unsymmetrical methylene derivatives of benzopyrans: their use as potential antiinflammatory agents*, Eur. J. Med. Chem., **2001**, 36 (11-12), 851-861;
4. Bernstein, P. R., *Chemistry and structure-activity relationships of leukotriene receptor antagonists*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., **1998**, 157 (6 Pt 1), S220-226;
5. Hadjeri, M.; Barbier, M.; Ronot, X.; Mariotte, A. M.; Boumendjel, A.; Boutonnat, J., *Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues*, J. Med. Chem., **2003**, 46 (11), 2125-2131;
6. Edwards, A. M.; Howell, J. B., *The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr R. E. C. Altounyan*, Clin. Exp. Allergy, **2000**, 30 (6), 756-774;
7. Bruhlmann, C.; Ooms, F.; Carrupt, P. A.; Testa, B.; Catto, M.; Leonetti, F.; Altomare, C.; Carotti, A., *Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase*, J. Med. Chem., **2001**, 44 (19), 3195-3198;
8. Gaspar, A.; Teixeira, F.; Uriarte, E.; Milhazes, N.; Melo, A.; Cordeiro, M. N. D. S.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; Borges, F., *Towards the discovery of a novel class of monoamine-oxidase inhibitors: Structure-Property-Activity and Docking studies on chromone amides*, ChemMedChem, **2011**, 6 (4), 628-632;
9. Johnston, J. P., *Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue*, Biochem. Pharmacol., **1968**, 17 (7), 1285-1297;
10. Foley, P.; Gerlach, M.; Youdim, M. B.; Riederer, P., *MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders?*, Parkinsonism Relat. Disord., **2000**, 6 (1), 25-47;
11. De Colibus, L.; Li, M.; Binda, C.; Lustig, A.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A., *Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **2005**, 102 (36), 12684-12689;

12. Galva, M. D.; Bondiolotti, G. P.; Olasmaa, M.; Picotti, G. B., *Effect of aging on lazabemide binding, monoamine oxidase activity and monoamine metabolites in human frontal cortex*, J. Neural Transm. Gen. Sect., **1995**, 101 (1-3), 83-94;
13. Saura, J.; Andres, N.; Andrade, C.; Ojuel, J.; Eriksson, K.; Mahy, N., *Biphasic and region-specific MAO-B response to aging in normal human brain*, Neurobiol. Aging, **1997**, 18 (5), 497-507;
14. Stoessl, A. J., *Etiology of Parkinson's disease*, Can. J. Neurol. Sci., **1999**, 26 Suppl. 2, S5-12;
15. Cordato, D. J.; Chan, D. K., *Genetics and Parkinson's disease*, J. Clin. Neurosci., **2004**, 11 (2), 119-123;
16. Lang, A. E.; Lozano, A. M., *Parkinson's disease. First of two parts*, N. Engl. J. Med., **1998**, 339 (15), 1044-1053;
17. Dias, J. A.; Felgueiras, M. M.; Sanchez, J. P.; Goncalves, J. M.; Falcao, J. M.; Pimenta, Z. P., *The prevalence of Parkinson's disease in Portugal. A population approach*, Eur. J. Epidemiol., **1994**, 10 (6), 763-767;
18. Albert, A., *Chemical aspects of selective toxicity*, Nature, **1958**, 182 (4633), 421-2.
19. Banerjee, A., et al., *Encapsulation of Prodan in beta-cyclodextrin environments: A critical study via electronic spectroscopy and molecular mechanics*, J. of Mol. Struct., **2006**, 794 (1-3), 181-189;
20. Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*, Process Biochemistry, **2004**, 39 (9), 1033-1046;
21. Marques, H. M. C., *A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles*, Flavour Frag. J., **2010**, 25, 313-326;
22. Hedges, A. R., *Industrial Applications of Cyclodextrins*, Chem. Rev., **1998**, 98, 2035-2044;
23. Aguiar, C. L., *Ciclodextrina Glicosiltransferase, Produção, Ação e Aplicação*, B. CEPPA, Curitiba, **2001**, 19 (1), 119-138;
24. Silva, M. R., *Formulação Líquida Oral do Acetato de Hidrocortisona Incluso em Ciclodextrina: Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica*, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, **2005**;

25. Boogaard, M., *Cyclodextrin-containing Supramolecular Structures, from pseudo-polyrotaxanes towards molecular tubes, insulated molecular wires and topological networks*, University of Groningen, The Netherlands, **2003**;
26. Larsen, K. L. and Zimmermann, W., *Analysis and characterisation of cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis*, J. of Chrom. A, **1999**, 836 (1), 3-14;
27. Rahemi, V.; Vandamme, J.; Garrido, J.; Borges, F.; Brett, C.; Garrido, E. M., *Enhanced host-guest electrochemical recognition of herbicide MCPA using a  $\beta$ -cyclodextrin carbon nanotube sensor*, Talanta, **2012**;
28. Garrido, E. M.; Santos, M.; Silva, P.; Cagide, F.; Garrido, J.; Borges, F., *Host-guest complexes of phenoxy alkyl acid herbicides and cyclodextrins. MCPA and  $\beta$ -cyclodextrin*, J. of Env. Sci. and Health, Part B, **2012**, 47, 869-875;
29. Ganguly, A. K.; Kaur, S.; Mahata, P. K.; Biswas, D.; Pramanik, B. N.; Chan, T. M., *Synthesis and properties of 3-acyl-[gamma]-pyrones, a novel class of flavones and chromones*, Tetrahedron Lett., **2005**, 46 (23), 4119-4121;
30. Fillion, E.; Dumas, A. M.; Kuropatwa, B. A.; Malhotra, N. R.; Sitler, T. C., *Yb(OTf)<sub>3</sub>-catalyzed reactions of 5-alkylidene Meldrum's acids with phenols: one-pot assembly of 3,4-dihydrocoumarins, 4-chromanones, coumarins, and chromones*, J. Org. Chem., **2006**, 71 (1), 409-412;
31. Ishiki, H. M.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E., *Electronic structure of chromone and its hydroxylated derivatives on positions 2 and 3*, J. of Mol. Struct.: THEOCHEM, **1998**, 423 (3), 235-243;
32. Trost BM, F. I., *Comprehensive Organic Synthesis - selectivity, strategy & efficiency in modern organic chemistry*, Pergamon Press, **1991**; Vol. Volume 6: Heteroatom manipulation;
33. Kim, M. H.; Patel, D. V., *"BOP" as a reagent for mild and efficient preparation of esters*, Tetrahedron Lett., **1994**, 35 (31), 5603-5606;
34. Montalbetti, C. F., V., *Amide bond formation and peptide coupling*, Tetrahedron **2005**, 61, 10827-10852;
35. Cagide, F.; Reis, J.; Gaspar, A.; Borges, F., *Accelerating lead optimization of chromone carboxamide scaffold throughout microwave-assisted organic synthesis*, Tetrahedron Letters, **2011**, 52, 6446-6449;

36. Rajan, P.; Vedernikova, I.; Cos, P.; Berghe, D. V.; Augustyns, K.; Haemers, A., *Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11 (2), 215-217;
37. Pavia, Lampman, Kriz, Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, Fourth Edition, Brooks/Cole, **2009**;
38. Higuchi, T., Connors, K.A., *Phase-solubility techniques*, *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, **1965**, 4, 117-122;
39. Yang, B.; Lin, J.; Chen, Y.; Liu, Y., *Artemether/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 6311–6317;
40. Julian, C.; Morales-Montecinos, J.; Zapata-Torres, G.; Aguilera, B.; Rodriguez, J.; Arán, V.; Olea-Azar, C., *NMR characterization, phase solubility, and molecular modelling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 5078-5084;
41. Palmeiri, G. F.; Angeli, D. G.; Giovannucci, G.; Martelli, S., *Inclusion of methoxybutropate in  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins: Comparison of preparation methods*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1997**, 23, 27-37;
42. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K., *Cyclodextrins in drug delivery: na updated review*, *AAPS PharmSciTech*, **2005**, 6, E329-E357;
43. Ejchart, A.; Kozminski, W., *NMR of  $\beta$ -cyclodextrins and their complexes*, In *Cyclodextrins and Their Complexes*, Dodziuk, H., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, 231-254;
44. Singh, R.; Bharti, N.; Madan, J.; Hiremath, S. N., *Characterization of cyclodextrin inclusion complexes-a review*, *J.P.S.T.*, **2010**, 2, 171-183;
45. Höhne, G. W. H.; Hemminger, W. F.; Flammersheim, H. J., *Differential Scanning Calorimetry*, Second Edition, Springer, **2003**;
46. Casimiro, M. H.; Leal, J. P.; Gil, M. H.; Castro, C. A. N., *Análise Calorimétrica Aplicada a Polímeros Biológicos*, *Boletim SPQ*, **2006**, 98, 29-35;
47. Brown, M. E., *Introduction to Thermal Analysis*, Chapman & Hall, New York, **1988**;
48. Watson, S.; O'Neill, M. J., *United States Patent Office 3263484*, **1962**;
49. Ramakrishnan, M.; Kenoth, R.; Kamlekar, R. K.; Chandra, M. S.; Radhakrishnan, T. P.; Swami, M. J., *N-Myristoylethanolamine-cholesterol (1:1) complex: first evidence from*

*differential scanning calorimetry, fast-atom-bombardment mass spectrometry and computational modelling*, FEBS Letters, **2002**, 531, 343-347;

50. Lima, C. F. R. A. C.; Costa, J. C. S.; Rodrigues, A. S. M. C.; Rocha, I. M., *Comunicação pessoal*, **2012**.