

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E
QUIMIOMÉTRICOS SOBRE
PIROXICAM**

Tese de Doutorado

Autor: José Antonio Martins

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine



M366E

Campinas, Março de 1998.

9819082

*Dedico esse trabalho à minha família
Que me deram a preciosa
Oportunidade de viver
Aos meus pais e a Renata
que sempre estiveram ao meu
lado durante todo o tempo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de uma maneira ou de outra, direta ou indiretamente, me auxiliaram neste estudo. Mas acima de tudo agradeço a Deus por ter-me dado forças e permitido a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine pela amizade, companheirismo e paciência nas inúmeras discussões e pelo inestimável auxílio.

Aos colegas de grupo. Reinaldo, Débora, Lauro, Regina, Diniz, João, Ide, Marcio, Carla e Leandro pelas discussões e sugestões durante todo o período em que estive trabalhando nesta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Química, que sempre me ajudaram, e em especial à Cláudia, Helena, Cássia, Renata e Ercília.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

À Pfizer e Co., por ter gentilmente cedido a droga Piroxicam, objeto desta investigação.

À American Maize-Products Company, por ter gentilmente cedido as ciclodextrinas usadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Custódio, pelas discussões e sugestões acerca dos cálculos semi-empíricos realizados neste trabalho.

Ao Prof. Pedro Vazquez, pelas sugestões durante a realização dos cálculos semi-empíricos.

Ao CENAPAD e ao Centro de Computação do Instituto de Química/UNICAMP, pela disponibilização dos computadores para a realização dos cálculos.

Ao Prof. Dr. Roney Jesus Poppi e ao Marcelo Senna, pelas discussões e sugestões a respeito da utilização do programa PARAFAC nos cálculos de deconvolução espectral.

À Profa. Dr. Heloise de Oliveira Pastori, por haver gentilmente emprestado o pHmetro.

Aos professores Drs. Celso U. Davanzo e Célio Pasquini, por ter cedido o programa para a conversão dos espectros de IV.

À Prof. Maria Isabel Felisberti, pelas discussões sobre dos diagramas de TGA e DSC utilizados na caracterização do complexo β -CD-PRX.

Ao Prof. Dr. Duran, pela utilização do liofilizador na preparação do complexo β -CD-PRX.

Ao projeto PADCT II/FAPESP, pela aquisição dos equipamentos utilizados na coleta dos dados experimentais.

*"Nascer, morrer, renascer ainda e
progredir sem cessar, tal é a lei."*

Allan Kardec

RESUMO

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E QUIMIOMÉTRICOS SOBRE PIROXICAM

Autor: José Antonio Martins
Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Palavras-chave: Piroxicam, quimiometria, análise conformacional.

O Piroxicam, classificado como uma droga anti-inflamatória não esteroide, é um potente agente terapêutico (com meia vida de aproximadamente 30h no organismo) contra uma série de desequilíbrios orgânicos e, por essa razão, é utilizado como analgésico e anti-inflamatório como, por exemplo, em dores pós-operatórias, pós-parto, dentais, fraturas, etc.. Essa droga induz fotoalergia e/ou fototoxicidade em aproximadamente 1% dos pacientes em tratamento clínico. Entretanto, as causas desse efeito não estão completamente esclarecidas, o que abre campo para uma série de investigações e em especial aquelas que abordam conhecimentos químicos. Informações disponíveis na literatura a respeito da droga, como determinados comportamentos espectroscópicos, juntamente com algumas técnicas já desenvolvidas tanto para a coleta (instrumentos hifenizados) como para o tratamento de dados (PARAFAC) foram utilizadas para a construção de alguns modelos que poderão ser utilizados em futuras investigações para dar pistas sobre o referido efeito. O sistema estudado é complexo no sentido de que a droga possui vários equilíbrios químicos e, portanto, pode se apresentar de várias formas diferentes, como por exemplo, a forma cetônica ou enólica, e a quantidade dessas espécies químicas varia em função do meio, isto é, da disponibilidade protônica, polaridade, grau de organização, etc.. Para a investigação de um sistema com tal complexidade foram elaborados alguns planejamentos experimentais, de modo que a máxima quantidade de informações pudesse ser extraída com o mínimo esforço. Os experimentos procuraram contemplar informações disponíveis na literatura, a fim de que algumas delas pudessem ser posteriormente confrontadas com as obtidas neste trabalho. Contudo, como a quantidade de dados é muito grande, há necessidade de ferramentas de análise para que os mesmos possam ser integralmente aproveitados. Nesse sentido a Quimiometria tem avançado recentemente, pois inúmeras aplicações já podem ser encontradas na literatura, onde sistemas cada vez mais complexos têm a chance de ser estudados. Utilizando-se dessas ferramentas de análise para tratamento de dados de luminescência total obtidos neste trabalho, bem como de alguns resultados obtidos da análise conformacional, via cálculos semi-empíricos (MOPAC/AM1), algumas propostas foram feitas na tentativa de atribuição de bandas de excitação-emissão às espécies químicas da droga. Algumas dessas espécies podem ser os agentes causadores dos efeitos colaterais que determinados pacientes apresentam.

ABSTRACT**SPECTROSCOPIC AND CHEMOMETRICS STUDIES ABOUT PIROXICAM**

Author: José Antonio Martins

Advisor: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Key words: Piroxicam, chemometrics, conformational analysis.

Piroxicam is a nonsteroidal anti-inflammatory drugs and quite efficient in the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory disorders in humans. The drug is highly potent, has a long half-life of over 30 hours, but shortly after piroxicam became widely available for clinical use, it became apparent that the agent was a photosensitizer in less than 1% of patients. However, attempts to demonstrate phototoxicity in humans, laboratory animals, and cells cultures have not been successful and this is a field for investigation. Some information available in the literature about spectroscopy data of the drug and others acquired in this work were used to build models to help understanding or to find some clues about its side effects. Piroxicam was shown to have 12 possible tautomers, the tautomeric shifts resulting from fast internal proton transfer being unusually sensitive to changes in chemical substitution, solvent, and temperature. Some experimental designs were elaborated to research this system and to acquire a large amount of data with the least effort. A large quantity of data on a system increases the chance of finding relevant data, if the experimental design. However, a lot data require mathematics tools to the correctly ascertained. In this way, Chemometrics has shown much progress since many papers on it can be found in the literature and complex systems have a chance to be studied. An experiment was planned to assess information, and PARAFAC was utilized to treat total luminescence data acquired from piroxicam cyclodextrins in aqueous medium. Knowledge derived from study of conformational analysis of piroxicam, via MOPAC/AM1, along with results obtained from PARAFAC treatment and literature data were used to make some proposals about piroxicam species and its spectroscopic behavior.

Curriculum Vitae Resumido

Dados pessoais:

Nome completo: José Antonio Martins

Filiação: Antonio Martins Filho e Maria Aricetto Martins

Local e data de nascimento: Itapira – SP; 25/05/68.

Formação acadêmica:

Bacharel em Química – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Araraquara, Dezembro de 1990 (Classificado entre os três melhores alunos da turma).

Atividades extra curriculares:

- Monitoria no Departamento de Química Geral e Inorgânica nas disciplinas Química Geral II e Química Geral e Experimental II - Instituto de Química de Araraquara – Financiadora: Coordenadoria de assistência ao aluno. Período: 01/08/88 a 30/12/88.
- Coordenador adjunto na comissão organizadora do “Show da Química” do Instituto de Química de Araraquara na XIX Semana da Química Internacional “Prof. Dra. Denise L. G. Fromateau Gastmans”. Período: 16 a 21 de outubro de 1989.
- Membro da comissão de divulgação do curso de Química do Instituto de Química de Araraquara. Período: 07/90 a 12/90.
- Estágio em controle de qualidade e produção Nestlé Ind. Com. Ltda Araraquara. Financiadora: Centro de Integração Empresa Escola. Período: 02/01/91 a 31/03/91.
- Secretário da Associação de Pós-graduandos da Química – Instituto de Química Universidade Estadual de Campinas. Período: 11/94 a 10/95.
- Representante Titular do corpo discente de pós-graduação junto ao Departamento de Físico-química do Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas. Período: 03/94 a 03/95.
- Representante Titular do corpo discente de pós-graduação junto ao Conselho Interdepartamental do Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas. Período: 09/95 a 09/96.

SUMÁRIO

Capítulo I: Introdução	1
Capítulo II: Objetivos	17
Capítulo III: Materiais e métodos	19
III.1 Preparação dos complexo β -CD-PRX	20
III.2 Estudos teóricos sobre conformações moleculares do Piroxicam através de cálculos semi-empíricos	22
III.3 Estudo fotofísico do Piroxicam em meio hidrofílico em presença de ciclodextrinas	27
III.4 Tratamento dos dados. Deconvolução espectral via PARAFAC	34
III.5 Reconstituição espectral dos dados deconvoluídos	37
Capítulo IV – Resultados e discussões	40
IV.1 – Caracterização do complexo β -CD-PRX	41
IV.2 – Estudos teóricos sobre conformações moleculares do Piroxicam através de cálculos semi-empíricos e	51
IV.3 – Estudo fotofísico do Piroxicam em meio hidrofílico em presença de ciclodextrinas	70
Capítulo V – Conclusões	90
Capítulo VI – Estudos futuros	93
Capítulo VII – Anexos	96
Anexo I – Espectroscopia de absorção e de emissão	97
Anexo II - PARAFAC. Um método multidimensional de deconvolução. . . .	114
Referências bibliográficas	126

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I.1 – Fórmulas estruturais e moleculares de algumas ciclodextrinas	2
FIGURA I.2 – Fórmulas estruturais de complexos formados entre ciclodextrinas e algumas moléculas orgânicas: A) Eritrosina B- γ -CD, B) Rosa de bengala- γ -CD e C) Eritrosina B- α -CD (Flamigni (1994))	5
FIGURA I.3 – Fórmulas estruturais de alguns complexos formados entre o benzaldeído e os três tipos mais comuns de ciclodextrina: A) complexo do tipo 1:1, B) complexo do tipo 2:2 e C) complexo do tipo 1:2 (Rao e Turro (1989))	6
FIGURA I.4 – Piroxicam em equilíbrio ceto-enólico	8
FIGURA I.5 – Alguns metabólitos do PRX (Kochevar et al (1986))	9
FIGURA I.6 – Alguns fotoprodutos do PRX: A) <i>N</i> -(-piridil)oxalamida e B) <i>N</i> -metilsacarina (Serrano et al (1990))	10
FIGURA I.7 – Complexo formado entre a β -CD e o PRX (Kim et al (1993))	10
FIGURA I.8 – Algumas formas canônicas “zwitterion” do PRX (Geckle et al (1989))	11
FIGURA I.9 – Mecanismo de $T_{1,ar}$ PEE do PRX em meio hidrofóbico (Cho et al (1994)) ...	12
FIGURA I.10 – Algumas espécies nos estados fundamental e excitado do PRX (Cho et al (1994))	13
FIGURA III.2.1 – Formas enólica e cetônica do PRX utilizadas para obtenção das superfícies de energia potencial	24
FIGURA III.2.2 - Modo de agrupamento dos espectros de excitação para a formação da matriz de dados, ou a superfície de emissão total	25
FIGURA III.3.1 – Representação geométrica do planejamento fracionário cúbico de face centrada com uma amostra central Variável A: concentração de PRX. Variável B: tipo de ciclodextrina. Variável C: concentração de oxigênio (conforme TAB. III.3.1)	29
FIGURA III.3.2 - Modo de agrupamento dos espectros de excitação para a formação da matriz de dados, ou a superfície de emissão total, e para a formação do paralelepípedo de dados	31
FIGURA III.3.3 – Vista lateral a) e de topo b) da cubeta com detalhes referentes à luz utilizada para excitar as amostras	33
FIGURA III.5.1 – Resultados dos cálculos de deconvolução via PARAFAC para o conjunto do X-beta (seção III.3): a) “loadings” para o primeiro modo , b) “loadings” para o segundo modo e c) “loadings” para o terceiro modo (+ CP1, o CP2 e – CP3)	37

FIGURA III.5.2 – Resultados dos cálculos de reconstituição da amostra 13 do conjunto do X-beta. Perfil de excitação-emissão para: a) primeiro componente, b) segundo componente, c) terceiro componente e d) amostra reconstituída segundo ESQ. III.5.1	39
FIGURA IV.1.1 – Espectros de IV do PRX, β -CD, MF e β -CD-PRX	41
FIGURA IV.1.2 – Espectros de IV do PRX, β -CD, MF e β -CD-PRX (região entre 1800 e 1000 cm^{-1} , ampliada da FIG. IV.1.1)	42
FIGURA IV.1.3 – Diagramas de análise termogravimétrica para: a) PRX, b) β -CD, c) MF e d) β -CD-PRX	44
FIGURA IV.1.4 – Diagramas de calorimetria diferencial de varredura para: a) PRX, b) β -CD, c) MF e d) β -CD-PRX	46
FIGURA IV.1.5 – Difractogramas de raios-X para: PRX, β -CD, MF e β -CD-PRX	47
FIGURA IV.1.6 – Fotografias de microscopia eletrônica de varredura: a1) β -CD (200x), a2) β -CD (1500x), b1) PRX (200x) e b2) PRX (1500x)	49
FIGURA IV.1.7 – Fotografias de microscopia eletrônica de varredura: a1) β -CD-PRX (200x), a2) β -CD-PRX (1500x), b1) MF (200x) e b2) MF (1500x)	50
FIGURA IV.2.1. a) PRX em equilíbrio ceto-enólico; b) e c) energia total do sistema em função dos ângulos diedros 1 e 2 (em graus) para as formas enólica e cetônica do PRX, respectivamente; d) e e) momento de dipolo total da molécula em função dos ângulos diedros 1 e 2 (em graus) para as formas enólica e cetônica do PRX, respectivamente	51
FIGURA IV.2.2 – Carga líquida (Mulliken) dos átomos H(13), C(23), O(24), N(25), H(26) e N(32) em função da variação dos ângulos diedros 1 e 2 (em graus) para a forma enólica. .	55
FIGURA IV.2.3 – Carga líquida (Mulliken) dos átomos O(12), C(22), O(23), N(24), H(25) e N(31) em função da variação dos ângulos diedros 1 e 2 (em graus) para a forma cetônica ..	56
FIGURA IV.2.4 – Duas formas de visualização das estruturas dos conformeros enólicos correspondentes aos mínimos da superfície de energia total (FIG. IV.2.1 b)	58
FIGURA IV.2.5 – Duas formas de visualização das estruturas dos conformeros cetônicos correspondentes aos mínimos da superfície de energia total (FIG. IV.2.1 c)	59
FIGURA IV.2.6 – Vista lateral das superfícies de emissão total para as soluções de PRX de (TAB. III.2.2)	64
FIGURA IV.2.7 – Vista de topo das superfícies de emissão total para as soluções de PRX (TAB. III.2.2)	65

- FIGURA IV.3.1 – Alguns resultados de emissão total obtidos para o conjunto Q e P conforme especificado nas TAB. III.3.2 e TAB. III.3.1 respectivamente (seção III.3); a) Q, b) X-beta, c) X-alfa e d) X-gama 70
- FIGURA IV.3.2 – Alguns exemplos de amostras reconstituídas para os conjuntos Q e P: a) Solução 5, b) Ensaio 13, c) Ensaio 14 e d) Ensaio 15 e os resíduos das correspondentes amostras: a'), b'), c') e d') 72
- FIGURA IV.3.3 – Erro médio para cada conjunto de dados tratados nos modos excitação e emissão respectivamente: a) e a') Q, b) e b') X-alfa, c) e c') X-beta e d) e d') X-gama ... 73
- FIGURA IV.3.4 – Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto Q com quatro componentes (+ CP1, o CP2, – CP3 e * CP4): a) “loadings” para o primeiro modo, correspondentes ao perfis dos espectros de excitação, b) “loadings” para o segundo modo, correspondentes aos perfis dos espectros de emissão, c) “loadings” para o terceiro modo, correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes 76
- FIGURA IV.3.5 - Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto X-alfa com três componentes (+ CP1, o CP2 e – CP3): a) “loadings” para o primeiro modo correspondentes aos perfis dos espectros de excitação, b) “loadings” para o segundo modo correspondentes aos perfis dos espectros de emissão, c) “loadings” para o terceiro modo correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes 77
- FIGURA IV.3.6 - Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto X-beta com três componentes (+ CP1, o CP2 e – CP3): a) “loadings” para o primeiro modo correspondente ao perfis dos espectros de excitação, b) “loadings” para o segundo modo correspondente aos perfis dos espectros de emissão, c) “loadings” para o terceiro modo correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes 78
- FIGURA IV.3.7 – Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto X-gama com dois componentes (+ CP1 e o CP2): a) “loadings” para o primeiro modo correspondente ao perfis dos espectros de excitação, b) “loadings” para o segundo modo correspondente aos perfis dos espectros de emissão, c) “loadings” para o terceiro modo correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes 79
- FIGURA IV.3.8 – Representação geométrica do planejamento cúbico de face centrada com uma amostra central. Variável A: concentração de PRX. Variável B: tipo de ciclodextrina. Variável C: concentração de oxigênio (conforme TAB. III.3.1) 81
- FIGURA IV.3.9 - Complexo formado entre a β -CD e o PRX (Kim et al (1993)) 84

FIGURA – A.I.1 – Processos fotofísicos unimoleculares. Linhas sólidas: transições radiativas; linhas tracejadas: transições não radiativas (Birks (1970))	99
FIGURA – A.I.2 – Processos fotofísicos unimoleculares com alguns níveis vibracionais do estado fundamental S_0 e alguns níveis rotacionais do nível vibracional S_0v_1	101
FIGURA A.I.3 – Diagramas de energia potencial de moléculas no estado excitado e no estado fundamental com as transições de Franck-Condon (Moore (1976))	103
FIGURA A.I.4 – Efeito de reorientação das moléculas do solvente ao redor da espécie excitada. S_1' e S_0' são os estados de Franck-Condon excitado e fundamental respectivamente; S_1 e S_0 são correspondente aos estados de equilíbrio; para $\tau_R \ll \tau_{FM}$ (Reichardt (1990))	112
FIGURA A.I.5 – Estrutura molecular do composto 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Reichardt (1990))	112
FIGURA A.II.1 – Representação esquemática sucinta de alguns processos fotofísicos que podem ocorrer com um fluoróforo. ①: Luz de comprimento de onda λ_{ex} é absorvida e um elétron é transferido de um orbital de menor energia para um de maior energia, o sistema passa do estado fundamental para o estado excitado. ②: Os núcleos atômicos se movimentam para encontrar a nova geometria mais estável no estado excitado. ③: Com probabilidade $(1 - \phi)$ o elétron retorna, levando o sistema ao estado fundamental sem emissão de luz. ④: Com probabilidade de ϕ , o elétron retorna, levando o sistema ao estado fundamental com emissão de luz λ_{em}	117
FIGURA A.II.2 – Esta figura mostra um espaço tridimensional com uma reta ajustada aos pontos: um modelo com um CP. O "score" de um objeto (t_1) é sua projeção ortogonal na linha que passa pelos pontos, o CP. O coeficiente de direção da referida linha é o que se denomina "loading" (Wold <i>et al</i> (1987))	121
FIGURA A.II.3 – A matriz de dados X pode ser decomposta como a soma das matrizes M_i e os resíduos E. A matriz M_i pode ser vista como o produto dos "scores" t_i e dos "loadings" p'_i (wold (1987))	122
FIGURA A.II.4 – Representação gráfica de um modelo PARAFAC com dois componentes para os dados X (Bro (1997))	123

LISTA DE TABELAS

TABELA I.1 – Solubilidade em água à temperatura ambiente e parâmetros estruturais de α -CD, β -CD e γ -CD	3
TABELA III.2.1 – Composição das soluções utilizada no estudo fotofísico do PRX (1.10^{-6} mol.L ⁻¹) com variação da polaridade do meio	25
TABELA III.3.1 – Planejamento fatorial 3 ³ fracionário (cúbico de face centrada com uma amostra central)	28
TABELA III.3.2 – Concentração das soluções do conjunto Q	32
TABELA III.5.1 – Valores dos “loadings” do modo da concentração para o conjunto X-beta	37
TABELA IV.2.1 – Alguns parâmetros dos confôrmeros do PRX (FIG. IV.2.4 e 5) obtidos via cálculos MOPAC/AM1	60
TABELA IV.2.2 – Relação entre as concentrações de PRX e nitrometano no estudo fotofísico do PRX em meio com diferentes polaridades	63
TABELA – A.I.1 – Tipos de espectros ópticos	98
TABELA A.I.2 – Deslocamento das bandas de absorção e emissão do composto 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Reichardt (1990))	113

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA III.1.1 – Preparação do complexo β -CD-PRX	20
ESQUEMA III.2.1 – Preparação das soluções para o estudo fotofísico do PRX com variação da polaridade do meio	25
ESQUEMA III.3.1 – Preparação das amostras para coleta de dados de emissão total	30
ESQUEMA III.5.1 – Um exemplo de cálculo de reconstrução	38

ABREVIATURAS

- Å – angstrom (10^{-10}m)
- ALS – “alternating leat square” (mínimos quadrados alternados)
- cal.mol^{-1} – caloria por mol
- CD – ciclodextrina
- CP – componente principal
- CP1 – primeiro componente principal
- CP2 – segundo componente principal
- D – debyes
- DSC – calorimetria diferencial de varredura
- eV – elétron-Volt
- fs – femtosegundo
- g – grama
- HOMO – orbital molecular ocupado de mais alta energia
- IV – infra vermelho
- kcal – quilocaloria
- kJ – quilojoule
- LUMO – orbital molecular desocupado de menor energia
- m – metro
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- MF – mistura física
- mg – miligrama (10^{-3}g)
- min – minutos
- mL – mililitro
- mmol – milimol (10^{-3}mol)
- mol – quantidade de substância de um sistema que contém tantas unidades elementares quantas existem de átomos de carbono em 0,012kg de carbono12 (Moore (1976))
- mol.L^{-1} – unidade de concentração, quantidade de substância por volume em litros da solução
- nm – nanômetro
- NSAIDs – drogas não esteroidais anti-inflamatórias
- ORD – dispersão óptica rotatória
- PARAFAC – “Parallel Factor Analysis”
- PCA – “Principal Componente Analysis”
- PRX – Piroxicam
- PRX- β -CD – complexo β -ciclodextrina-piroxicam
- ps – picosegundo
- RMN – ressonância magnética nuclear
- RMN ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono-13
- RMN ^1H – ressonância magnética nuclear de próton
- RX – difração de raios-X
- s – segundo

- TGA – análise termo gravimétrica
- T_{lar} PEE – transferência intramolecular de próton no estado excitado
- T_{lar} PEF – transferência intramolecular de próton no estado fundamental
- u.a. – unidades arbitrárias
- V – Volt
- V/UV – visível/ultravioleta
- X-alfa – conjunto de dados que possuem em comum a α -CD
- X-beta – conjunto de dados que possuem em comum a β -CD
- X-gama – conjunto de dados que possuem em comum a γ -CD
- “Zwitterion” – sal dipolar
- α -CD – alfa ciclodextrina
- β -CD – beta ciclodextrina
- γ -CD – gama ciclodextrina
- λ_{em} – comprimento de onda de emissão
- λ_{ex} – comprimento de onda de excitação
- μmol – micromol (10^{-6}mol)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Ciclodextrinas (CD) são polímeros macrocíclicos de glicose, sendo que as mais conhecidas contêm 6, 7 ou 8 unidades glicopiranosídeas chamadas respectivamente de α (ciclohexa-amilose), β (ciclohepta-amilose) e γ (cicloocta-amilose) ciclodextrinas, cujas estruturas são mostradas na FIG. I.1, juntamente com as respectivas fórmulas moleculares.

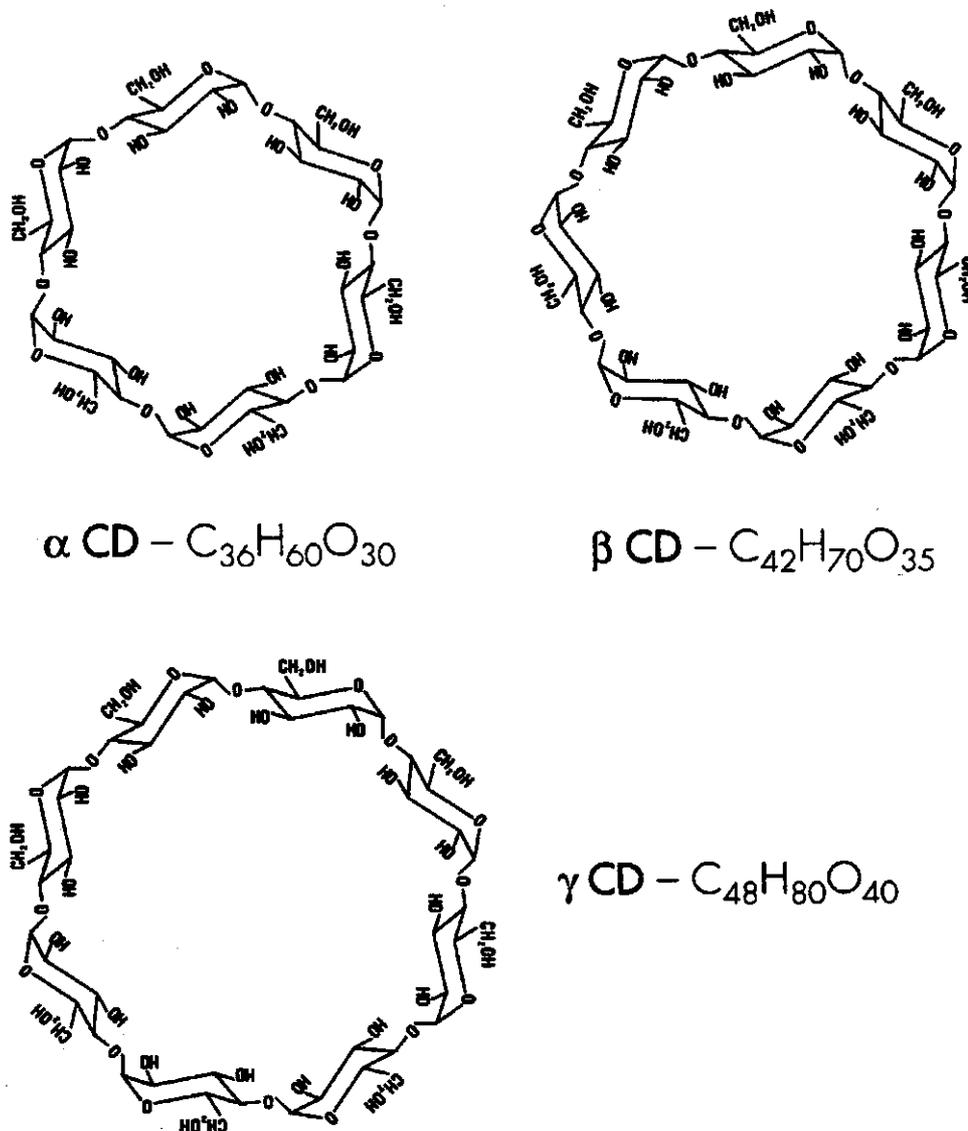


FIGURA I.1 - Fórmulas estruturais e moleculares de algumas ciclodextrinas.

Estes compostos foram isolados pela primeira vez por Villiers (1891), como produto da degradação de amido causado pelo microorganismo *Bacillus macerans*, cultivado em um meio rico em amilose. Atualmente tais substâncias são obtidas pela reação entre a enzima ciclodextrina transglicosilase em uma solução de amido pré-tratada com α -amilase. A preparação, o isolamento, a caracterização e a determinação da estrutura dessas substâncias foi feita por Schardinger (1903-1911) em uma série de trabalhos em que demonstrou serem as mesmas, oligossacarídeos cíclicos contendo um mínimo de 6 e um máximo de 12 unidades de glicose unidas via ligação α -1,4 sendo que cada uma delas se encontra na conformação

em cadeira. Casu *et al* (1966,1968) utilizando ressonância magnética nuclear (RMN) e dispersão óptica rotatória (ORD), em soluções de dimetil sulfóxido contendo tais substâncias (nas quais existe forte competição do solvente por pontes de hidrogênio intramoleculares) demonstraram que os resíduos de glicose retêm a mencionada conformação e as ligações por pontes de hidrogênio, não apenas no estado sólido mas, também, nessas soluções e em água, na qual a competição pelas referidas ligações é bastante menor, embora em solução haja maior mobilidade conformacional comparativamente às CD's no estado sólido.

Estes compostos ocorrem naturalmente apresentando uma estrutura relativamente rígida em formato de rolha oca, com os grupamentos OH ligados aos átomos de carbono C2 e C3, localizados ao redor da abertura de maior diâmetro e os grupos OH mais reativos (ligados aos carbonos C6) dispostos ao redor da abertura de menor tamanho e opostos aos grupos OH anteriormente mencionados (FIG. I.1). Bergeron (1977) e Saenger (1980) estudaram a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre os grupamentos OH ligados aos átomos de carbono C2 e C3, e verificaram que a liberdade conformacional do anel macrocíclico é restringida contribuindo para a rigidez do mesmo, seja no estado sólido, seja em solução. Este arranjo força as ligações, das quais participam os átomos de oxigênio, para o interior da cavidade fazendo com que esta mostre um microambiente hidrofóbico, enquanto a superfície externa exibe certo caráter hidrofílico. As dimensões desta cavidade dependem do número de unidades glicopiranosídeas que constituem a CD (TAB. I.1).

TABELA I.1

Solubilidade em água à temperatura ambiente e parâmetros estruturais de α -CD, β -CD e γ -CD.

Espécie	Solubilidade g/100 mL	Diâmetro menor (Å)	Diâmetro maior (Å)	Profundidade da cavidade (Å)
α -CD	14,5	4,7	5,2	6,7
β -CD	1,85	6,0	6,4	7,0
γ -CD	23,2	7,5	8,3	7,0

A habilidade das CD's formarem complexos de inclusão já havia sido reconhecida por Villiers (1891) e a partir de então tais substâncias têm atraído a atenção de inúmeros pesquisadores como possíveis agentes complexantes naturais de compostos orgânicos, organo-metálicos e gases. Este processo, dinâmico é semelhante àquele de solubilização associada às soluções micelares. A estrutura ímpar das CD's deve sua estabilidade às pontes de hidrogênio intramoleculares entre os grupos hidroxilas ligados aos átomos de carbono C2 e C3, presentes em unidades glicopiranosídeas vizinhas.

A solubilidade dessas substâncias em água e em outros solventes é muito pequena, o que parece dificultar ou impedir a atuação das mesmas como agentes complexantes. Entretanto, na década de 1960 foi descoberto que a substituição química (funcionalização) dos grupos OH em C2, C3 e C6 poderia aumentar grandemente a solubilidade desses compostos. Assim, a concentração final de CD que é possível conseguir em uma dada solução irá depender da natureza e da quantidade dos grupos que irão substituir aquelas hidroxilas, além da temperatura. Com a maioria das CD's modificadas é possível obter, em meio aquoso, concentrações iguais a 50% massa/volume. Numa recente revisão bibliográfica Loftsson e Brewster (1996) relataram uma série de aplicações das CD's modificadas (já disponíveis comercialmente) tanto na estabilização como na solubilização de algumas drogas como por exemplo: hidrocortisona, ibuprofen, diazepam, etc.. Algumas delas são comercializadas, na forma complexada, no Japão e alguns países da Europa.

O tamanho da cavidade se constitui no fator determinante através do qual a CD é usada para complexar outras moléculas. Se a espécie a ser investigada tiver dimensões maiores que as da cavidade, ela simplesmente não consegue entrar na mesma e se tiver dimensões muito pequenas ela pode passar pela cavidade sem ser complexada, de modo que o convidado (molécula a ser complexada) e o hospedeiro (molécula de CD) podem se associar sem quaisquer interações específicas, sendo o processo determinado pela estrutura e tamanho da molécula convidada. A molécula de α -CD apresenta menor cavidade sendo, em consequência, incapaz de acomodar mais de uma molécula de um grande número de substâncias, ao contrário do que ocorre com a β e a γ -CD. A β -CD possui cavidade com tamanho adequado para conter apenas uma molécula de um grande número de substâncias que apresentam atividades biológica e farmacológica como vitaminas, hormônios, proteínas, medicamentos e outras usadas em experimentos relacionados às culturas de células e de tecidos, em razão do que encontra maior aplicação. A estabilidade dos complexos formados, que é devida primariamente às forças hidrofóbicas (que são fracas), depende do tamanho de ambos, o hospedeiro e o convidado. A constante de associação para a maior parte das moléculas é $\approx 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$, valor típico no caso de interações fracas. Moléculas hidrofóbicas, ou a parte hidrofóbica de moléculas polares, são incorporadas na cavidade da CD deslocando moléculas de água que se encontram no interior da mesma, fenômeno favorecido pela repulsão entre a espécie hidrofóbica e as moléculas (polares) de água. Este processo acarreta o encapsulamento (total ou parcial) da espécie de interesse, tornando-a solúvel em meio aquoso. Quando o complexo formado é diluído em grande volume de água o fenômeno é revertido e a espécie aprisionada na cavidade é liberada em solução. A FIG. 1.2 mostra três complexos de moléculas orgânicas com as CD's ilustrando casos em que somente parte do hospedeiro é complexado em função do tamanho de ambos, assunto que será tratado a seguir.

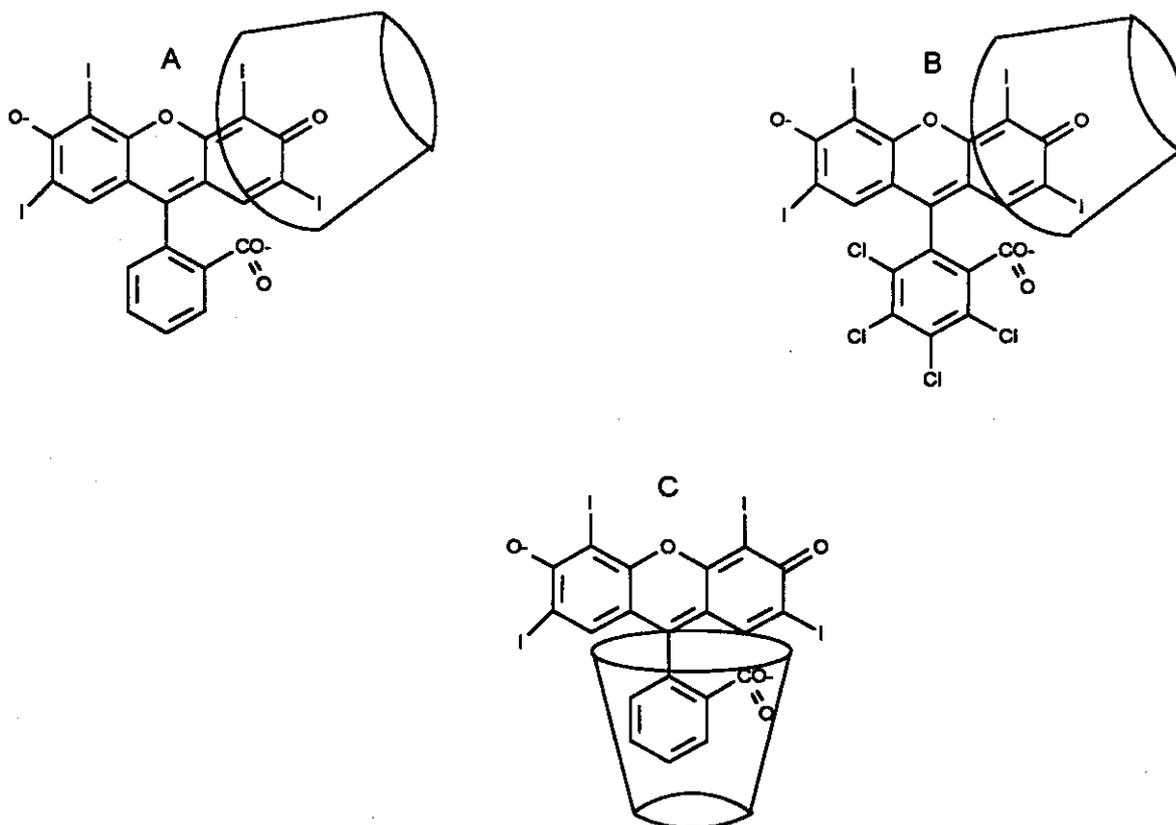


FIGURA 1.2 – Fórmulas estruturais de complexos formados entre ciclodextrinas e algumas moléculas orgânicas: A) Eritrosina B- γ -CD, B) Rosa de bengala- γ -CD e C) Eritrosina B- α -CD (Flamigni (1994)).

A complexação pode ser demonstrada por uma série de técnicas comumente empregadas em química, como medidas da solubilidade de compostos insolúveis em determinados solventes (como por exemplo, benzeno que é insolúvel em água), difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC), eventualmente espectroscopia na região do IV e espectroscopia de absorção e de emissão nas regiões V/UV e, ultimamente, por espectrometria de massas, podendo os complexos serem estudados no estado sólido ou em solução. Griffiths e Bender (1973) demonstraram que, de modo geral, a grande maioria das moléculas formam complexos 1:1, quando em solução aquosa de CD, embora esta estequiometria não seja rigorosamente seguida quando o complexo se encontra na fase sólida pelo fato dos anéis macrocíclicos estarem empilhados podendo, então, acomodar mais de uma espécie convidada. Isto ocorre quando a molécula do convidado possui tamanho semelhante ao da cavidade da CD. Entretanto, Kano *et al* (1980-1982) apresentaram evidências experimentais de que é possível, quando a molécula do hóspede é pequena em relação à referida cavidade, acomodar simultaneamente mais de uma molécula do convidado, ou uma molécula de dois convidados diferentes formando complexos do tipo 2:1 ou 1:1:1, respectivamente, quando em solução. Hamai (1982) observou associação de dois complexos de inclusão do tipo 1:1 constituindo uma espécie do tipo 2:2. Este fenômeno pode levar à formação de excímeros, caracterizados por espectroscopia de fluorescência possuindo bandas eletrônicas largas, não estrutu-

radas e em regiões espectrais diferentes (deslocadas em direção ao vermelho) das associadas aos monômeros. Assim, se a intensidade da emissão do excímero diminuir quando se adiciona ao meio uma outra substância, isto significa que o complexo de inclusão 2:1 está se desfazendo e sendo substituído por complexos do tipo 1:1:1. Ramamurthy e Eaton (1988) estudaram a existência de formação de excímeros intramoleculares, quando a molécula do convidado apresenta dois grupos cromóforos ligados entre si. Neste caso, haverá mudança conformacional da molécula do convidado durante a formação do complexo, o se que reflete no aparecimento de bandas de absorção e de emissão características nas regiões V/UV. Esses autores também investigaram situações em que duas moléculas de CD complexam apenas uma molécula convidada, como acontece com o corante alaranjado de metila. A FIG. I.3 ilustra alguns exemplos de associação do benzaldeído com os três tipos mais comuns de ciclodextrinas, a α , β e a γ . Assim, pode-se ter uma idéia dos tipos de complexos que geralmente são encontrados.

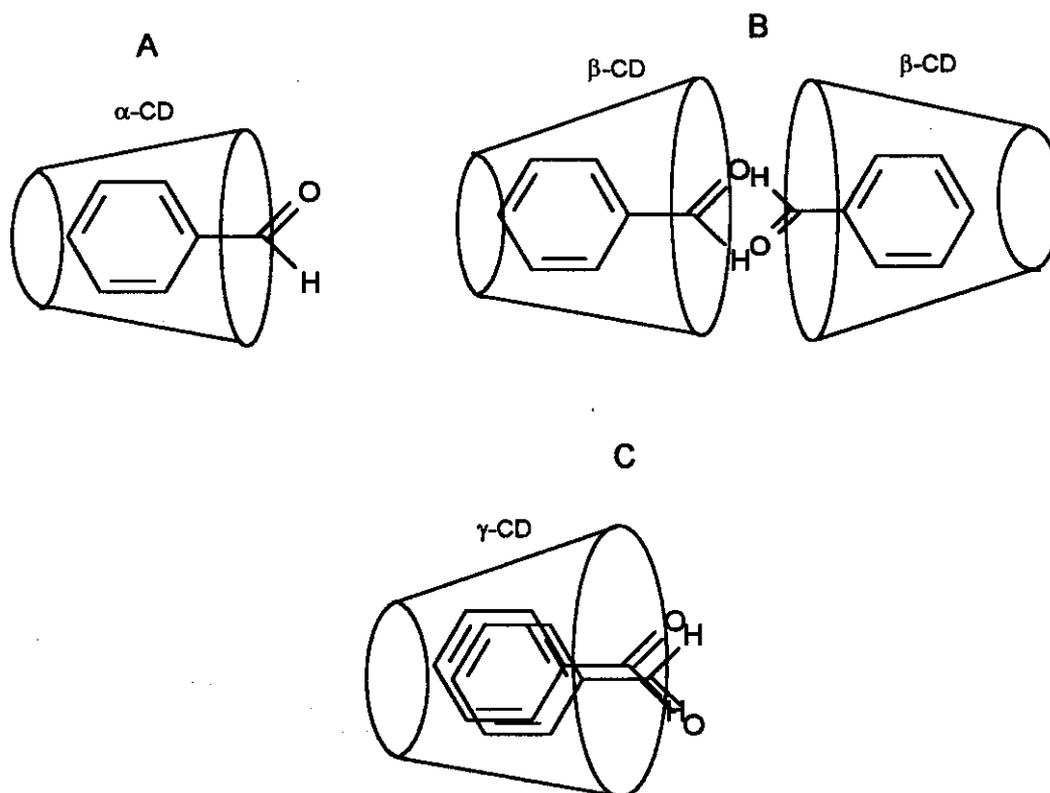


FIGURA I.3 – Fórmulas estruturais de alguns complexos formados entre o benzaldeído e os três tipos mais comuns de ciclodextrina: A) complexo do tipo 1:1, B) complexo do tipo 2:2 e C) complexo do tipo 2:1 (Rao e Turro (1989)).

Em solução aquosa contendo CD há um controle hidrofóbico-estérico do processo de inclusão, o que influencia de modo marcante a reatividade das espécies convidadas. Deste modo, a natureza hidrofóbica da cavidade pode afetar processos fotofísicos e fotoquímicos que são sensíveis à polaridade ou à constante dielétrica do solvente. Sangwan e Schneider (1989) investigaram a ação das CD's em reações de Diels-Alder em vários solventes procu-

rando correlações com a variação da polaridade do meio e a quantidade de produto formado constatando, em alguns casos, que o efeito da adição de CD provoca um acentuado aumento na velocidade de determinadas reações. Monti *et al* (1993) estudaram a formação de complexos de uma série de compostos aromáticos simples com β -CD utilizando espectroscopia de dicroísmo circular induzida e absorção (V/UV) determinando: rendimento quântico de fluorescência, decaimento temporal de emissão e absorção triplete-triplete, verificando grandes modificações nesses parâmetros em função da concentração de CD utilizada. Os resultados foram discutidos em termos da estrutura conformacional dos complexos formados. Flamigni (1994) investigou o efeito da complexação em CD's na fotoreatividade de Rosa de bengala e Eritrosina B, constatando que a reação no estado triplete e de radicais, no sistema complexado, é menor do que em água pura. Verificou, também, indícios de formação de complexos do tipo 1:2 hóspede:hospedeiro.

As aplicações das CD's são abrangentes: utilização para estudos *in vitro*, ou entrega seletiva *in vivo* de substâncias, na estabilização ou desestabilização de drogas auxiliando o entendimento de comportamentos espectroscópicos de moléculas diversas no estudo de reações já conhecidas para moléculas, mas que carecem de entendimento no que se refere a mecanismos, pois as CD's (em virtude de sua estrutura) atuam em muitos casos favorecendo alguns caminhos de reações em detrimento de outros. Relativamente aos comportamentos fotofísicos, os estudos com as CD's também têm trazido enorme avanço, pois ajudam no entendimento e proposição de mecanismos de ação de várias substâncias, como sondas moleculares e mesmo alguns medicamentos há muito utilizados em diversos tratamentos clínicos.

Qualquer modificação espectral observada quando as CD's são introduzidas no meio pode ser atribuída à formação de compostos de inclusão pois elas não afetam o espectro de absorção e de emissão de espécies não complexadas em solução. Por outro lado, se a sonda utilizada não apresentar emissão em meio aquoso mas exibir intensa emissão em meio apolar, o registro dos espectros de emissão e de excitação (bem como a medida dos tempos de vida da espécie acomodada no interior da cavidade da CD) podem fornecer informações úteis sobre seus processos fotoquímicos e fotofísicos. Hoshino *et al* (1981) observaram, de modo geral para a sonda, um aumento na intensidade da emissão e um deslocamento da banda de absorção em direção a frequências maiores ("blue shift"), possivelmente indicando que o estado eletrônico fundamental da molécula sonda é mais estabilizado pelo ambiente hidrofóbico que o excitado e pelo fato da molécula possuir menor grau de liberdade, pois quando encapsulada há uma redução dos processos não radiativos, refletindo num aumento do tempo de vida. Ueno *et al* (1981) analisaram detalhadamente os espectros e as curvas de relaxação (a partir das quais podem ser obtidos os tempos de vida) conseguindo informações a respeito das constantes de associação entre a sonda e a CD e a extensão do acesso da sonda a outras moléculas ou ions (como I^- e IO_3^- que podem provocar supressão

da fluorescência ou ciclohexanol que atua como regulador do espaço da cavidade da ciclo-dextrina). Hamai (1982) e Cox *et al* (1984) analisaram o modo estereoquímico de incorporação da própria sonda. Scypinski e Cline Love (1984) estudaram os espectros obtidos com polarizadores investigando a microviscosidade característica das cavidades e o movimento (ou a falta de) da molécula sonda no interior das mesmas.

Algumas substâncias que apresentam interesse sob o ponto de vista farmacológico com atividades reconhecidas são comercialmente disponíveis; no entanto, alguns desses medicamentos causam efeitos colaterais como fotosensibilidade. Moore e Hemmens (1982) inestigaram *in vitro* o efeito fotosensibilizador de algumas drogas utilizadas contra a malária com irradiação no ultravioleta próximo (365nm) constatando que algumas dessas substâncias apresentam enormes capacidades de fotooxidação e fotopolimerização (fotodeclorinação e subseqüente reações radicalares). Vries *et al* (1990) reconheceram propriedades fotoalérgicas em alguns derivados (comercialmente disponíveis com os nomes BAY-O-NOX, MECADOX) utilizados em animais para evitar a prenhe. Motten e Chignell (1983) apresentaram um estudo sobre fotosensibilizadores de derivados de sulfanilamidas, sugerindo que os efeitos de fotoalergia desses compostos resultam de modificações de proteínas e outras macromoléculas causadas por fotoprodutos metaestáveis desses medicamentos.

Numa revisão feita por Mihalic *et al* (1976) observam-se algumas características da droga Piroxicam (PRX - FIG. I.4), pertencente a uma classe de substâncias denominadas

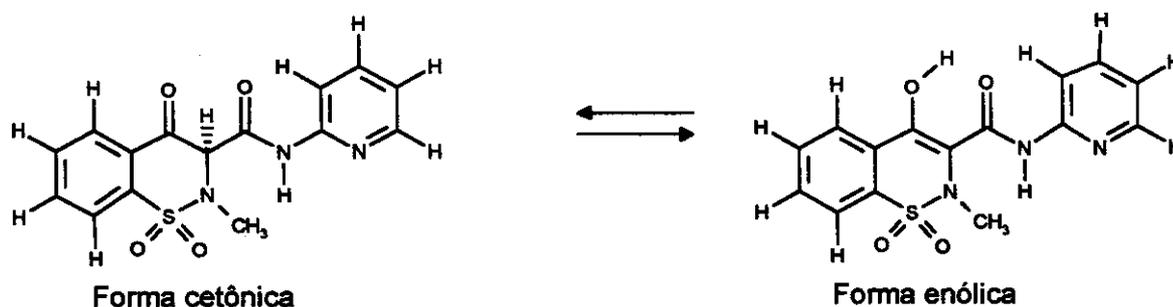


FIGURA I.4 - Piroxicam em equilíbrio ceto-enólico.

drogas não esteroidais anti-inflamatórias (NSAIDs). O PRX, desenvolvido pela Pfizer e Co. na década de 70, utilizado no Brasil na formulação de 28 medicamentos (conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas – DEF (1997)), apresenta interesse farmacológico por ser um poderoso analgésico e antiinflamatório sendo utilizado para tratamento de uma série de desequilíbrios orgânicos: artrites reumatóides, dores agudas no sistema esquelético muscular, osteoartrites, gota aguda, dores pós-operatórias, pós-parto, dentais, fraturas, etc.. Duas das vantagens do uso dessa substância são a alta potência e a meia-vida longa no organismo humano (cerca de 30h).

Segundo Mihalic (1976), uma das características do PRX é sua fotoestabilidade. Porém, Stern (1983), em estudo sobre os possíveis efeitos colaterais de algumas drogas

não esteroidais anti-inflamatórias, constatou que o PRX apresentou fotosensibilidade em pacientes em tratamento quando os mesmos são expostos à luz solar. Kochevar *et al* (1986) e Western *et al* (1987), em estudos *in vivo* e *in vitro* propuseram que esta fotosensibilidade é causada por um dos metabólitos do PRX (FIG. I.5-E) provavelmente por mecanismo envolvendo a formação de oxigênio singlete. Contudo, Serrano *et al* (1990), indicaram que algum fotoproduto – estável ou instável – seja a causa dessa fotosensibilidade (FIG. I.6); Kochevar *et al* (1986-1987) e McKerrow e Geig (1986) também estudaram esses fenômenos propondo

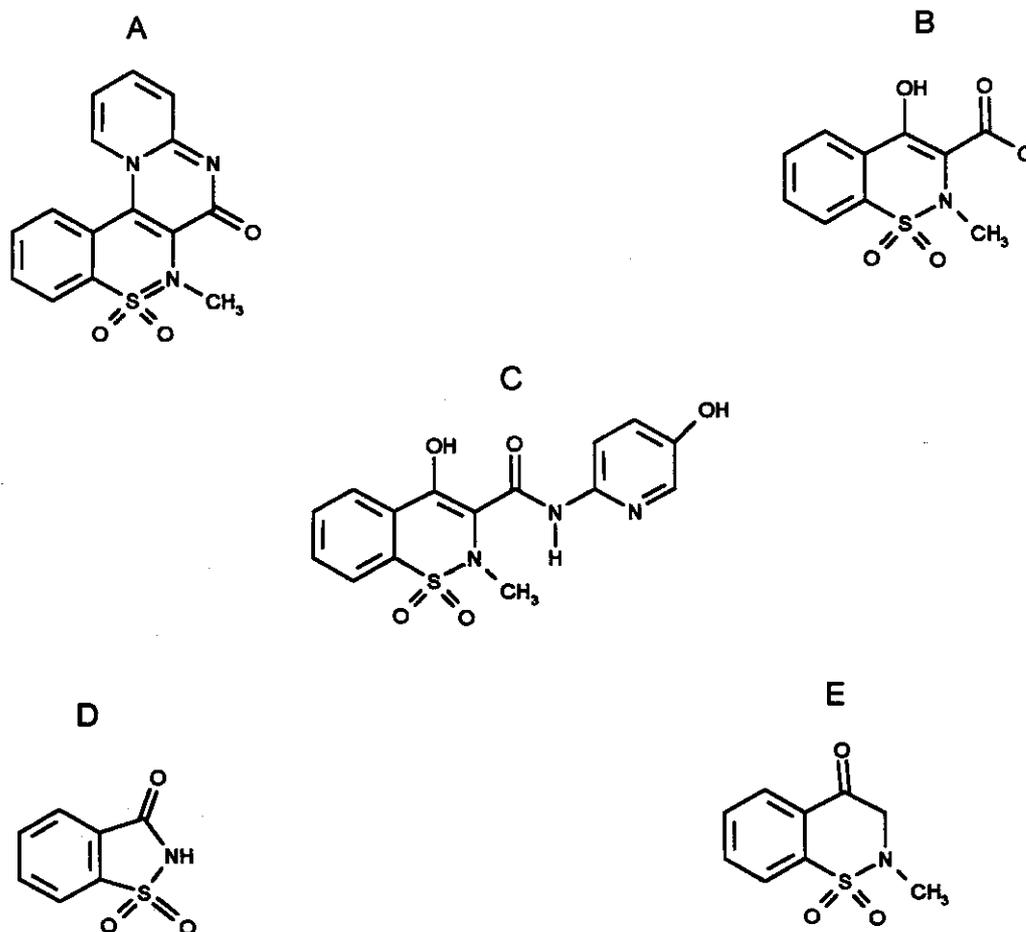


FIGURA I.5 – Alguns metabólitos do PRX (Kochevar *et al* (1986)).

um ou outro mecanismo, mas não está plenamente esclarecida a forma pela qual a droga age no organismo. Mueller *et al* (1992) e Santuci *et al* (1992) investigaram outros efeitos cola-terais de ordem gastro-estomacais, verificando que um complexo da droga em β -CD reduz tais efeitos (FIG. I.7). Earnest *et al* (1992), Takuj *et al* (1993) e Moon *et al* (1993) utilizaram o PRX em estudos de tratamento quimioterapêuticos preventivos ao câncer induzido em camundongos.

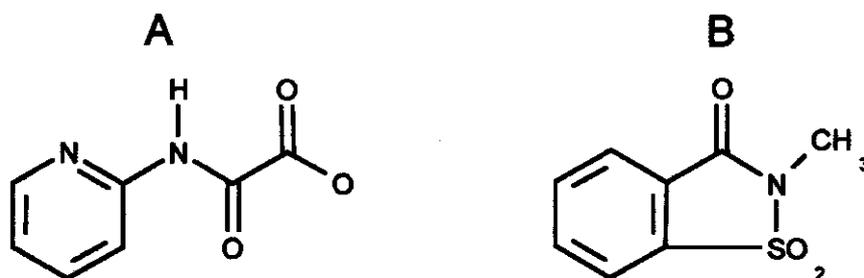


FIGURA I.6 – Alguns fotoprodutos do PRX: A) *N*-(piridil)oxalamida e B) *N*-metilsacarina (Serrano et al (1990)).

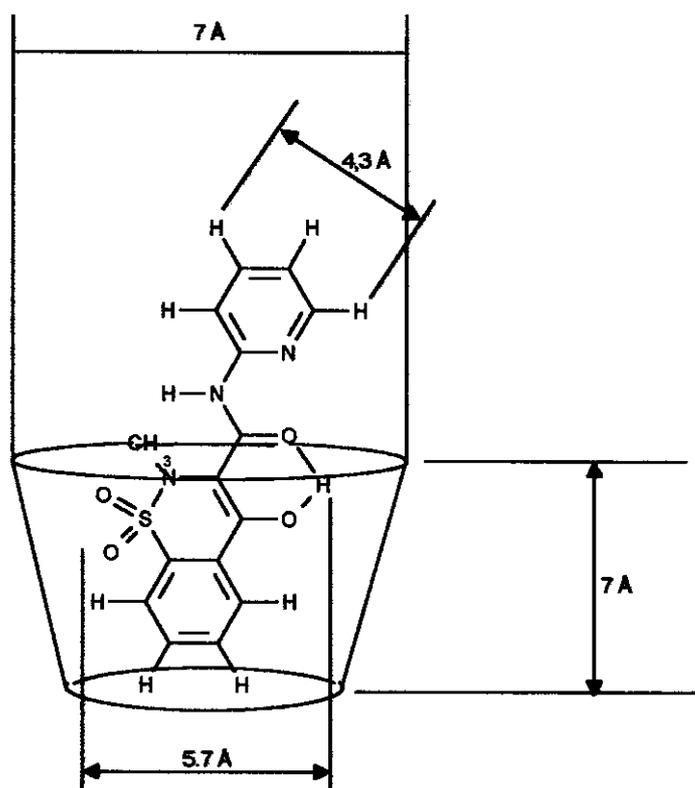


FIGURA I.7 – Complexo formado entre a β-CD e o PRX (Kim et al (1993)).

Diversos pesquisadores procuraram investigar os aspectos físico-químicos do PRX por meio de algumas técnicas. Bernhard e Zimmermann (1984) determinaram (via espectroscopia de absorção V/UV) os valores da primeira e segunda constantes de ionização do PRX em água; Geckle (1989) investigou (por RMN) a relação entre possíveis espécies "zwitterion" de PRX com deslocamentos químicos de ^{13}C em várias soluções com solventes polares como dimetilsulfóxido, *N,N*-dimetilformamida e clorofórmio; Tsai et al (1993) procuraram correlações entre os equilíbrios do PRX em água com alguns resultados de cálculos semi-empíricos; Moses et al (1995) apresentaram um estudo (utilizando voltametria cíclica) e determinaram a constante para o equilíbrio ceto-enólico do PRX (FIG. I.4); Takács-Novák et al (1995) analisaram os equilíbrios entre as formas "zwitterion" do PRX (FIG. I.8) relacionando-os com os efeitos colaterais de ordem gastro-estomacal e Alencastro e Neto

(1995) realizaram alguns cálculos semi-empíricos (MOPAC/AM1), obtendo a geometria molecular mais estável tanto para uma das formas da droga como para um dos seus metabólitos.

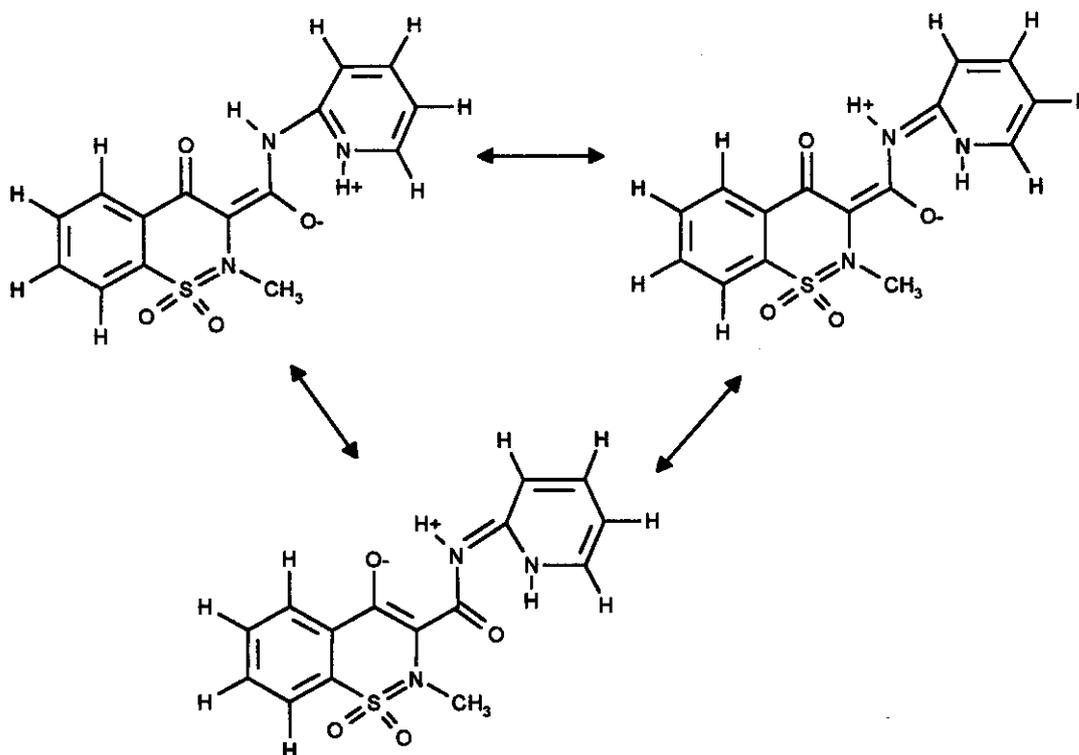


FIGURA I.8 – Algumas formas canônicas “zwitterion” do PRX (Geckle (1989)).

Outros autores estudaram aspectos do comportamento espectroscópico do PRX: Yoon *et al* (1988) investigaram o efeito do deslocamento para o vermelho que os espectros de emissão da droga apresentam com a diminuição da polaridade do solvente, propondo o mecanismo de transferência intramolecular de próton no estado excitado ($T_{1,r}PEE$) (FIG. I.9); Yoon e Kim (1989) abordaram esse mecanismo analisando o efeito do pH nos espectros de absorção e de fluorescência; Kim *et al* (1994) estudaram o efeito da adição de CD em solução aquosa de PRX na fluorescência da droga utilizando esse mecanismo de para explicar os fenômenos observados e indicaram o modo de complexação da droga em CD através de cálculos de mecânica molecular (FIG. I.7). Os autores concluíram que o aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração da β -CD se deve não somente à complexação (e portanto, pelo fato da substância, agora atuando como sonda fluorescente, estar num meio mais hidrofóbico que o anterior, antes da complexação) mas porque a $T_{1,r}PEE$ é favorecida pelo fato da droga estar complexada de um modo específico e as hidroxilas da borda da CD favorecem o fenômeno (esse assunto será abordado com detalhes em momento oportuno); Cho *et al* (1994) utilizando fluorescência com resolução temporal, fizeram atribuições das bandas de emissão a algumas espécies do PRX (FIG. I.10) e estudaram o papel do estado tripleto do PRX na dinâmica da $T_{1,r}PEE$ (FIG. I.9).

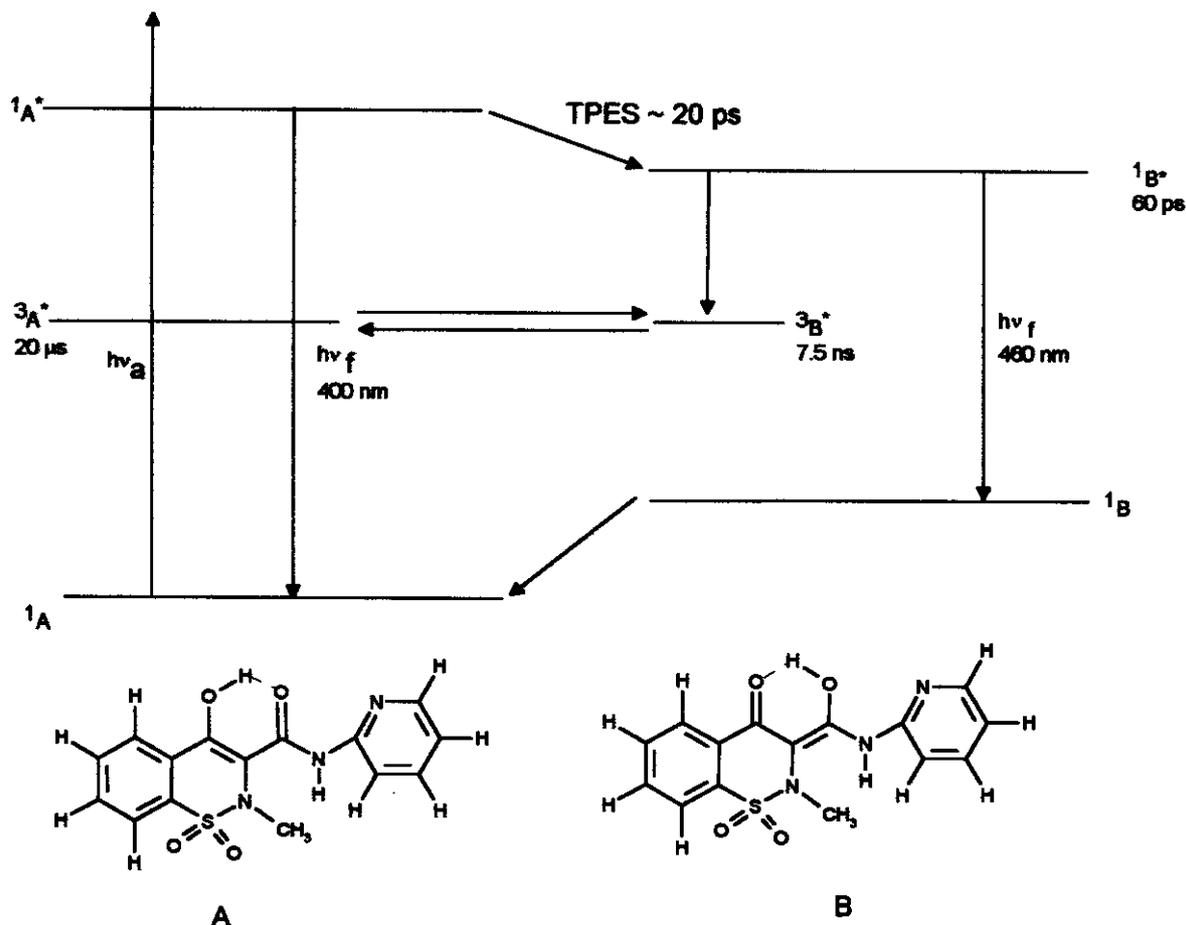


FIGURA I.9 – Mecanismo de Tl_{nr} PEE do PRX em meio hidrofóbico (Cho *et al* (1994)).

Bortolus e Monti (1996) abordaram o assunto de Tl_{nr} PEE com maior profundidade. A inclusão de determinadas espécies – em alguns casos geometrias específicas de inclusão – pode afetar o equilíbrio ácido-base das mesmas. Isso ocorre para o β -naftol na presença de α ou β -CD em solução aquosa, sendo observado um deslocamento para o vermelho de uma de suas bandas de absorção, havendo o aparecimento de uma nova banda quando a concentração da CD é maior que $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Essa modificação espectral, como função da variação da concentração da CD, se deve a formação de um complexo do tipo 1:1. A complexação com a β -CD aumenta o pK_a do β -naftol de 9,5 para 9,9. Modelos moleculares foram utilizados para descrever a geometria do complexo. O β -naftol complexado apresenta o anel aromático no interior da cavidade hidrofóbica da CD mas o grupo hidroxílico do β -naftol não está totalmente protegido do ambiente aquoso e interage com as hidroxilas da borda da CD. A inclusão pode influenciar a transferência de próton que ocorre no estado excitado e, em alguns casos, modificá-la acentuadamente. Em determinadas situações o fenômeno não ocorre sem a assistência promovida pela complexação.

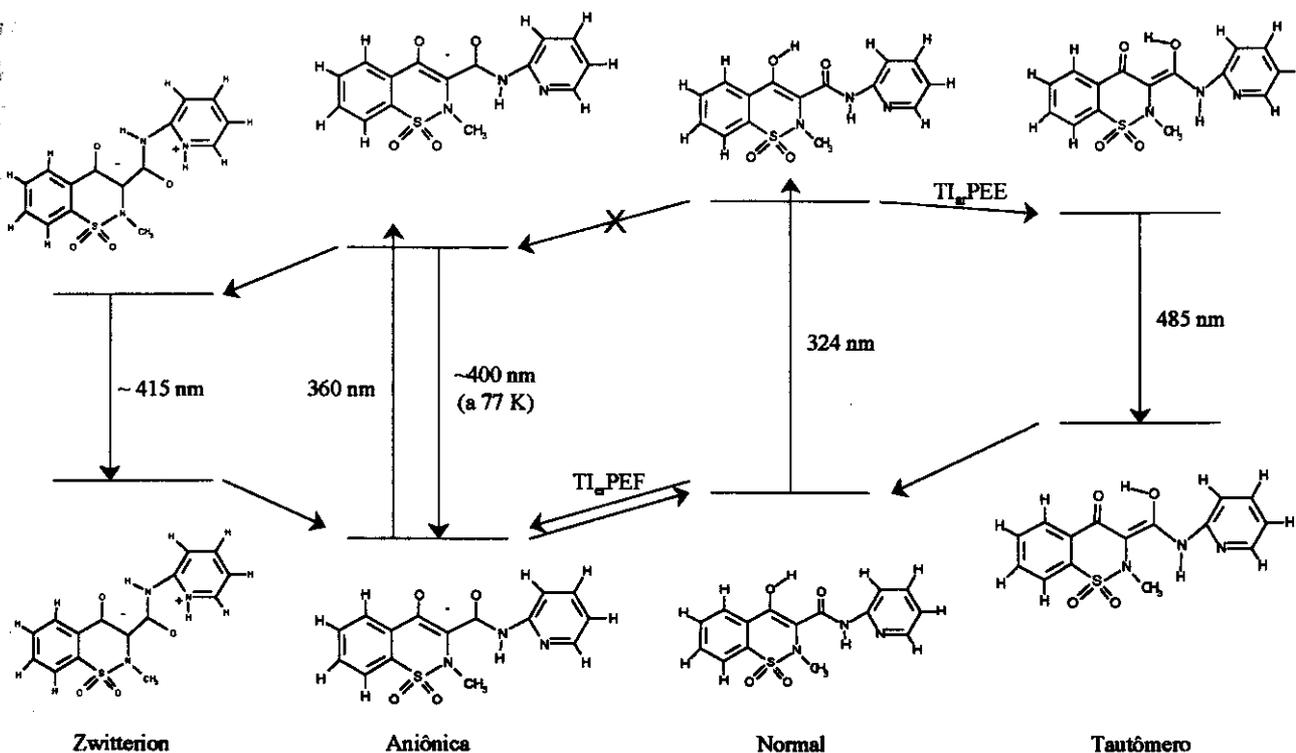


FIGURA I.10 – Algumas espécies nos estados fundamental e excitado do PRX (Cho *et al* (1994)).

A TI_{gr}PEE foi estudada por vários pesquisadores usando moléculas que apresentavam pelo menos uma ponte de hidrogênio intramolecular. Mordzinski e Grellmann (1986) investigaram o papel do estado triplete na TI_{gr}PEE do 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol fazendo atribuições das espécies que emitem. Dzugan *et al* (1986) examinaram a transferência reversa do próton no estado fundamental da 3-hidroxi-flavona utilizando absorção transiente com resolução temporal na ordem de picosegundos. Nishiya *et al* (1986) analisaram a natureza da ligação de hidrogênio intramolecular existente em uma série de moléculas como a *o*-hidroxiacetofenona, salicilamida, metil salicilato e 7-hidroxi-1-indanona por meio de espectroscopia de fluorescência de alta resolução, verificando que as estruturas vibrônicas eram consistentes com a tautomerização no estado excitado da espécie cetônica para a forma enólica. Laermer *et al* (1988), utilizando fluorescência com resolução temporal (escala temporal de femtossegundos) estudaram a TI_{gr}PEE do 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol, observando a formação da espécie tautomérica em solventes não polares. Nagaoka *et al* (1988) estudaram a dependência do estado eletrônico na TI_{gr}PEE do *o*-hidroxi-benzaldeído na fase vapor, verificando que o estado excitado (S₁ⁿ) é muito mais suscetível à referida transferência que os demais estados. Prieto *et al* (1988) investigaram processos fotofísicos de soluções líquidas de 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol em alcanos e concluíram que o equilíbrio entre as espécies cetônica e enólica no estado triplete é independente da temperatura e que essas possuem decaimento temporal monoexponencial idênticos. Brucker e Kelley (1988), utilizando emissão de fluorescência estacionária e resolvida no tempo, estudaram o papel da torção do grupamento fenila na dinâmica do estado excitado da 3-hidroxi-flavona e também de alguns

de seus derivados em solução de vários hidrocarbonetos e em matrix de argônio a 10K. Os resultados mostraram em todos os casos que a T_{1ar} PEE ocorre muito rapidamente (<10ps., seguida do processo de relaxação vibracional) que a torsão do grupo fenila (15ps.). Barbara *et al* (1989) investigaram a 9-hidroxi-fenalenona, o 2-(2-hidroxifenil)benzotiazol e a 3-hidroxi-flavona, verificando que a T_{1ar} PEE ocorre via efeito túnel. Grellmann *et al* (1989) pesquisaram a dinâmica do equilíbrio entre as espécies cetônia e enólica do 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol em seus metaestados tripletes em soluções apolares, constatando que este equilíbrio se estabelece a uma temperatura entre 55 a 220K. Brucker *et al* (1991), utilizando fluorescência de emissão no estado estacionário e com resolução temporal da ordem de picosegundos, estudaram a dinâmica de T_{1ar} PEE da 3-hidroxi-flavona, determinando as constantes de decaimento dessas moléculas em várias temperaturas e a energia de ativação. Outros pesquisadores estudaram esse fenômeno interessados no comportamento espectroscópico de uma série de substâncias, com o objetivo de aprofundar os conhecimentos a respeito do assunto: Grabowska *et al* (1991), Chou *et al* (1991), Yoon *et al* (1992) e Lavtchieva *et al* (1993).

Uma das técnicas empregadas para a sondagem das cavidades das CD – e do próprio processo de inclusão – é a espectroscopia de absorção e de emissão (fluorimetria e/ou fosforimetria) nas regiões V/UV. Esta última apresenta vantagens sob o aspecto analítico, pois pelo fato de ser muito sensível, pequenas quantidades das substâncias podem ser estudadas, isto é, soluções bem diluídas podem ser utilizadas para investigar os fenômenos fotofísicos e/ou fotoquímicos (ANEXO I). Uma das razões pela qual esta técnica foi escolhida para estudar os fenômenos fotofísicos do PRX (a ser abordado mais adiante) é que esta substância é pouco solúvel em água (um dos solventes utilizados neste trabalho) e a espectroscopia de absorção V/UV seria inadequada. Acima de uma determinada concentração da droga ocorre a formação de agregados, e isso torna o trabalho ainda mais difícil na concentração desejada, pois através de algumas técnicas não se consegue detectar as alterações ocorridas. Portanto, a fluorimetria apresenta uma série de vantagens, razão pela qual ela foi empregada em grande parte dos trabalhos desta Tese.

Mencionou-se que as CD's oferecem ambiente adequado para estudos sobre processos fotoquímicos e/ou fotofísicos, pois possuem microcavidades que, de certa forma, restringem o grau de liberdade das moléculas convidadas relativamente às mesmas em outros ambientes como, por exemplo, em solventes apolares, mesmo que estes tenham constantes dielétricas muito próximas àquelas das cavidades das CD's. Todavia, essas cavidades atuam em muitos casos, não simplesmente como ambientes hidrofóbicos mas interagem com os convidados em condições que ajudam na interpretação de processos sob investigação. As CD's atuam em algumas situações como potentes catalisadores, sendo inclusive comparadas a enzimas simples, pois elas exibem mais que um espaço meramente hidrofóbico: há microambientes em que as moléculas convidadas se acomodam que pode atuar como a chave e a fechadura, semelhante ao que ocorre em um sistema enzima-substrato, pois

existe na borda das CD's os grupos $-OH$ que oferecem condições para que alguns hóspedes façam as pontes de hidrogênio e se complexem de determinadas formas, ou determinadas estruturas conformacionais se complexem, de modo que alguns processos fotofísicos, fotoquímicos ou reações sejam favorecidas ou inibidas.

O campo de investigação em química tem crescido, e como é de conhecimento de todos, sistemas cada vez mais complexos surgem à frente dos pesquisadores, sem contudo haver maneiras ou métodos experimentais, em alguns casos, que possam ser utilizados para ajudar nessas investigações. Todavia, com o crescente desenvolvimento de metodologias para tratamento de dados, encontram-se revisões que abordam esse assunto e que evidenciam a possibilidade de ampliar a complexidade dos sistemas a serem estudados, tendo como resultado o aprofundamento do conhecimento sobre esses sistemas e o próprio avanço nessa área do conhecimento da Química.

Brown *et al* (1996) apresentaram uma visão geral das aplicações em quimiometria nos últimos anos, bem como alguns dos principais conceitos envolvidos: estatísticos, otimização, resolução, calibração, reconhecimento de padrões, estimativa de parâmetros, relação entre atividade química e estrutura molecular, inteligência artificial, etc.. Workman *et al* (1996) e Mobley *et al* (1996) fizeram extensa revisão de quimiometria aplicada a métodos espectroscópicos analisando as tendências, o propósito de alguns programas computacionais para cálculos em quimiometria, análise exploratória e classificação de dados, técnicas de pré processamento de dados, análise de ruídos, etc.. Mas, além dessas revisões podem-se encontrar vários trabalhos que teve como principal objetivo aplicar os métodos quimiométricos para a resolução de vários problemas: Lindberg *et al* (1983), Gampp *et al* (1985), Gampp *et al* (1986), Sanchez *et al* (1987), Ramos *et al* (1987), Keller e Massart (1991), Tauler *et al* (1993), Mansilla *et al* (1994), Arrabal *et al* (1994), Peña *et al* (1994) e Gremlich e Berets (1996). A questão de metodologias para tratamento de dados multivariados está mais detalhada no ANEXO II (em específico o método PARAFAC, "Parallel Factor Analysis" que tem apresentado bons resultados para tratamento de dados de fluorescência).

Hirschfeld (1980) abordou a questão de instrumentos hifenizados (os já desenvolvidos na época e os por desenvolver) mostrando que é possível construí-los com um objetivo bem definido: o de extrair o máximo de informação do sistema a ser investigado. Um exemplo que ilustra o caso é o aparelho CL/IV (cromatógrafo líquido acoplado ao espectrofotômetro de infra-vermelho) onde, a princípio, o novo aparelho constituído de dois outros distintos tem grande poder de separação associado à especificidade, ou seja, o cromatógrafo tem condições de fazer boas separações e o espectrofotômetro tem a capacidade de discriminar um tipo de substância de outro. Portanto, o objetivo final desses instrumentos é o de obter sempre mais informação de sistemas cada vez mais complexos. Foi a partir do desenvolvimento desses aparelhos que se conseguiram obter dados de ordem superior possibilitando o estudo de sistemas complexos juntamente com o desenvolvimento de metodologias para tratar

esse tipo de dados. A questão de ordem de instrumento e dados de ordem superior são analisados num artigo por Booksh e Kowalski (1994) são feitas classificações segundo terminologia matemática de acordo com o tipo de dado que o instrumento fornece. Assim, instrumentos de ordem zero são aqueles que geram uma simples resposta para cada amostra analisada, como por exemplo os eletrodos íon-seletivos ou então os fotômetros de filtro único. Os instrumentos de primeira ordem são aqueles que geram múltiplas respostas para cada amostra ao mesmo tempo, sendo essas ordenadas na forma de um vetor, como por exemplo os espectrômetros em geral, os cromatógrafos, espectrógrafos, etc.. Instrumentos que podem gerar uma matriz de dados para cada amostra são classificados como os de segunda ordem. Dentre eles podem ser citados os hifenizados, ou seja, CL/IV (cromatógrafo a líquido com detecção de infra-vermelho), CG/EM (cromatógrafo a gás com detecção de massas), EM/EX (espectrofluorímetro com detecção na emissão e na excitação), etc.. Há, ainda, instrumentos de terceira ordem, os que geram um paralelepípedo de dados para cada amostra, como o EM/EX-tempo (espectrofluorímetro com resolução temporal). Não há como imaginar a máxima ordem desses instrumentos, pois a cada dia novos aparelhos são construídos e novas técnicas são aprimoradas, mas para o propósito em vista esses são suficientes.

Ferreira *et al* (1995) apresentam uma aplicação de uma das técnicas quimiométricas para resolver um sistema complexo de porfirinas existentes em cálculos dentários de cães e felinos, utilizando espectroscopia de fluorescência e coletando dados de segunda ordem. Outros trabalhos podem ser encontrados na literatura, em que os autores procuram investigar sistemas com multicomponentes utilizando também fluorescência de emissão/excitação: Ho *et al* (1980) em três trabalhos estudaram sistemas compostos de misturas de hidrocarbonetos poli-aromáticos utilizando o método de Aniquilação de Posto para tratamento dos dados; Appellof e Davidson (1981) apresentaram um método para análise qualitativa de misturas de multicomponentes fluorescentes utilizando cromatografia a líquido de alta pressão acoplada a um vídeo fluorímetro; Ross *et al* (1990) procuraram resolver espectros de fluorescência de um sistema composto de pigmentos complexos por meio de modelos trilineares; Bunker *et al* (1993) estudaram reações fotoquímicas do trifeniletileno através de análise de componentes principais conseguindo fazer análise quantitativa dos produtos formados. e Bro (1997) explica o método PARAFAC utilizado em quimiometria (ANEXO II) mencionando sua aplicação na decomposição espectral de uma mistura composta por tirosina, triptofano e fenilalanina, obtendo os espectros de emissão das substâncias puras. Há vários outros exemplos na literatura em que os autores tentam resolver sistemas também complexos utilizando as mesmas metodologias de tratamento de dados, com respostas obtidas através de outros aparelhos de segunda ordem: Maeder (1987), Tauler e Barceló (1993) e Tauler *et al* (1994).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

A molécula de PRX se apresenta numa série de formas, ou estruturas conformacionais, assunto esse que será abordado com maior profundidade adiante. Cada uma dessas formas tem, a princípio, um comportamento; se esses comportamentos são semelhantes ou não, não se sabe *a priori*, pois o objetivo do trabalho é justamente este, ou seja, investigar o comportamento dessas formas (auxiliado pelos resultados dos cálculos semi-empíricos) utilizando a espectroscopia de fluorescência, já que a mesma se presta muito bem a esse serviço por razões já consideradas. O desenvolvimento de novos aparelhos propiciou a aquisição de grande quantidade de informações bastante significativas de vários sistemas nunca antes imaginado as quais exigem metodologias específicas para tratá-los. Neste sentido o PARAFAC pode auxiliar na interpretação dos dados de luminescência total pela diminuição da dimensionalidade destes sem perda de informações relevantes.

Este trabalho tem como objetivo abordar os seguintes tópicos:

- i) preparação e caracterização do complexo PRX- β -CD através de algumas técnicas como DSC, TGA, difração de raios-X e MEV;
- ii) utilização das ciclodextrinas como ferramenta para auxiliar o entendimento dos processos e fenômenos que serão investigados já que as mesmas oferecem inúmeras vantagens, já bastante enfatizadas;
- iii) estudo fotofísico do PRX em meio hidrofóbico e em meio hidrofílico na presença de ciclodextrinas auxiliado pelos resultados obtidos via cálculo semi-empírico (MO-PAC/AM1), sendo interessante comparar os resultados teóricos com os experimentais e fazer inferências sobre as interações soluto-solvente;
- iv) utilização de planejamento fatorial para desenhar um dos experimentos com consequente auxílio na interpretação dos resultados;
- v) utilização do PARAFAC – um dos métodos de tratamentos multivariados e multidimensionais de dados – pois este proporciona a redução da dimensionalidade dos dados de modo que a interpretação deste é facilitada;
- vi) fazer atribuições das bandas de excitação-emissão comparando os dados experimentais com os obtidos via cálculo semi-empírico para as prováveis espécies da droga;

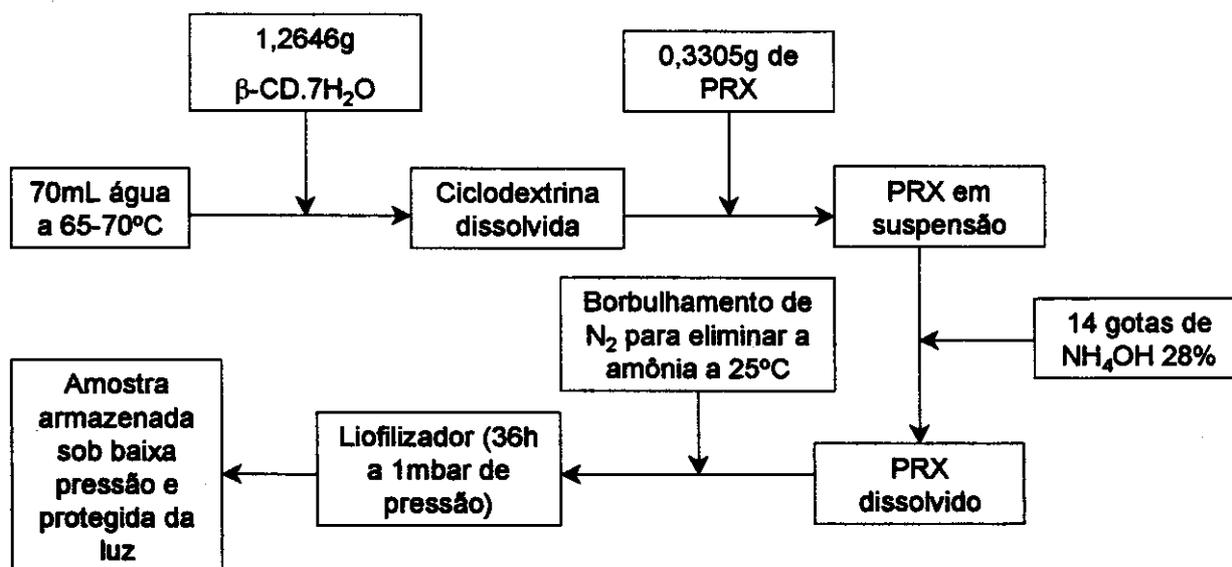
CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - PREPARAÇÃO DO COMPLEXO β -CD-PRX

Kurozumi *et al* (1975) e Acerbi *et al* (1990) investigaram alguns métodos para obtenção de complexos de inclusão de compostos farmacologicamente ativos em ciclodextrinas, abordando três métodos: a) co-precipitação, b) "spray-drying" e c) "freeze-drying". Este último apresentou os melhores resultados e, com algumas modificações, foi usado na preparação do complexo (β -CD-PRX), como pode ser visto no ESQ. III.1.1.

ESQUEMA III.1.1
Preparação do complexo β -CD-PRX¹



1: A CD (AMAIZO) usada na preparação do complexo possuía pureza de 98,7%.

Na preparação do complexo foi utilizado um liofilizador da marca Edwards-L5KR. A solução foi inicialmente resfriada com gelo seco em seguida o sistema foi mantido a baixa pressão, 1mbar por \approx 36 horas, para que toda água fosse eliminada.

O complexo foi caracterizado por: espectroscopia no infravermelho (IV), difração de raios-X (R-X), calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Todos os espectros de IV foram registrados no aparelho Perkin Elmer Mod. 1600 FTIR utilizando-se pastilhas de KBr como suporte, prensadas a 5 ton.. Para a conversão dos espectros de IV, obtidos inicialmente no aparelho Perkin Elmer Mod. 1600 FTIR gravados num disquete de 5 ¼", utilizou-se o programa Perkin (Pasquini e Davanzo (1993)); os difratogramas de raios-X foram obtidos no Difratômetro de Raios-X Shimadzu-XD3A (fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1,54051\text{\AA}$, operada com 30kV e 20mA, velocidade de varredura do goniômetro = $2^\circ.\text{min}^{-1}$, velocidade de registro = $20\text{nm}.\text{min}^{-1}$ e constante de tempo = $0,5\text{s}$) gravados em disquetes de 3 ½". Os diagramas de DSC e TGA foram adquiridos no aparelho da Du Pont Instruments Mod. 910, acoplado a um microcomputador da Du Pont 9900, sob as condições: a) fluxo de argônio, b) varredura a $10^\circ\text{C}/\text{min}$, c) faixa de aquecimento de 30 a 700°C

para TGA e de 30 a 300 para DCS. As massas das amostras de PRX, β -CD, mistura-física e o complexo β -CD-PRX foram, respectivamente: 8,25mg, 7,80mg, 6,09mg e 7,36mg, determinadas na microbalança Mettler ME-22. As fotografias MEV foram coletadas no aparelho da JEOL Mod. JSM-T300 registradas num filme branco e preto 120, sendo as amostras preparadas por pulverização sobre um suporte de latão, com fita adesiva dupla face de fibra de carbono (TED PELLA, 160-3 PELCO GRID BOX) capaz de segurar o material para a metalização com ouro.

A mistura física foi preparada com quantidades equimolares àquelas utilizadas na composição do complexo, ou seja, 1:1 de β -CD-PRX, macerando-as num almofariz por aproximadamente 15min. Esta amostra foi armazenada junto com as demais, nas mesmas condições de temperatura, umidade, etc..

Na preparação do complexo a amônia foi eliminada mediante borbulhamento de N_2 (White Martins), sendo a presença monitorada medindo-se o pH com papel indicador, até que este atingisse $\cong 7,0$, quando o fluxo de gás foi mantido em $\cong 10\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

III.2 – ESTUDOS SOBRE CONFORMAÇÕES MOLECULARES DO PIROXICAM ATRAVÉS DE CÁLCULOS SEMI-EMPÍRICOS

Antes de comentar estes cálculos vale ressaltar as questões de ordem prática que determinaram a escolha dos métodos semi-empíricos usados. O objetivo inicial ficou centrado na determinação da estrutura conformacional mais estável da droga. Entretanto, conforme os cálculos foram sendo efetuados observou-se a necessidade de realizar outros mais apurados resultando na obtenção das superfícies de energia potencial em função da rotação de duas ligações químicas da molécula. Levando em conta todas essas estruturas conformacionais, foram efetuados cálculos para mais de 290 conformêmeros. Como para cada uma dessas estruturas calculadas tem-se um número considerável de resultados, é necessário tomar cuidado com a quantidade de informações obtidas. Outra questão importante se relaciona com o tempo computacional exigido para este trabalho, que está em relação direta com o tipo de cálculo efetuado, ou seja, mecânica molecular, semi-empírico ou *ab initio*. Quanto mais apurado for o cálculo, maior será a exigência computacional para que eles sejam feitos num tempo menor. Por essa razão o método semi-empírico foi escolhido. Entretanto, o ganho relacionado com dispêndio computacional pode prejudicar os resultados, ou seja, resultados menos apurados podem levar a conclusões errôneas. Por essa razão é preciso obter dados da literatura que apoiem a escolha feita no sentido de se ter um bom grau de confiabilidade nos resultados obtidos. Nesse sentido podem-se encontrar alguns trabalhos que procuram relacionar os resultados obtidos via cálculos semi-empíricos (AM1) com dados experimentais. Fabian (1987) comparou dados experimentais com os resultados obtidos via cálculos semi-empíricos AM1 para 66 moléculas, mostrando os prós e os contras da utilização desse método.

De forma geral pode-se concluir que: a) os problemas relacionados com valores superestimados para a repulsão H-H presente no método MNDO foram corrigidos; b) algumas interações do tipo par isolado-par isolado e par isolado-H ainda não são muito bem previstas por esse método; c) os cálculos de barreira rotacional sobre ligações simples são ainda subestimadas comparadas com os resultados obtidos via *ab initio*, mas as tendências são seguidas e podem ser comparadas com os resultados experimentais. Apesar de alguns aspectos ainda não solucionados para o método, o autor sugere que em vários casos ele pode ser utilizado com bom grau de confiabilidade para verificação de tendências. Além desse trabalho, outros são encontrados na literatura que procuram fazer o mesmo tipo de relação, mas para situações específicas.

Langgård e Sandström (1996) estudaram as modificações conformacionais do (R,R)- e (R,S)-N,N-bis-(1-feniletíl)-acetamida e tioacetamida por meio de RMN e cálculos AM1. Os autores obtiveram resultados concordantes entre os dados experimentais e teóricos para os conformêmeros de menor energia, mas a barreira de potencial calculada foi menor que a experimental.

Ivanov *et al* (1996) compararam os confôrmeros de pirrolidinas substituídas obtidas via cálculos com os resultados experimentais de RMN em diferentes temperaturas. Os autores concluíram que os métodos computacionais utilizados para a análise conformacional dessa classe de compostos foram consistentes com os dados experimentais, no sentido em que forneceram os mesmos confôrmeros preferenciais.

Nicolle *et al* (1995) encontraram resultados interessantes comparando os dados experimentais via RMN com os dos cálculos via MOPAC/AM1 para N-benzil, N-n-propil (2-metil-3-nitrofenil) acetamida. O momento dipolar calculado para o confôrmero Z dessa molécula, foi maior que para o confôrmero E. Assim, a espécie Z deve ser mais estável em solventes com maior polaridade e isso está de acordo com o dado experimental.

Zoltewicz e Maier (1996) obtiveram resultados concordantes para a molécula de 1,8-di(3'-piridil) naftaleno quando compararam os resultados teóricos da análise conformacional com os experimentais (via RMN). Encontram-se, também, outros trabalhos em que os autores demonstram interesse na procura de correlações de dados experimentais com resultados teóricos (semi-empíricos), envolvendo interação soluto/solvente. Dentre esses, Ivanov *et al* (1996) analisaram por RMN ^1H as modificações conformacionais de pirrolidinas substituídas; Aviyente e Varnali (1996) estudaram as alterações estruturais do 2-ciano hidroxietano em solução, utilizando métodos de cálculos semi-empíricos PM3 e *ab initio* (MP2/6-31G**); Coitiño e Tomasi (1996) avaliaram os efeitos do solvente na barreira rotacional do glioxal com cálculos *ab initio* (MP2/6-31G).

Algumas estruturas moleculares do PRX foram inicialmente tratadas utilizando-se o programa de mecânica molecular Alchemy (Alchemy II (1988)) para a otimização da geometria (como pré tratamento), sendo que a diferença básica foi a localização da dupla ligação C(11) e C(14) (FIG. III.2.1), pois a molécula apresenta vários equilíbrios, entre os quais o ceto enólico. Em seguida, essas estruturas foram submetidas a cálculos semi-empíricos utilizando-se o pacote MOPAC/AM1 (Stewart *et al* (1990)/Dewar *et al* (1985)). Dentre elas foram escolhidas duas das mais estáveis, uma correspondente à forma enólica e outra à cetônica (FIG. III.2.1). Os ângulos diedros foram designados por ϕ_1 e ϕ_2 da seguinte forma: ϕ_1 pelos átomos C(14), C(23), N(25) e C(27) e ϕ_2 pelos átomos C(11), C(14), C(23) e O(24) para as duas formas. Em função da rotação simultânea destes dois ângulos com passos de 30 graus, foram obtidas as superfícies de energia para as duas estruturas, onde todos os parâmetros (comprimentos de ligação, ângulos de ligação e todos os outros ângulos diedro, exceto os especificados) foram otimizados.

Verifica-se que a rotação de um dos ângulos diedros desta molécula se refere à de uma ligação peptídica que apresenta uma barreira de potencial a qual pode ser investigada de duas formas pelos cálculos teóricos. No caso específico do pacote MOPAC podem-se utilizar as palavras-chave MMOK ou NOMM que correspondem, respectivamente, a uma correção via mecânica molecular ou não nessas ligações. Para o PRX observou-se que a

utilização de uma ou de outra opção não alterou significativamente a energia total do sistema, embora isso possa ocorrer, o que levaria a interpretações diferentes.

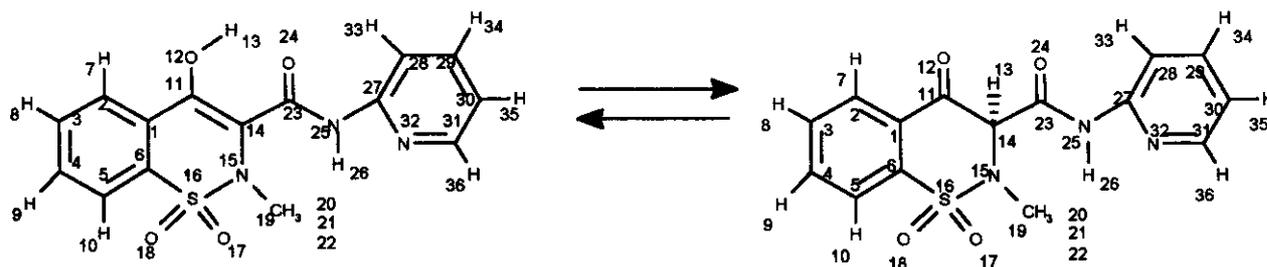


FIGURA III.2.1 – Formas enólica e cetônica do PRX utilizadas para obtenção das superfícies de energia potencial.

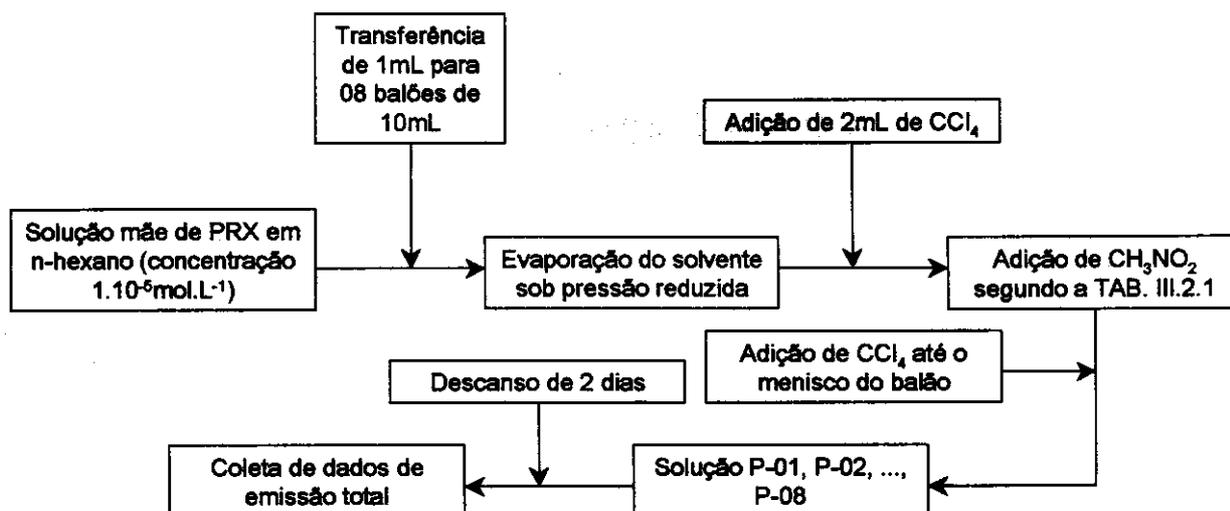
Os cálculos foram efetuados em três estágios: o primeiro, de mecânica molecular Alchemy, foi desenvolvido em microcomputadores PC 486-DX2 com 16Mbytes de memória RAM; o segundo, utilizando o pacote MOPAC/AM1, correspondente ao conformero enólico, foi realizado nas estações de trabalho do Instituto de Química/UNICAMP e o terceiro, utilizando também o pacote MOPAC/AM1, correspondente ao conformero cetônico, foi realizado nas estações de trabalho do CENAPAD/UNICAMP.

Toda teoria utilizada para previsões só terá sentido mediante comprovação experimental. Nesse sentido coletaram-se dados de emissão total do PRX em solventes com diferentes polaridades. Foram preparadas as soluções segundo o ESQ. III.2.1 e TAB. III.2.1. O nitrometano (Merck, grau espectroscópico) e o tetracloreto de carbono (Sink, grau cromatográfico) apresentaram emissão com pequena intensidade na região espectral de interesse.

Vale mencionar a razão pela qual foi escolhido o sistema $\text{CCl}_4\text{-CH}_3\text{NO}_2$ para esse estudo, com o objetivo de procurar correlações com o resultados teóricos: a) esses solventes são miscíveis em qualquer proporção; b) a mistura $\text{CCl}_4\text{-CH}_3\text{NO}_2$ oferece condições para que o polaridade do meio seja variada num amplo intervalo pois o momento de dipolo dos constituintes puros é 0 (zero) para o CCl_4 e 3,46D para o CH_3NO_2 ; c) o meio é aprótico, impedindo interações fortes do tipo pontes de hidrogênio entre o solvente (a mistura) e o soluto (PRX) embora não seja descartado a possibilidade de alguma interação específica entre o nitrometano e o PRX, já que o primeiro possui oxigênios capazes de interagir com os hidrogênios mais ácidos do PRX (a questão relativa às possíveis interações específicas serão discutidas na Seção IV.2).

ESQUEMA III.2.1

Preparação das soluções para o estudo fotofísico do PRX com variação da polaridade do meio.

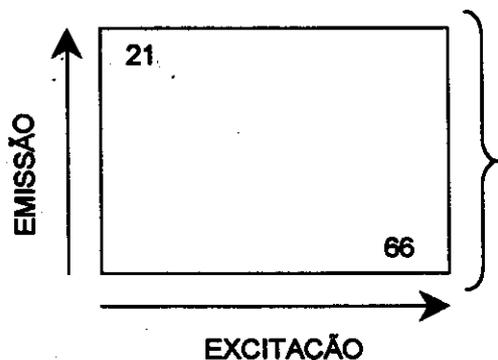


Obs.: O n-hexano utilizado na preparação da solução mãe é de grau cromatográfico com baixa emissão na região espectral de interesse.

TABELA III.2.1

Composição das soluções utilizada no estudo fotofísico do PRX ($1.10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) com variação da polaridade do meio.

SOLUÇÃO	01	02	03	04	05	06	07	08
Concentração								
CH ₃ NO ₂ (mmol.L ⁻¹)	0	37,1	74,2	111	222	445	890	1.780
Fração molar de CH ₃ NO ₂	0	0,00205	0,0041	0,00615	0,0123	0,0246	0,0492	0,0984



Espectros de excitação, de 260 a 390 nm com passo de 2 nm, monitorados em vários comprimentos de onda de emissão, de 400 a 600 nm com passo de 10 nm.

FIGURA III.2.2 - Modo de agrupamento dos espectros de excitação para a formação da matriz de dados, ou a superfície de emissão total.

Para cada uma das soluções preparadas segundo a TAB. III.2.1 e ESQ. III.2.1 e para as referências (soluções de nitrometano mas na ausência do PRX) foram registrados espectros de excitação-emissão, que constituíram as superfícies de emissão total, conforme FIG. III.2.2. Estas superfícies foram obtidas no instrumento espectrofluorímetro SPF-500CTM SLM AMINCO, sendo registrados espectros de excitação de 260 a 390nm com passo de 2nm, monitorados com emissão de 400 a 600nm com passo de 10nm. A abertura das fendas de emissão e de excitação foi, respectivamente, de 4 e 10nm e a tensão nas fotomultiplicadoras de 525 e 990V para referência e fluorescência, nessa ordem. Os dados utilizados nas discussões são o resultado da diferença entre as superfícies de emissão total das soluções e suas respectivas referências, pois essas apresentam, além dos espalhamentos Raman e Rayleigh, baixa emissão (região entre 220 e 280nm) que poderia atrapalhar na análise dos resultados.

III.3 – ESTUDO FOTOFÍSICO DO PIROXICAM EM MEIO HIDROFÍLICO EM PRESENÇA DE CICLODEXTRINAS.

Deming *et al* (1991) enfatizaram a questão relativa a planejamentos em geral, ou seja, quanto mais elaborados forem os experimentos maior será a probabilidade de que os dados contenham informações relevantes que podem, usualmente, ser adquiridas com menor dispêndio de tempo em comparação com experimentos não planejados. Nesse sentido os planejamentos experimentais fatoriais completos, ou fracionários, são de suma importância para o pesquisador. Contudo, toda informação adquirida concerne a um sistema deve ser utilizada em experimentos posteriores.

Box e Draper (1987) mostraram um planejamento semelhante ao cúbico fracionário de face centrada com uma amostra central. Esse planejamento, com algumas modificações (TAB. III.3.1), foi utilizado no estudo do comportamento espectroscópico do PRX num meio hidrofílico (solução aquosa contendo 0,09% de KNO_3 a $20 \pm 1^\circ\text{C}$) perante algumas variáveis: concentração de PRX, tipo de ciclodextrina (α , β ou γ) e concentração de O_2 e foi denominado de conjunto Planejamento (P). Tanto as variáveis como as condições experimentais de temperatura e concentração do sal (para simular a força iônica do meio fisiológico) foram escolhidas em função de estudos realizados por vários autores.

Cho *et al* (1994) verificaram, através de espectroscopia de emissão resolvida no tempo, que o PRX apresenta vários equilíbrios em metanol, tanto no estado excitado como no fundamental, em função da concentração. Western *et al* (1987), por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, notaram que um dos metabólitos da droga apresentou fototoxicidade por ativação do oxigênio singlete. Kim *et al* (1994) estudaram o comportamento espectroscópico deste composto em água em função da variação da concentração de β -CD, propondo um modo de complexação da droga na cavidade da CD. Fronza *et al* (1992) investigaram (por RMN ^1H) a complexação do sal de sódio do PRX em β -CD indicando que o complexo pode ser formado tanto pelo anel benzênico (próximo ao grupo sulfonila) como pelo anel piridínico.

As variáveis foram escolhidas em função de estudos já realizados por vários autores como mencionado na introdução desta Tese como por exemplo Western *et al* (1987). Porém, o maior interesse é investigar o comportamento da droga, com espectroscopia de fluorescência, frente a todas essas variáveis juntas, utilizando-se o planejamento fatorial, pois: a) a técnica é muito sensível sob o aspecto analítico; logo, concentrações muito baixas podem ser utilizadas evitando formação de agregados – comum para esse tipo de composto – de modo que, apenas processos unimoleculares ocorram; b) sendo a concentração pequena pode-se estudar o composto e não o respectivo sal, como foi o caso dos pesquisadores Fronza *et al* (1992), pois para obter informações por meio de RMN são necessárias concentrações da ordem de 10^{-3}mol.L^{-1} , o que é possível somente para o sal da droga visto que ela

TABELA III.3.1

Planejamento fatorial 3^3 fracionário (cúbico de face centrada com uma amostra central)

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	-	0	+
A: Concentração de PRX ¹ μmolL^{-1}	6,05	12,1	24,2
B: Tipo de ciclodextrina	α	β	γ
C: Concentração de O ₂	Ausente ³	21% ²	puro

ENSAIO	VARIÁVEIS			ORDEM
	A	B	C	
01	-	-	-	3 ^a
02	-	+	-	4 ^a
03	-	0	0	9 ^a
04	-	-	+	5 ^a
05	-	+	+	1 ^a
06	0	0	-	10 ^a
07	0	-	0	14 ^a
08	0	0	0	2 ^a
09	0	+	0	6 ^a
10	0	0	+	13 ^a
11	+	-	-	7 ^a
12	+	+	-	11 ^a
13	+	0	0	8 ^a
14	+	-	+	12 ^a
15	+	+	+	15 ^a

1: Todas as amostras foram preparadas em solução de KNO₃ 0,09%.

2: Borbulhou-se ar comprimido e o CO₂ foi eliminado pela passagem do ar em solução de NaOH 0,1mol.L⁻¹.

3: Tanto o CO₂ como O₂ foram eliminados por borbulhando de argônio (White Martins, pureza de 99,99%).

4: As CD's usadas nesse experimento foram da marca AMAIZO com pureza igual a 99,9%, 98,7% e 99,5% para a α -, β - e γ -CD respectivamente.

apresenta baixa solubilidade em água; c) o planejamento fatorial oferece subsídios para inferências a respeito das possíveis interações –antagônicas ou sinérgicas– entre as variáveis consideradas, pois efeitos de segunda ordem ou superiores podem ser verificados. Em conseqüência o conhecimento sobre o sistema pode ser aprofundado.

A FIG. III.3.1 mostra a representação geométrica do referido planejamento (TAB. III.3.1). Observa-se que todas as amostras que possuem em comum a α -CD estão numa

das faces do cubo e são, em ordem crescente, 01, 04, 07, 11 e 14 respectivamente. Esses planejamentos têm como objetivo auxiliar na investigação dos fenômenos e por essa razão, no momento do tratamento dos dados, as amostras podem ser agrupadas de acordo com alguma semelhança que apresentem em função do próprio planejamento, como, por exemplo, aquelas que possuem em comum a α -CD. Mas, além disso, podem-se agrupar as amostras em função das alterações simultâneas que ocorrem nas três variáveis, ou seja, a amostra 01 apresenta todas as variáveis no nível menor (menor concentração de PRX e de O_2 e a α -CD); a amostra 08 possui todas as variáveis no nível 0 (concentração intermediária de PRX e de O_2 e β -CD) e, por último, a amostra 15 tem todas as variáveis no nível superior (maior concentração de PRX e O_2 e γ -CD). Observando-se a representação geométrica do planejamento (FIG. III.3.1) verifica-se que as referidas amostras, 01, 08 e 15, quando unidas, formam uma das diagonais do cubo. Outras junções desse tipo podem ser feitas com o intuito de investigar algumas tendências, e dessa forma, auxiliar na compreensão do comportamento fotofísico da substância. Esse assunto será abordado na seção sobre Resultados e Discussões, onde algumas tentativas nesse sentido foram realizadas.

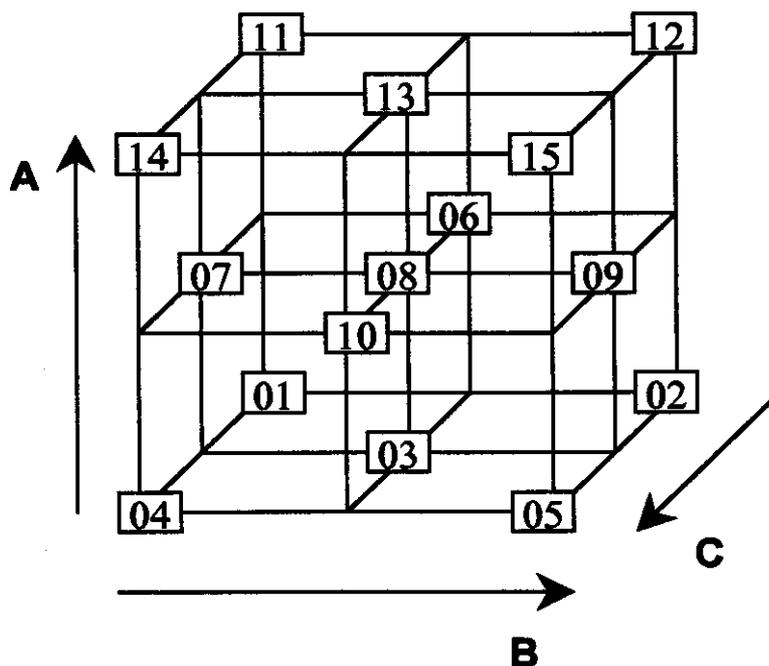


FIGURA III.3.1 – Representação geométrica do planejamento fracionário cúbico de face centrada com uma amostra central. Variável A: concentração de PRX. Variável B: tipo de ciclodextrina. Variável C: concentração de oxigênio (TAB. III.3.1).

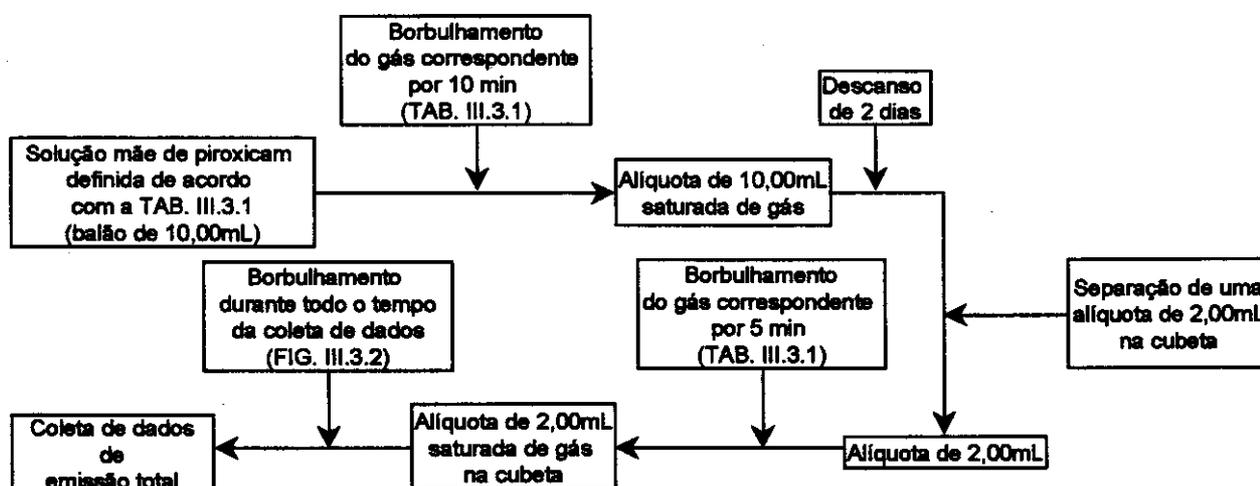
O ESQ. III.3.1 indica como as amostras foram preparadas para a coleta de dados. É de suma importância mencionar a questão do descanso das amostras durante 2 dias, pois, conforme mencionado na introdução, o sistema em estudo é complexo. Portanto, deve-se evitar toda forma de interferências por falta de controle sobre algum fenômeno. O objetivo

de deixar as amostras descansarem por 2 dias é oferecer tempo suficiente para que o sistema atinja um equilíbrio, como será mencionado na seção sobre Resultados e Discussões.

Foram coletadas superfícies de emissão total para todas as amostras do planejamento (ESQ. III.3.1 e a TAB. III.3.1). Os dados foram obtidos no espectrofluorímetro já mencionado, sendo registrados espectros de excitação de 220 a 450nm com passo de 2nm, monitorados com emissão de 330 a 600nm com passo de 10nm. As fendas de emissão e de excitação foram respectivamente de 4 e 10nm e as tensões nas fotomultiplicadoras foram de 600 e 1000V para a referência e a fluorescência, nessa ordem. Uma observação atenta quanto ao intervalo espectral de monitoramento dos espectros de excitação pode deixar al-

ESQUEMA III.3.1

Preparação das amostras para coleta de dados de emissão total¹.



1: as amostras foram termostalizadas à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o experimento.

ma dúvida, pois como pode haver emissão, por exemplo, a 330nm com excitação em 450nm? Para esse conjunto de dados, especificamente, o primeiro espectro de excitação foi registrado num intervalo menor (220 a 320nm) monitorado em 330nm, e cada novo espectro registrado foi ampliado de 10nm. Assim, no segundo espectro do conjunto o intervalo ficou compreendido entre 220 e 330nm (monitorado em 340nm); no terceiro mais 10nm foram acrescentados e o espectro ficou entre 220 e 340nm monitorado em 350nm e assim por diante, até o décimo terceiro espectro, quando a região espectral de excitação não foi mais alterada, modificando-se somente o comprimento de onda de monitoramento da emissão até 600nm com passo de 10nm. Nesse ponto parece haver ainda uma incoerência: De que modo deveriam ser tratados os dados, se não houve informação no intervalo espectral entre 320 e 450nm para a excitação com os correspondentes comprimentos de onda de emissão de 330 a 450nm? Os espectros foram agrupados para formar uma matriz de dados para cada amostra e estas agrupadas para formar um paralelepípedo de dados (FIG. III.3.2). Como não há informação no referido intervalo espectral, os dados faltantes foram preenchi-

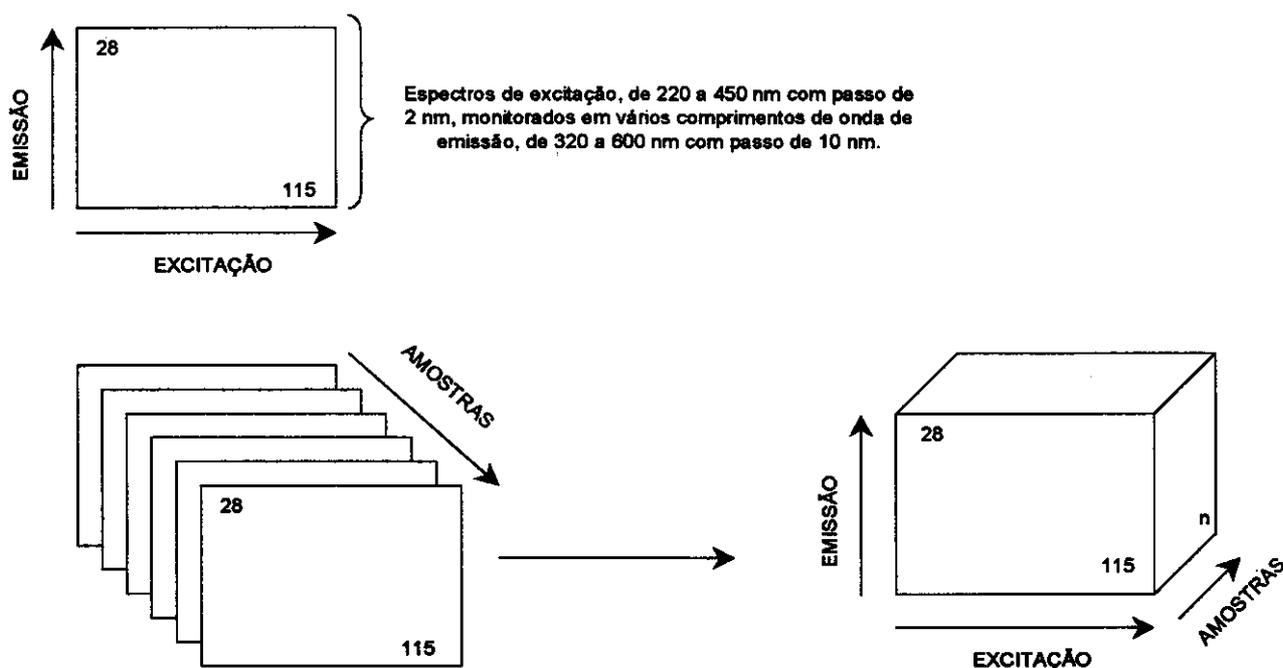


FIGURA III.3.2 - Modo de agrupamento dos espectros de excitação para a formação da matriz de dados, ou a superfície de emissão total, e para a formação do paralelepípedo de dados.

dos com zeros. Os dados foram tratados segundo o método PARAFAC (Anexo II), mas para todas as superfícies foram descontadas as emissões – mesmo sendo pouco intensas – e espalhamentos de luz (Raman e Rayleigh) devido à água.

Os tempos de 10 e 5 min de borbulhamento de gás (ESQ. III.3.1) para as amostras que ficaram descansando por dois dias e imediatamente antes da coleta de dados respectivamente, foram determinados mediante experimentos preliminares em que se utilizou de um pHmetro para medir o pH de algumas das soluções, com 10mL, em função do tempo de borbulhamento. O tempo de 10min, com fluxo de $10\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, foi suficiente para que todo CO_2 presente na solução fosse eliminado. Após esse período, o pH da solução estabilizou-se em $\approx 7,0$ devido aos deslocamentos dos equilíbrios existentes em função da presença do gás. Durante todo o experimento, por borbulhamento constante dos gases, as soluções ficaram livres de CO_2 . Isso foi feito com o objetivo de manter a homogeneidade no sistema, pois como o planejamento prevê, uma das variáveis está relacionada com a concentração do O_2 e todas as outras devem permanecer, aproximadamente, constantes (nesse caso a ausência do CO_2). Sabe-se que soluções-tampão mantêm o pH mais ou menos inalterado. Contudo, essas soluções não foram utilizadas porque mais substâncias estariam presentes no meio, juntamente com o PRX, e o objetivo é estudar o comportamento fotofísico dessa substância e os processos unimoleculares. Quaisquer outras espécies presentes poderiam provocar modificações acentuadas nesses processos e, por conseguinte, o estudo seria prejudicado.

Foram preparadas cinco soluções de PRX em água nas mesmas condições utilizadas para conjunto que constituiu o planejamento da TAB. III.3.1 e o ESQ. III.3.1: em solução aquosa com 0,09% de KNO_3 a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, com borbulhamento de argônio para eliminar o O_2 e CO_2 atmosférico e com descanso de dois dias, antes de registrar os espectros (para o sistema entrar em equilíbrio). Nestas soluções as ciclodextrinas não estiveram presentes e este grupo foi denominado de conjunto Qualificativo (Q) e está especificado na TAB. III.3.2. É importante observar que o intervalo de concentração considerado para estas soluções está dentro dos limites estabelecidos no planejamento anterior de modo que os resultados possam ser comparados no momento oportuno.

TABELA III.3.2
Concentração das soluções do conjunto Q.

Solução	C-01	C-02	C-03 ¹	C-04 ¹	C-05
Concentração de PRX $\mu\text{mol.L}^{-1}$	3,02	6,04	12,1	18,1	24,2

1: essas soluções foram feitas em duplicatas para auxiliar na estimativa do erro.

Para todas as soluções listadas na TAB. III.3.2 foram registrados espectros de excitação (que constituíram as superfícies de excitação-emissão) no mesmo intervalo espectral e nas mesmas condições instrumentais e experimentais utilizadas na coleta de dados para o conjunto P.

Alguns detalhes de ordem prática são mostrados na FIG. III.3.3, onde se observa a cubeta, que é o suporte das amostras utilizado para a coleta de dados. Cabe neste momento levantar algumas questões de ordem experimental, relacionadas com os parâmetros que podem ser ajustados no espectrofluorímetro e que podem interferir de maneira significativa nos resultados, caso não sejam tomadas algumas precauções. Os cuidados estão intimamente relacionados, também, com fatores inerentes ao sistema. Embora Mihalic *et al* (1986) tenham afirmado que o PRX é fotoestável por um longo período de tempo, foi verificado, em estudos preliminares que isso nem sempre é verdade, pelo menos nas condições destes experimentos. Portanto, quando se mencionou a questão dos parâmetros que podem ser ajustados no aparelho e que podem influenciar os resultados deve-se lembrar de pelo menos dois deles. O primeiro, relacionado com a abertura da fenda de excitação, que é diretamente proporcional à quantidade de luz incidente na amostra e, por conseguinte, à quantidade de espécies excitadas e à relação sinal/ruído, mas que pode também fotodegradar a amostra, o que é um fator indesejável. Assim, no momento de registrar os espectros é necessário encontrar uma abertura de fenda que propicie boa relação sinal/ruído mas que evite ou minimize a fotodegradação, deixando de introduzir, dessa forma, uma variável sem

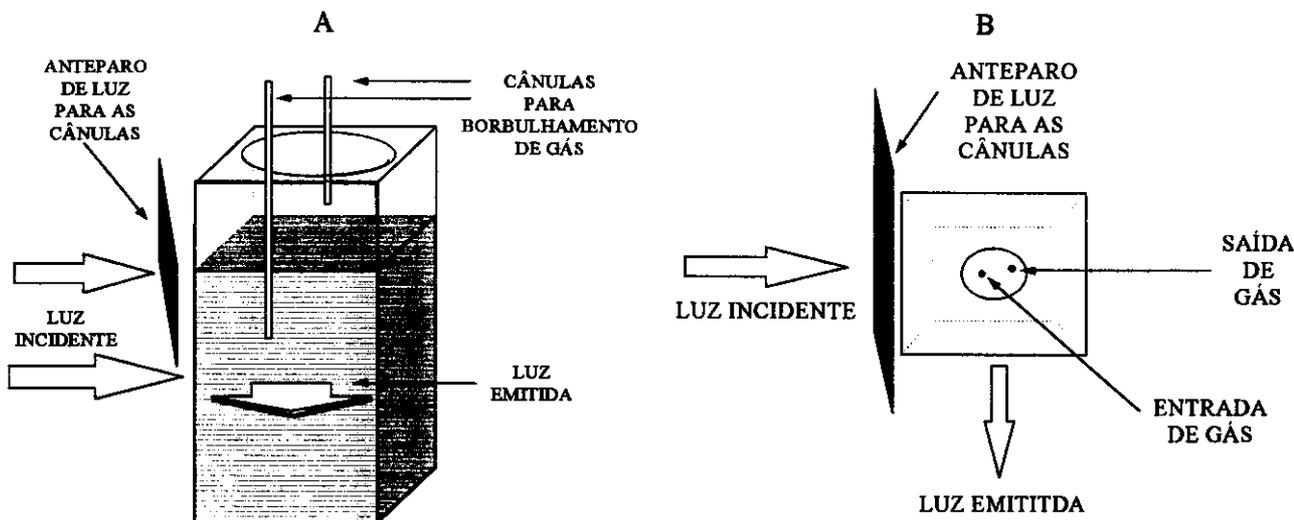


FIGURA III.3.3 – Vista lateral a) e de topo b) da cubeta com detalhes referentes à luz utilizada para excitar as amostras.

controle no experimento. O segundo, está relacionado ao tempo de registro dos espectros, que também pode influenciar de modo indesejável o sinal registrado pelo aparelho. Se a droga sofrer fotodegradação, quanto maior o tempo e a região da amostra exposta à luz da lâmpada do espectrofluorímetro, maior será a possibilidade da mesma ser fotolisada. Entretanto, por razões inerentes ao sistema óptico do aparelho, alguns parâmetros do instrumento podem ser ajustados de modo que a relação sinal/ruído seja melhorada. Há no painel de controle um comando denominado filtro, que em função do número especificado (0 a 3) o aparelho coleta um conjunto de sinais para o mesmo comprimento de onda, e registra a média destes. Quanto maior o número melhor será o espectro, isto é, com menos ruídos. No entanto, maior será o tempo de exposição da amostra à luz. Portanto, as variáveis, tempo de exposição e tempo de registro dos espectros, que influenciam significativamente os dados, são antagônicas e devem ser ajustados de maneira que os prejuízos sejam minimizados. O instrumento apresenta outros parâmetros reguláveis, como abertura da fenda de emissão, tensão e ganho nas fotomultiplicadoras, a função "ratio", etc., que influenciam o sinal registrado, mas essas não estão diretamente relacionadas à fotodegradação da droga e podem ser controladas. Os problemas relativos a esses ajustes foram resolvidos em estudos preliminares quando todas as variáveis foram otimizadas em função do sistema sob investigação.

Outro detalhe de ordem experimental se refere às cânulas, utilizadas para borbuihar os gases na cubeta. Além da necessidade de todo o material de vidro estarem limpos (lavados com solução sulfonítrica) é melhor evitar que as cânulas, durante a coleta de dados, recebam luz direta, pois as mesmas, por serem de metal, podem atuar como catalisadores de alguma fotoreação e também provocar espalhamento de luz alternado os dados. Por essa razão foi colocado um anteparo impedindo que a luz as atingisse (FIG. III.3.3).

III.4 - TRATAMENTO DOS DADOS. DECONVOLUÇÃO ESPECTRAL VIA PARAFAC.

Os cálculos de deconvolução espectral foram realizados utilizando-se o pacote PARAFAC versão 1.1 (Bro (1997)) e o MATLAB (versão 4.2.c) num microcomputador 486 DX4 100MHz, com 16Mb de memória RAM.

Todos os dados foram "alisados" antes dos cálculos, utilizando-se do método de Savitzky-Golay (1964). Esse método ajusta polinômios a um determinado número de pontos que são especificados numa linha de comando. O "alisamento", que se constitui na diminuição do ruído inerente a todo dado experimental, geralmente melhora os resultados. Há no PLS_Toolbox (versão 1.3, Andersson (1995)) uma rotina para esse tipo de cálculo, considerando o método acima citado. A linha de comando utilizada foi:

$$y_hat = savgol(y,width,order,deriv);$$

com $width = 7$, $order = 5$ e $deriv = 0$

Onde y_hat corresponde aos novos dados alisados, y aos dados originais, $width$ ao número de pontos utilizados para o ajuste, $order$ à ordem do polinômio e $deriv$ ao grau de derivação se for o caso. É importante mencionar que tanto os parâmetros $width$ e $order$ foram determinados após uma série de tentativas. Quando um ajuste desse gênero é realizado pode ocorrer que em decorrência do tipo de dado tratado haja alterações significativas: achatamento nas bandas de emissão e de excitação ou mesmo deslocamentos. Contudo, este não é o objetivo deste tipo de tratamento mas simplesmente a diminuição do ruído. Os parâmetros que melhor se ajustaram aos dados originais sem alterações relevantes foram os citados.

O programa PARAFAC oferece algumas opções de cálculos que são incluídas numa linha de comando no MATLAB:

$$[A,B,C,D,E,F,G,H,I,J]=p_als(X, Fac, crit, init, DimX, Plot, Flag, const, Old_load, showfit)$$

onde:

1. $[A,B,C,D,E,F,G,H,I,J]$ são os resultados que correspondem aos modos dos dados de entrada. Esse algoritmo pode calcular até um arranjo de 10 modos. Para os dados em estudo podem-se utilizar, por exemplo, até cinco modos: concentração da droga e de O_2 , tipo de ciclodextrina, espectros de emissão e espectros de excitação, ou agrupar aquelas amostras que tenham em comum uma das ciclodextrinas e ignorar as demais; dessa forma o número de modos cai para três: espectros de emissão, espectros de excitação e amostras.

2. *P_als*: é a chamada da sub-rotina para o cálculo.
3. *X*: é a matriz de entrada dos dados. Imaginando um arranjo de três modos, espectros de emissão, espectros de excitação e amostras, por exemplo, *X* é construída a partir das matrizes de cada amostra arranjadas uma abaixo da outra. Assim, para 5 matrizes, com dimensões de 115x28, *X* toma a dimensão de 115x140=115x(28x5).
4. *Fac*: é o número de fatores que o programa utiliza para construir o modelo. Esse número corresponde ao das espécies quimicamente fluorescentes presentes no sistema e pode variar de sistema para sistema e de modelo para modelo, como será abordado na seção de Resultados e Discussões.
5. *Crit*: é o critério de convergência alterado em função dos cálculos e do sistema. Dos cálculos, porque um critério de convergência maior implica que a matriz de erros pode conter informações relevantes e do sistema porque, dependendo dos erros inerentes ao mesmo (englobando inclusive a técnica experimental) esse critério pode ser diminuído ou aumentado. O valor padrão é de 1.10^{-6} .
6. *Init*: é o método de inicialização e pode ser: aleatório, valores anteriores, autovalores generalizados ou então uma solução do PCA. Após essa inicialização o programa estabelece alguns critérios para a construção do modelo e o cálculo continua em função dos demais parâmetros especificados na linha de comando.
7. *DimX*: é a dimensão do paralelepípedo de dados e para 5 amostras fica [115x28x5].
8. *Plot*: pode assumir o valor de 1 ou 0: 1 o programa mostra os resultados na forma de gráficos na tela do computador e 0 apresenta somente os valores numéricos nos resultados de saída ([A,B,C]).
9. *Flag*: se *flag*=1.11 é indicativo de que não há dados faltantes, caso contrário, o programa faz uma estimativa e então os considera para o cálculo.
10. *Const*: está relacionado às restrições impostas para o ajuste dos dados. Pode assumir os valores: 0, 1, 2 e 3: 0 os dados são ajustados sem restrições; 1 é imposta a restrição de ortogonalidade entre as variáveis; 2 de não negatividade e 3, também de não negatividade mas que, segundo os autores, os cálculos são realizados um pouco mais rapidamente embora a opção 2 seja mais confiável. A questão relativa à restrição será abordada no Anexo II com mais detalhes.
11. *Old_load*: se há valores que podem ser inicialmente carregados. Esses valores devem estar na forma de matriz e correspondentes às dimensões de *X* e podem ser os resultados de cálculos já efetuados e tomar a forma dos valores de saída como: [A,B,C, ...].
12. *Showfit*: é um parâmetro relacionado com a frequência em que os resultados são mostrados na tela do computador. O valor padrão é 10 indicando que a cada 10 iterações

o programa mostra os valores da diferença entre os dados originais e o modelo construído.

Todos os cálculos de deconvolução espectral correspondente ao ESTUDO FOTOFÍSICO DO PIROXICAM EM MEIO HIDROFÍLICO EM PRESENÇA DE CICLODEXTRINAS foram realizados com a seguinte linha de comando:

```
[A B C]=p_anal(X,5,1e-6,0,[115 28 5],0,1.11,[2 2 0]);
```

A diferença aqui reside na sub-rotina utilizada, ou seja, *p_anal* e não *p_als*. Essa rotina chama a anterior, *p_als*, várias vezes e então todo o cálculo é repetido em função do número de componentes. Nesta linha de comando a rotina *p_anal* chama a subrotina *p_als* 5 vezes e a cada uma delas é construído um modelo com um número de componentes diferentes desde 1 até 5.

Foram construídas a partir dos dados originais, as superfícies de excitação-emissão ou matriz de dados, 3 matrizes X correspondentes às amostras que possuem em comum a presença da α - β - e γ -CD respectivamente denominadas de X-alfa, X-beta e X-gama. Cada um destes conjuntos de dados foi tratado separadamente com o PARAFAC, usando-se a linha de comando acima mencionada. O conjunto Q foi tratado da mesma forma, ou seja, as matrizes correspondentes aos dados de cada solução (TAB. III.3.2) foram agrupadas e constituíram uma matriz X que foi então utilizada na construção do modelo Q. Esses cálculos geraram cinco modelos diferentes para cada conjunto de dados, ou seja, Q, X-alfa, X-beta e X-gama. Contudo, somente um modelo para cada um desses conjuntos foi escolhido para análise. Os cálculos são realizados dessa forma para que se possa escolher o número de componentes adequado em cada modelo, entendendo-se por isso que um determinado modelo deve se ajustar preferencialmente a cada conjunto de dados. O número de componentes, interpretado como o número de espécies quimicamente fluorescentes, foi escolhido em função tanto dos parâmetros que os cálculos oferecem (CAP. IV) e do conhecimento prévio a respeito do sistema estudado, mencionado na introdução da Tese, como também de alguns perfis dos "loadings" que o modelo pode encontrar. Por meio da análise desses perfis podem-se reconhecer problemas de degenerescência (Bro (1997)), ou seja, quando os "loadings" de dois componentes apresentam aproximadamente os mesmos valores em toda a sua extensão. Esse problema pode aparecer quando: a) os dados são altamente correlacionados; b) o modelo estiver sendo construído com um número excessivo de componentes; c) os dados são mal pré processados; d) o modelo é simplesmente inapropriado para explicar os dados pelo fato destes não serem trilineares.

III.5 - RECONSTITUIÇÃO ESPECTRAL DOS DADOS DECONVOLUÍDOS.

Nesta seção será apresentado um exemplo de reconstituição de uma das amostras para um dos conjuntos de dados (X-beta) a partir dos resultados obtidos na deconvolução espectral segundo o PARAFAC.

A FIG. III.5.1 mostra alguns resultados de deconvolução, segundo o PARAFAC, para o conjunto de dados X-beta e a TAB. III.5.1 apresenta os valores dos "loadings" do modo da concentração, que foi utilizado para ilustrar a reconstituição da amostra número treze (ESQ. III.5.1).

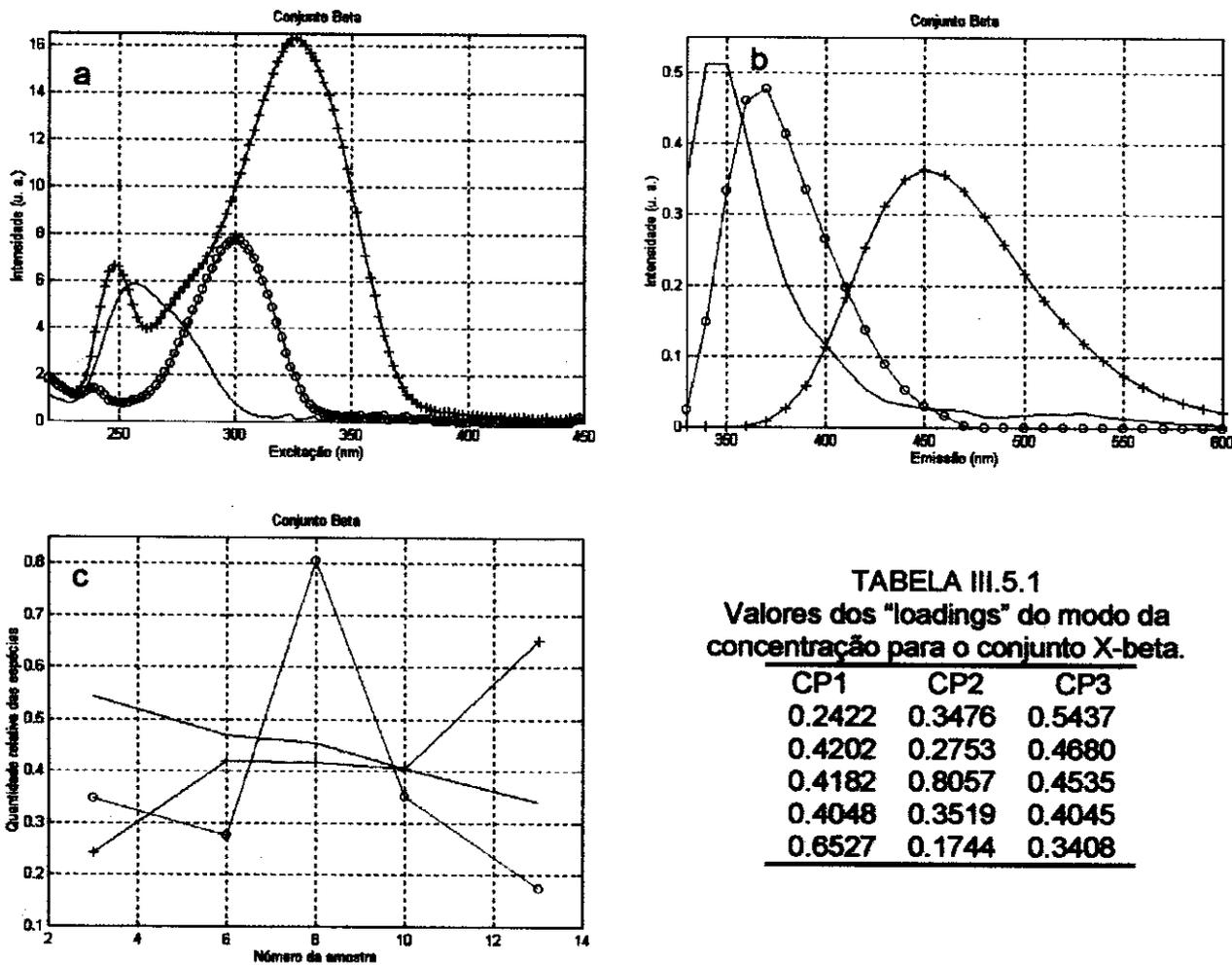


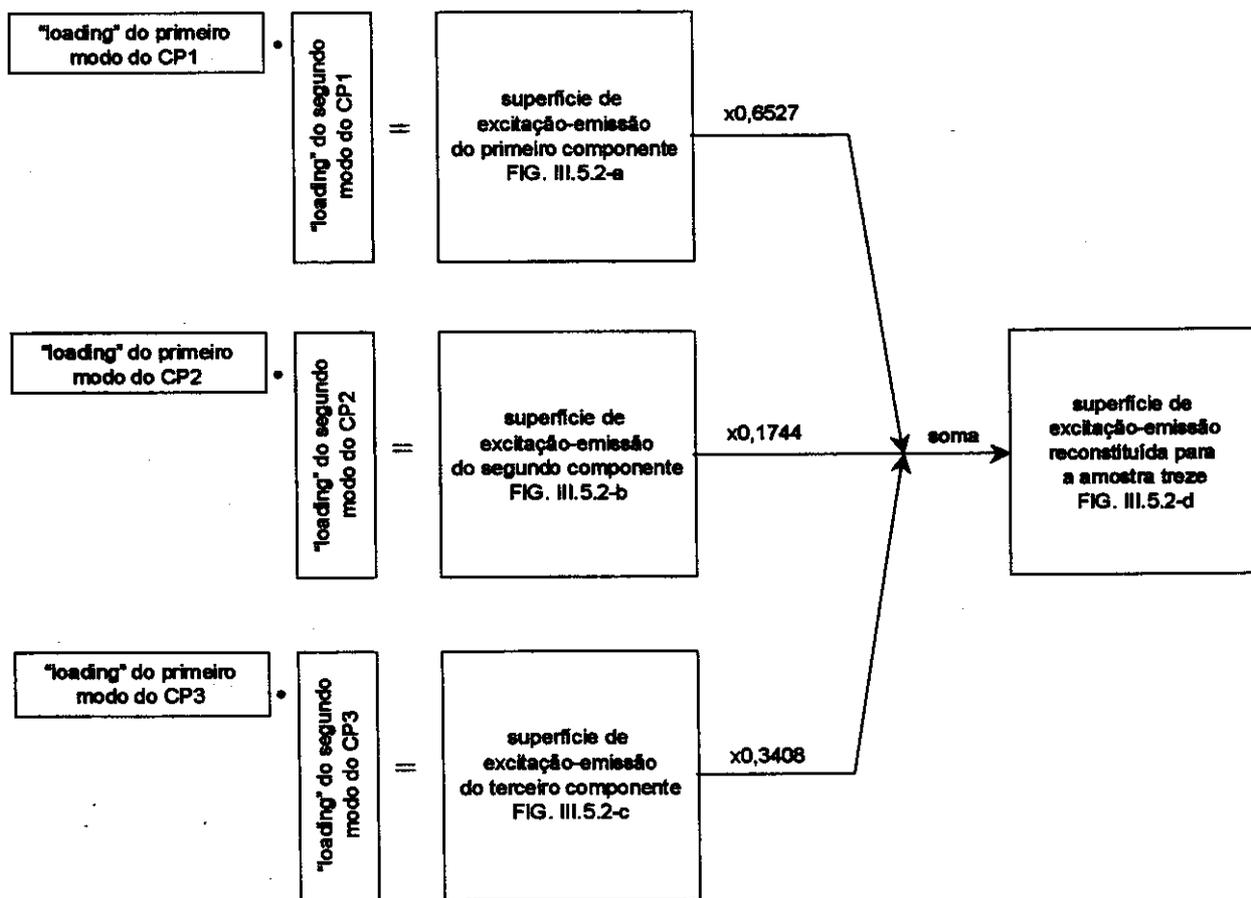
FIGURA III.5.1 – Alguns resultados dos cálculos de deconvolução via PARAFAC para o conjunto X-beta (seção III.3): a) "loadings" para o primeiro modo , b) "loadings" para o segundo modo e c) "loadings" para o terceiro modo (+ CP1, o CP2 e – CP3).

Conforme especificado no planejamento experimental (TAB. III.3.1 e FIG. III.3.1) e no tratamento dos dados de luminescência total (seção III.4) as amostras foram agrupadas em função do tipo de ciclodextrina, pois foi esse modo o que apresentou os melhores resultados sem problemas de inconsistência ou de degenerescência. Os resultados desses cálculos

foram utilizados para estimar o erro envolvido na construção dos modelos para cada conjunto e conseqüentemente o grau de ajuste para cada qual, assunto que será discutido em momento oportuno (Seção IV.3).

O ESQ. III.5.1 ilustra os cálculos realizados na reconstrução da amostra 13 (conjunto X-beta) e que foram utilizados para todas as demais amostras (Q, X-alfa e X-gama). A FIG. III.5.2 apresenta os resultados dos cálculos de reconstituição segundo o ESQ. III.5.1 para a amostra 13 do conjunto P, correspondente ao subconjunto X-beta. Pode-se observar a superfície de excitação-emissão para cada componente da mistura separadamente (CP1, CP2 e CP3) que foi utilizado na construção do modelo para esse conjunto de dados. Questões relacionadas ao número de componentes utilizado e outras importantes na construção de modelos, empregando-se o PARAFAC, serão discutidas na Seção IV.3.

ESQUEMA III.5.1
Um exemplo de cálculo de reconstrução.



A multiplicação dos "loadings" dos dois primeiros modos (excitação e emissão) para cada componente gerou superfícies que foram interpretadas como as correspondentes à de excitação-emissão de cada espécie fluorescente no sistema sob investigação. Contudo, os resultados que serão discutidos correspondem somente aos perfis de excitação e aos de

emissão para cada uma dessas espécies, pois um dos objetivos desse tipo de tratamento é a redução da dimensionalidade dos dados, de modo que sua interpretação seja facilitada.

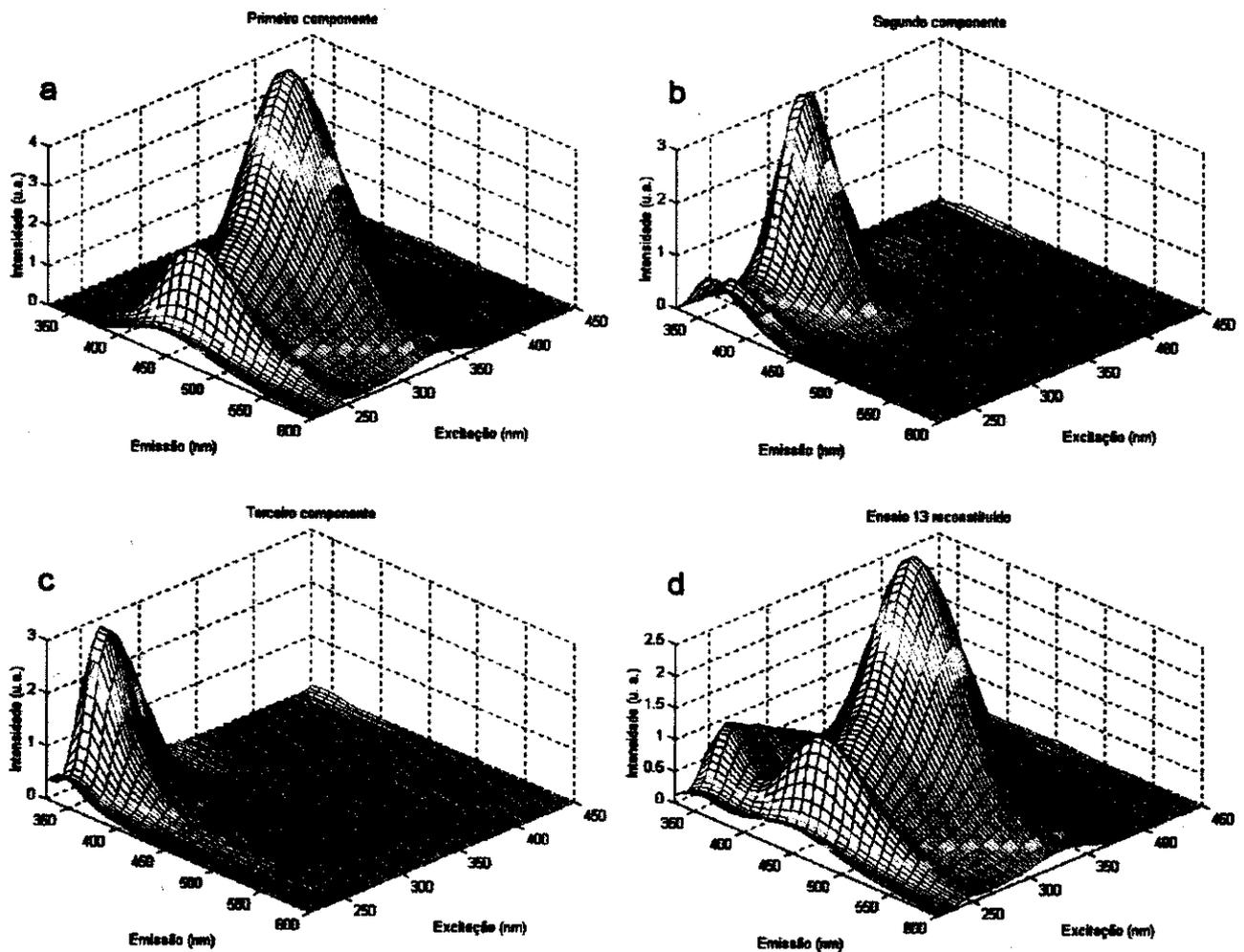


FIGURA III.5.2 – Resultados dos cálculos de reconstituição da amostra 13 do conjunto X-beta. Perfil de excitação-emissão para: a) primeiro componente, b) segundo componente, c) terceiro componente e d) amostra reconstituída segundo ESQ. III.5.1.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO β -CD-PRX

Antes de iniciar a discussão propriamente dita é necessário fazer as devidas atribuições das bandas de absorção no IV, tanto para o PRX como para a β -CD puros e compará-las com as da mistura física (MF) e do complexo. Na FIG. IV.1.1 pode-se observar a presença de uma absorção a $\approx 3300\text{cm}^{-1}$ para o espectro da amostra de PRX. Silverstein *et al* (1987) atribuem essa absorção a um estiramento simétrico de O-H com ligação intramolecular fraca de hidrogênio. As absorções na região entre 3600 e 3100cm^{-1} para a β -CD (FIG. IV.1.1), caracterizando uma banda larga, correspondem ao estiramento O-H com ligação intermolecular.

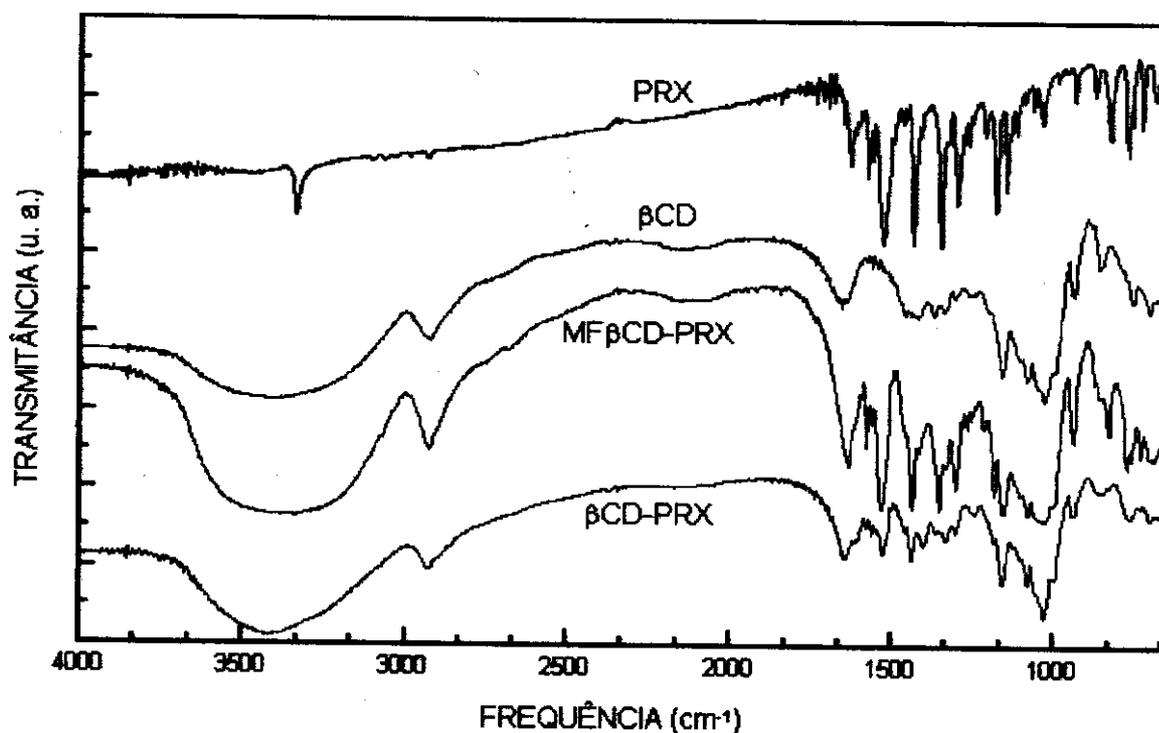


FIGURA IV.1.1 – Espectros de IV do PRX, β -CD, MF e β -CD-PRX.

Na FIG. IV.1.2, onde a região espectral compreendida de 1000 a 1800cm^{-1} foi ampliada, observam-se as seguintes absorções relevantes para o PRX: a) em $\approx 1650\text{cm}^{-1}$, que pode ser atribuída ao estiramento da ligação C=C tanto dos alquenos como dos aromáticos ou ainda ao estiramento C=O do grupo amida; b) em $\approx 1530\text{cm}^{-1}$, atribuída à deformação angular da ligação N-H do grupo amida. Esta absorção pode, ainda, estar sobreposta a outras devido a deformações angulares e axiais dos anéis aromáticos da molécula, tanto o benzênico como o piridínico; c) em $\approx 1440\text{cm}^{-1}$, que é característico de deformações assimétricas do grupo CH_3 bem como do estiramento C=C do anel aromático; d) em 1350 e em 1180cm^{-1} , que podem estar associadas às deformações assimétrica e simétrica, respecti-

vamente, do grupo SO_2 ; e) em 1300cm^{-1} , correspondente à deformação axial de C-N de aminas aromáticas em geral e, portanto, deve estar relacionada com essa ligação na molécula de PRX; f) em 1150cm^{-1} , que pode ser atribuída à deformação axial de C-O de álcoois. Entretanto, essas absorções tomam-se de difícil interpretação quando há possibilidade de acoplamentos vibracionais. No espectro da CD (FIG. IV.1.2,) podem-se observar inúmeras absorções. Uma das que se destaca é aquela entre ≈ 1180 a 1150cm^{-1} , atribuída à deformação axial dos grupos C-O.

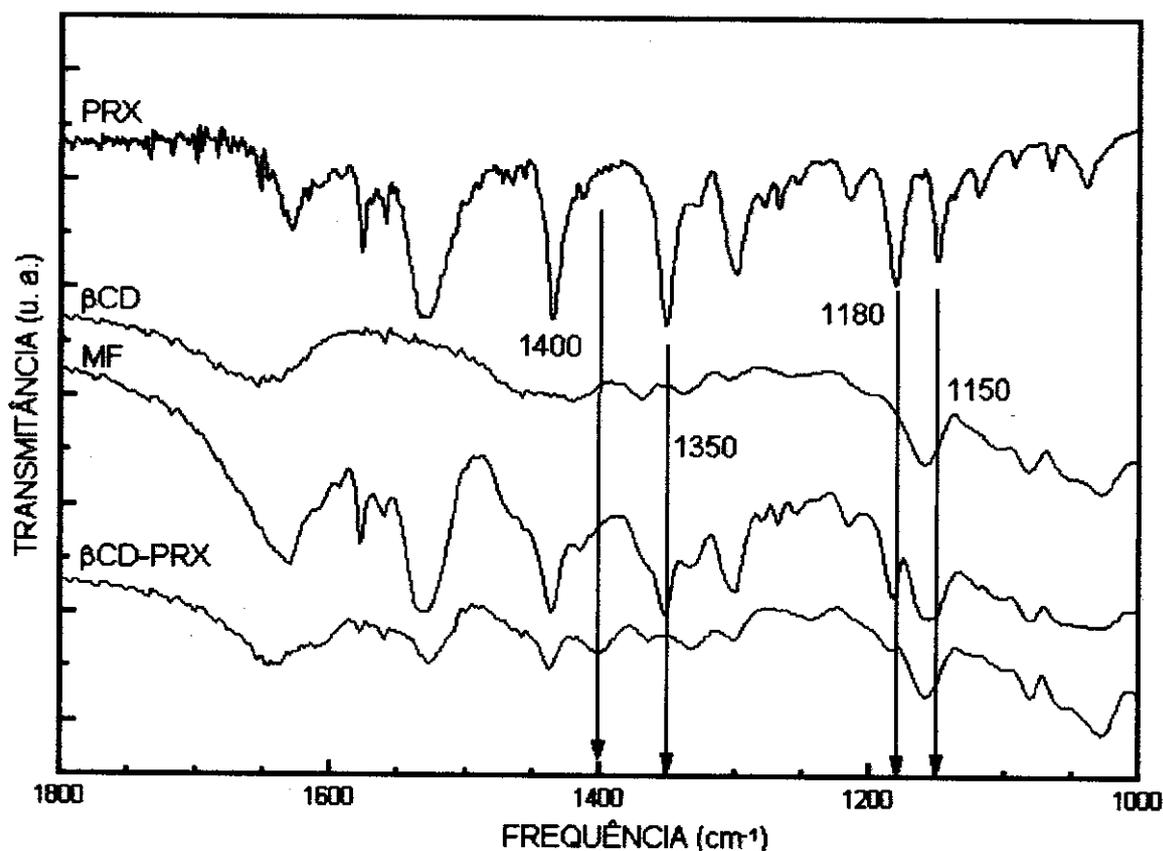


FIGURA IV.1.2 – Espectros de IV do PRX, β -CD, MF e β -CD-PRX (região entre 1800 e 1000cm^{-1} , ampliada da FIG. IV.1.1).

Percebe-se que as atribuições das absorções não é tarefa fácil mesmo porque a molécula de PRX apresenta vários grupos com influenciam mútua, seja por indução ou por ressonância, provocando deslocamentos e acoplamentos. Contudo, alguns pontos podem ser destacados quando se comparam os espectros devidos às quatro amostras como ilustra as FIG. IV.1.1 e IV.1.2: a) verifica-se, de um modo geral, que aquele referente à MF é a soma dos outros dois. Isso é um indício de que não ocorreu a formação do complexo apenas pelo fato de se mistura as substâncias fisicamente em um almofariz. O alargamento da banda, observado em $\approx 3400\text{cm}^{-1}$, é indício que ocorrem interações intermoleculares entre a droga e a CD. Wernick *et al* (1990) citaram casos em que pela simples exposição da CD (obtida por precipitação) ao vapor de ciclopentadieno e endo-diciclopentadieno, ocorreu a

formação de complexos ternários; b) o aparecimento de uma banda em 1400cm^{-1} com simultâneo desaparecimento da banda em 1350cm^{-1} para o complexo (β -CD-PRX). Essas modificações podem ser interpretadas de três modos diferentes: a primeira, devido a um deslocamento da banda de 1350cm^{-1} para 1400cm^{-1} que corresponde ao estiramento axial da ligação C-O; a segunda, pelo fato de ter-se formado o correspondente sal de amônio na complexação e este permanecer mesmo após o borbulhamento do N_2 para eliminar o excesso de amônia utilizada e a terceira, ao estiramento assimétrico do grupo sulfonato (SO_2) pelo fato de estar agora num ambiente diferente; c) o desaparecimento, ou deslocamento para regiões de menor frequência, da absorção em 1150cm^{-1} , é atribuído à deformação axial C-O que pode estar acoplada a outras vibrações moleculares, embora Lin *et al* (1989) tenham sugerido que o aparecimento dessa banda se deve a um deslocamento da absorção do grupo O-H em 1180cm^{-1} devido à complexação em β -CD.

Dessas diferenças, a que sugere a formação do complexo são as alterações devidas ao grupamento SO_2 . Essa parece ser a modificação mais relevante e em concordância, pois se existem alterações espectrais correspondentes a algum grupo da molécula pelo fato da mesma estar em ambientes distintos (complexada ou não) e se esse grupo apresenta mais de um modo vibracional ativo no IV, é de se esperar que pelo menos alguma alteração ocorra simultaneamente nas correspondentes vibrações em função dos meios, pois quando a molécula de PRX se encontra complexada, alguns movimentos moleculares de vibração e/ou deformação podem ficar restritos. Este fato pode estar associado também ao desaparecimento (ou deslocamento) da absorção a 1150cm^{-1} .

Examinando-se os diagramas de TGA (FIG. IV.1.3), observa-se que: a) para o PRX existe apenas um estágio de perda de massa na região de 263°C , indicando que a amostra apresenta elevado grau de pureza; b) para a β -CD há dois estágios de perda de massa nas regiões de 83 e 320°C , correspondendo, respectivamente, à desidratação (8,3%) e à decomposição (79%); c) para a MF, observam-se três estágios de perda de massa: 1) na região de 83°C (6,8%); 2) em 207°C (5,9%) e 3) em 319°C (73%); d) para a amostra β -CD-PRX há apenas dois estágios de perda de massa: 1) na região de 83°C (3%) e o 2), em 292°C (83%), correspondendo respectivamente, à desidratação e à decomposição da amostra.

Esses resultados permitem concluir que:

- i) não houve complexação para a amostra da MF, uma vez que a mesma apresentou três estágios de perda de massa correspondendo à água, à droga livre e à CD, respectivamente, que estão aproximadamente na mesma região daquelas das amostras puras, exceto um deslocamento para o PRX;
- ii) ocorreu complexação na amostra β -CD-PRX porque: a) o percentual de perda de massa correspondente à desidratação para três das quatro amostras foi de 6,8% para a MF, 8,3% para a CD e 2,9% para a β -CD-PRX. Esses valores estão muito

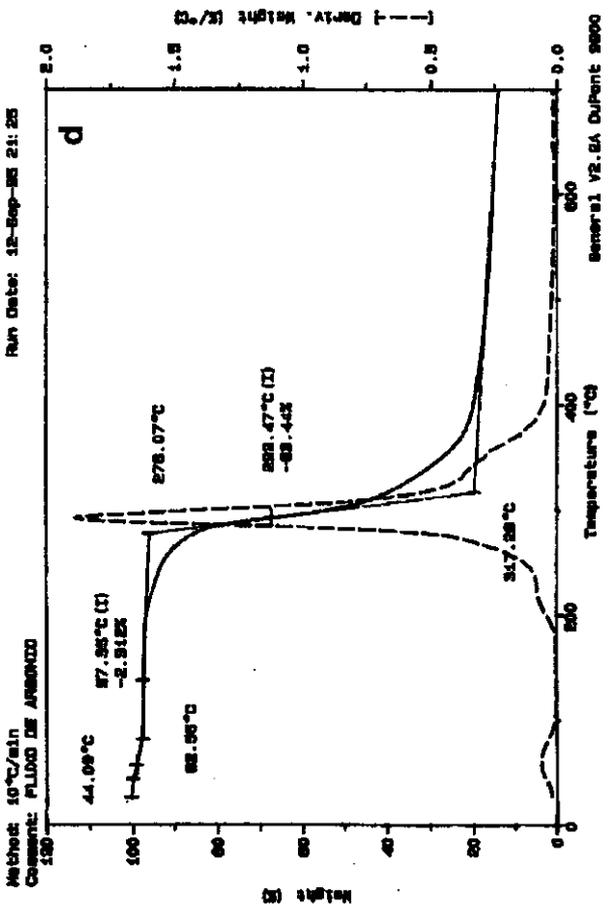
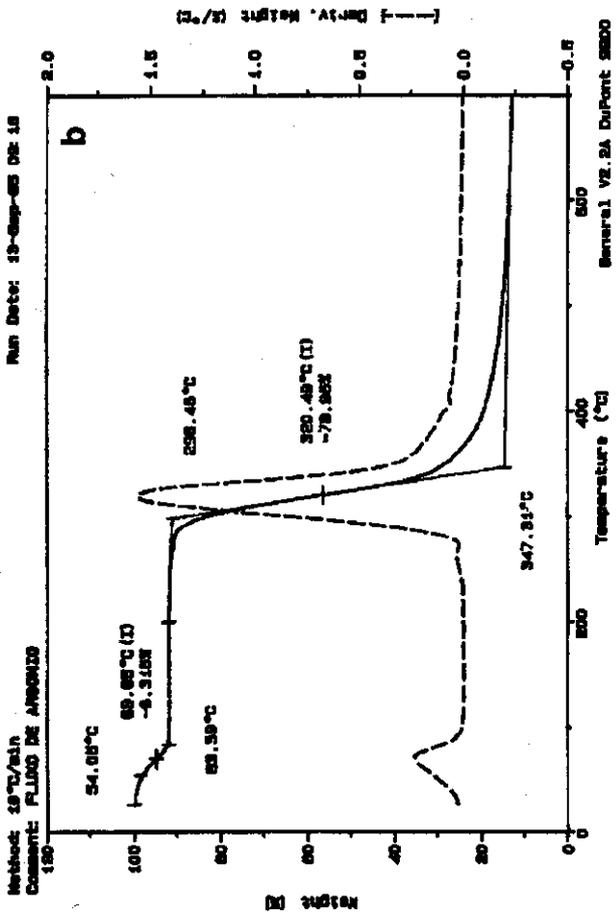
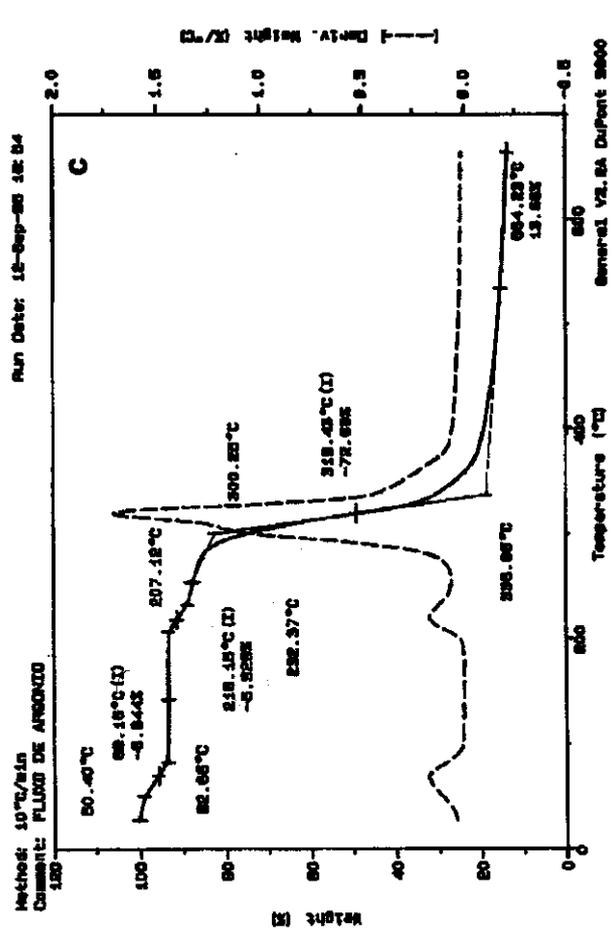
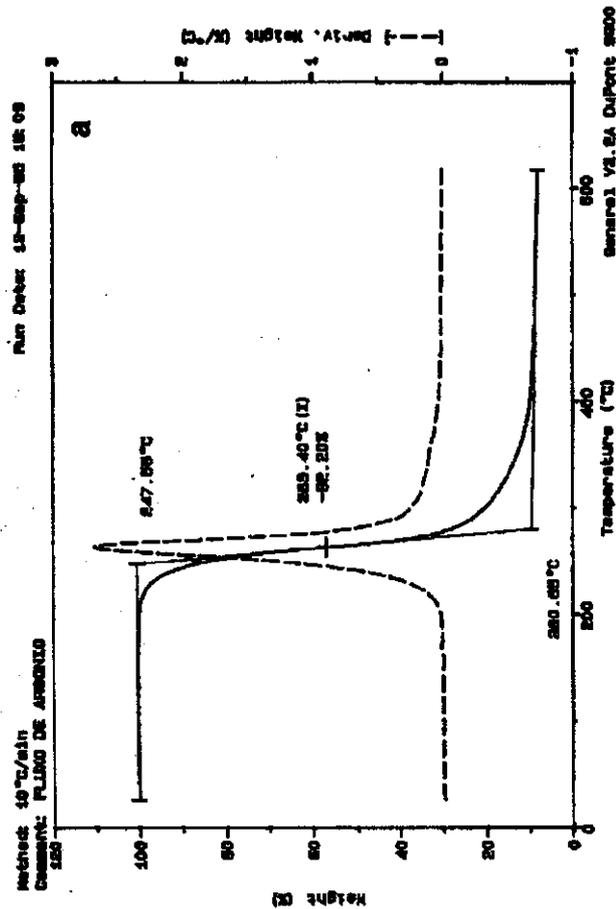


FIGURA IV.1.3 – Diagramas de análise termogravimétrica para: a) PRX, b) β -CD, c) MF e d) β -CD-PRX.

próximos para as duas primeiras amostras, sendo menores para a última. Sabendo-se que as moléculas de água, que fazem parte da estrutura cristalina da β -CD, estão na cavidade, houve de fato a troca das moléculas de água pelas moléculas de PRX; b) no diagrama correspondente à amostra β -CD-PRX ocorreu somente um estágio de perda de massa, além da perda por desidratação.

Os diagramas de DSC (FIG. IV.1.4) vêm corroborar os dados obtidos por estarem de pleno acordo com os diagramas de TGA, ou seja, a formação do complexo β -CD-PRX. Observa-se que o PRX e a β -CD possuem picos endotérmicos aproximadamente em 203 e em 138°C, respectivamente (FIG. IV.1.4 a e b) e este padrão é seguido no diagrama para a MF (FIG. IV.1.4 c), que é semelhante à soma dos diagramas das amostras separadas, com pequena variação na posição dos picos e no estágio final, quando comparado com o do PRX. O diagrama da amostra β -CD-PRX (FIG. IV.1.4 d) não apresenta semelhança com as demais. Destaca-se a ausência do pico correspondente ao PRX, indicando que a droga perdeu a sua "identidade cristalina" pelo fato de ter ocorrido a complexação, ou seja, o complexo não possui mais os comportamentos térmicos do PRX ou da CD livres, ou simplesmente a soma desses comportamentos, mas apresenta características próprias.

Os difratogramas de raios-X (FIG. IV.1.5) deixam claro que os padrões são diferentes, o que seria esperado para as amostras dos componentes separados. Embora o difratograma correspondente à MF não represente a soma dos componentes individuais, mesmo que alguma sobreposição possa ser observada na região entre 1,0° e 2,0° (2 θ), é evidente que há uma estrutura cristalina, indicado principalmente pelo padrão existente na região de 1,0° a 3,0° (2 θ). Contudo, o gráfico para a β -CD-PRX mostra que não há cristalinidade nessa amostra, ou seja, a mesma é amorfa e a estrutura formada entre as moléculas da droga e a β -CD é bem distinta, seja dos seus componentes individuais, seja da MF. Estes fatos vêm afirmar a complexação do PRX na β -CD indicando que a estrutura é amorfa.

Observando-se as fotografias de microscopia eletrônica de varredura (FIG. IV.1.6) destaca-se que: a) os cristais das substâncias puras apresentam morfologias distintas sendo os da β -CD mais regulares quando comparados com os do PRX que, por sua vez, possuem formatos caracteristicamente irregulares. Isso pode ser confirmado ao se compararem as FIG. IV.1.6 a2 e b2, que mostram as fotografias dos cristais com aumento de 1500 vezes. Observa-se que o cristal de β -CD possui superfícies mais planas que aquelas do cristal de PRX; b) as FIG IV.1.7 a1 e a2 exibem a morfologia dos cristais da amostra β -CD-PRX, com aumento de 200 e 1500 vezes respectivamente, que é completamente diferente daquela das substâncias puras pois se apresentam mais volumosos, com mais "espaços vazios"; c) os cristais da amostra MF constitui uma composição daqueles das substâncias originais (FIG. IV.1.7- a1). Comparando-se as FIG. IV.1.7-a2 e b2 fica evidente que os cristais da amostra β -CD-PRX e MF são diferentes, indicando a complexação.

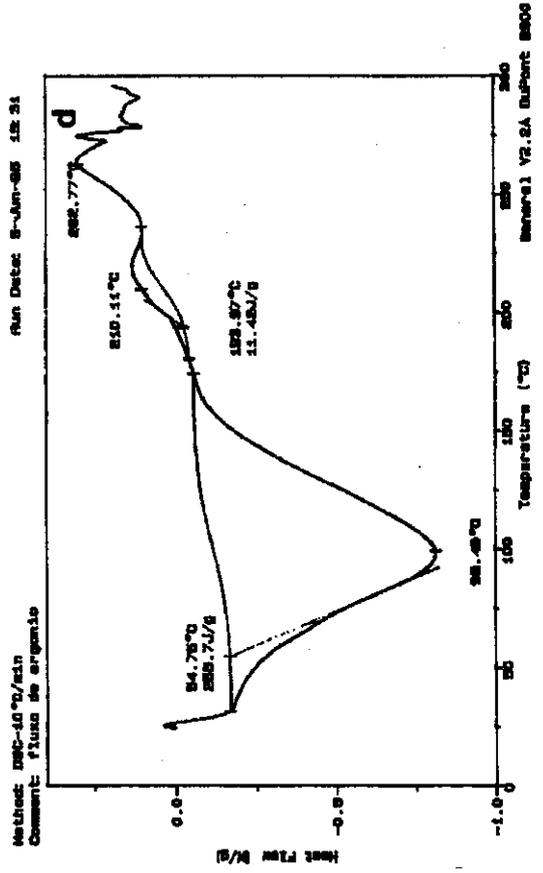
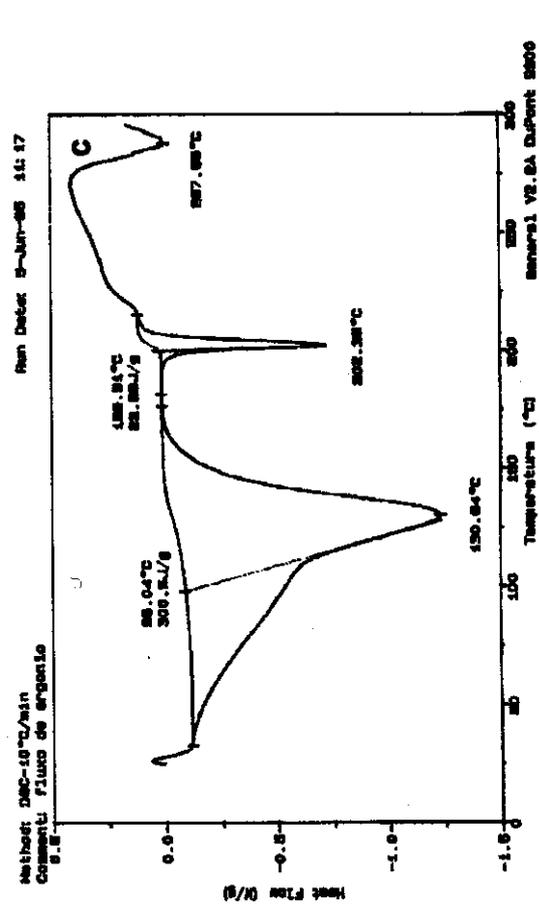
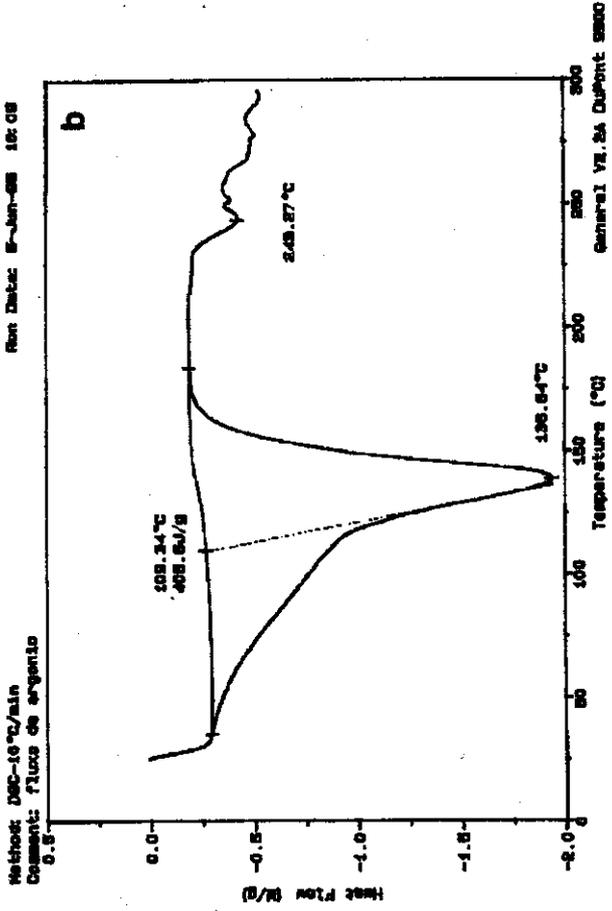
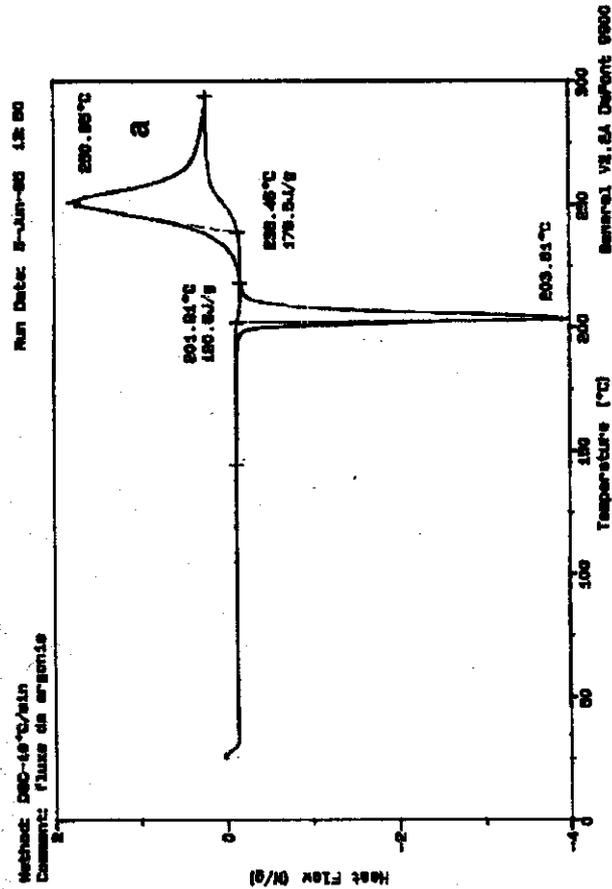


FIGURA IV.1.4 – Diagramas de calorimetria diferencial de varredura para: a) PRX, b) β -CD, c) MF e d) β -CD-PRX.

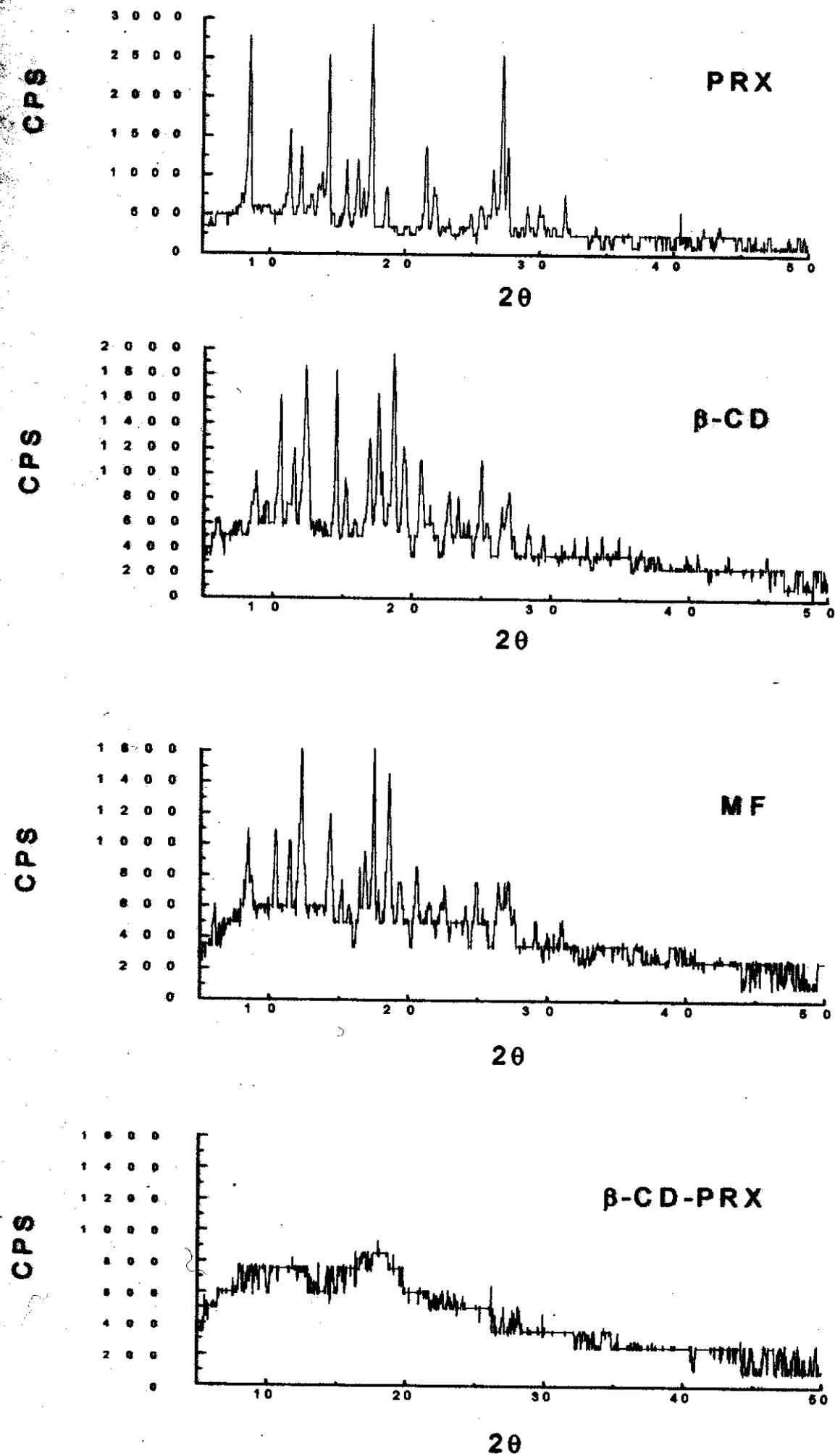


FIGURA IV.1.5 – Difratoigramas de raios-X para: PRX, β -CD, MF e β -CD-PRX.

Lin Shan-Yang *et al* (1989) caracterizaram alguns complexos formados com a β -CD e, dentre estes, aquele formado entre a β -CD e o PRX, utilizando as mesmas técnicas que mencionadas nesta seção. Entretanto, os autores discutiram a questão da metodologia ("spray-drying") utilizada para a preparação dos complexos, não aprofundando as discussões de cada caso em particular.

Alves e Fonseca (1989) (REF.) estudaram o complexo do ácido fenilpropinóico em β -CD utilizando as técnicas TGA, DSC, MEV, IV, RX e RMN ^{13}C . Considerando algumas das interpretações dadas pelos autores pode-se entender os diagramas de TGA no que se refere às perdas de massa por parte da ciclodextrina. Os autores chegaram à conclusão que a β -CD forma complexo com o ácido fenilpropinóico encapsulando o anel aromático desta molécula.

Analisando os dados de TGA, DSC e MEV conclui-se que houve formação do complexo entre o PRX e a β -CD. Os espectros de IV não trazem informações seguras (justamente por causa da complexidade do sistema) sobre sobreposições das bandas, bem como dos acoplamentos que, por conseguinte, podem gerar interpretações errôneas. Entretanto, pelas modificações observadas nas absorções do grupo sulfonato há indícios de que essa parte da molécula de PRX é encapsulada na cavidade da CD. Fronza *et al* (1992) estudaram, via RMN ^1H em solução de água deuterada, a complexação do sal de sódio dessa droga em β -CD, propondo que o encapsulamento ocorre com os grupos piridínico e benzênico localizando-se na borda menor da CD. Portanto, no caso do anel benzênico, não há a possibilidade de acomodar o grupamento sulfonato. É preciso lembrar que os autores realizaram o estudo em solução aquosa e com o sal da substância e, nesta Tese foi investigada a complexação do PRX (e não seu sal) no estado sólido e em diferentes condições experimentais.

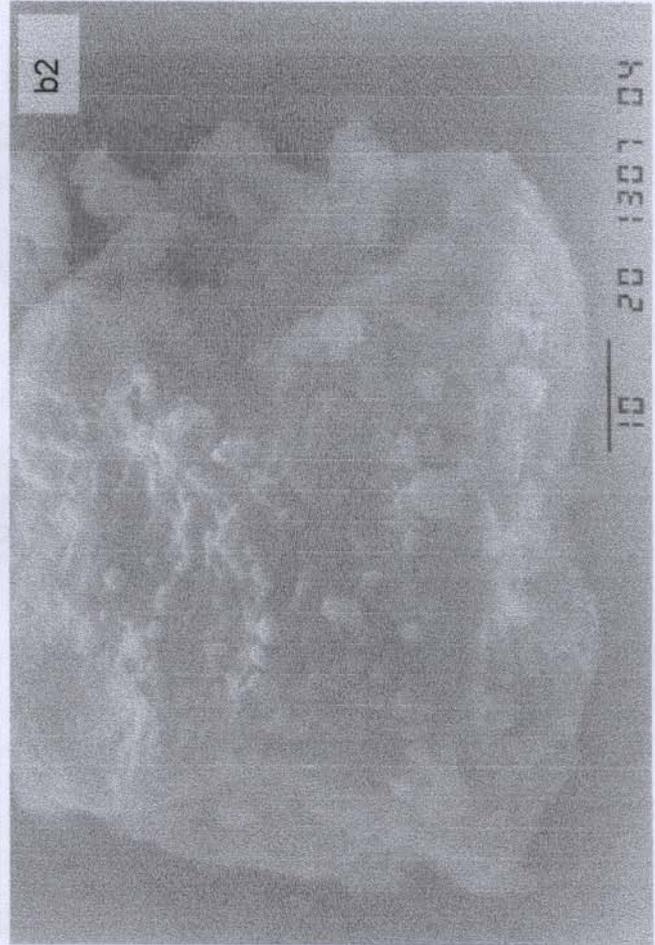
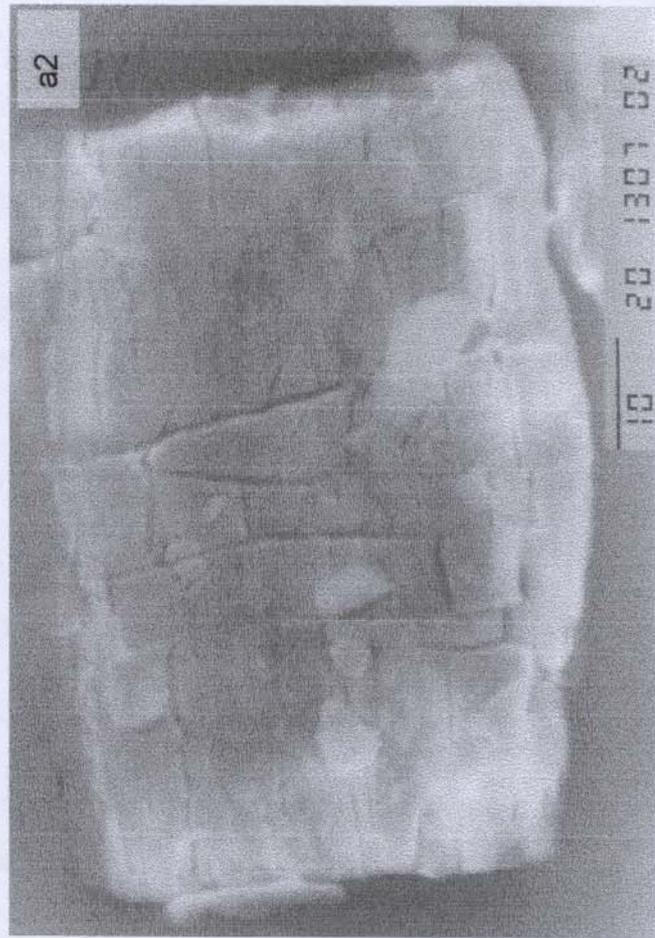
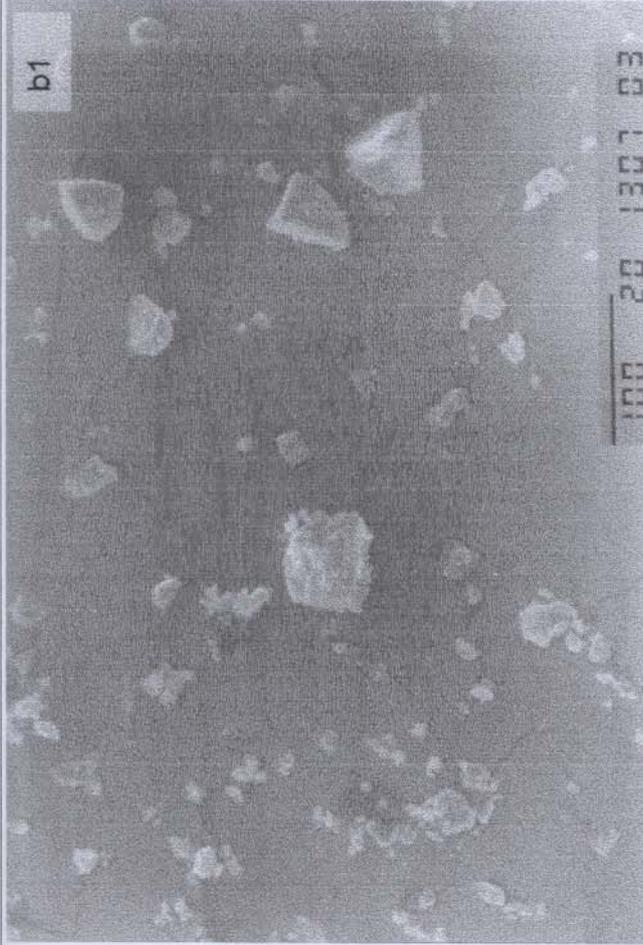
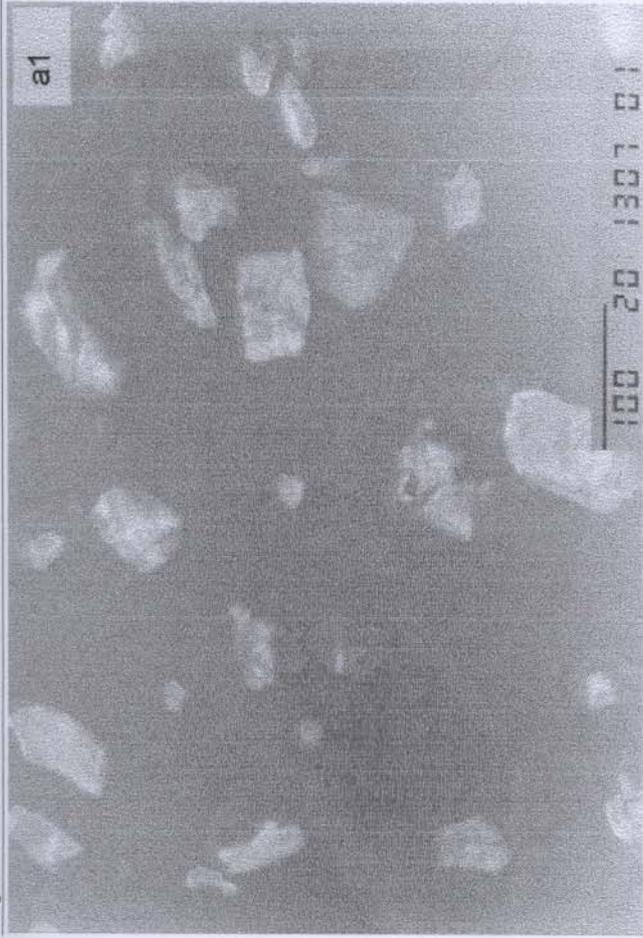


FIGURA IV.1.6 – Fotografias de microscopia eletrônica de varredura: a1) β -CD (200x), a2) β -CD (1500x), b1) PRX (200x), b2) PRX (1500x).

Tese de Doutorado

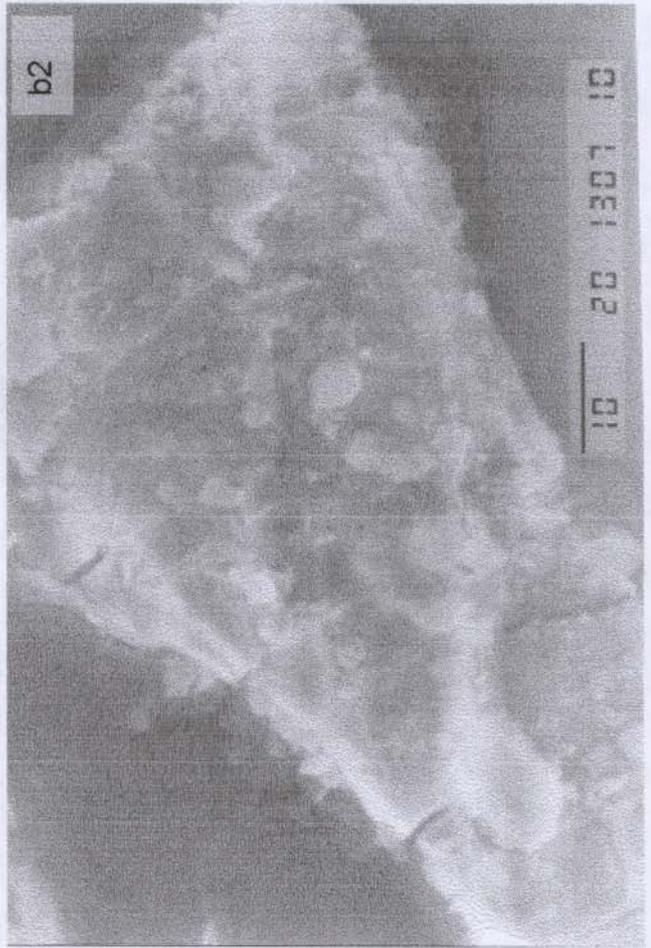
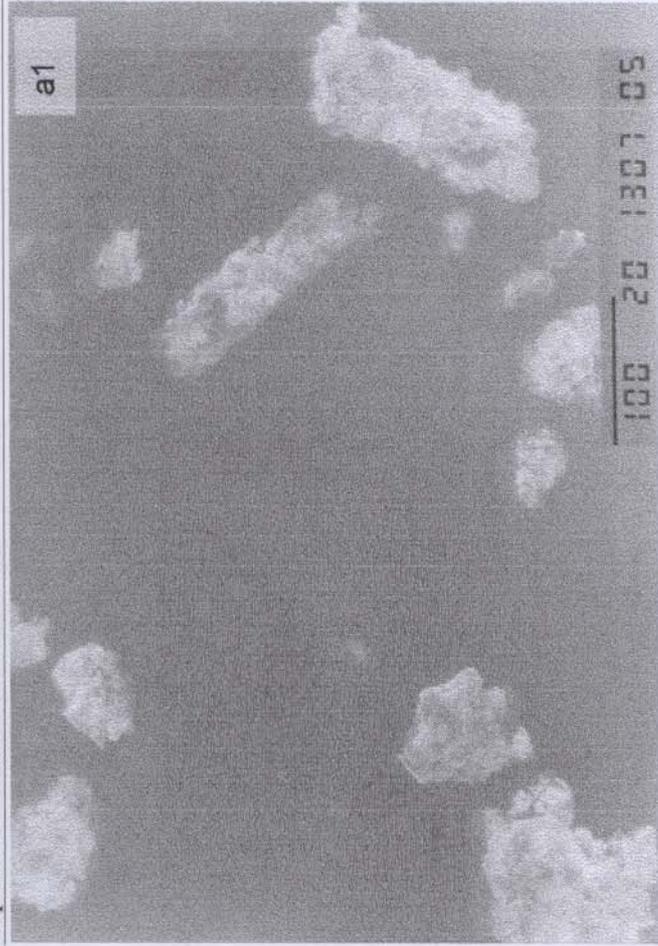


FIGURA IV.1.7 – Fotografias de microscopia eletrônica de varredura: a1) β -CD-PRX (200x), a2) β -CD-PRX (1500x), b1) MF (200x) e b2) MF (1500x).
Tese de Doutorado

IV.2 ESTUDOS SOBRE CONFORMAÇÕES MOLECULARES DO PIROXICAM ATRAVÉS DE CÁLCULOS SEMI-EMPÍRICOS

Os resultados obtidos pelos cálculos semi-empíricos (MOPAC/AM1) são mostrados nas FIG. IV.2.1 b-e. Observam-se as estruturas moleculares, as superfícies de energia total e o com-

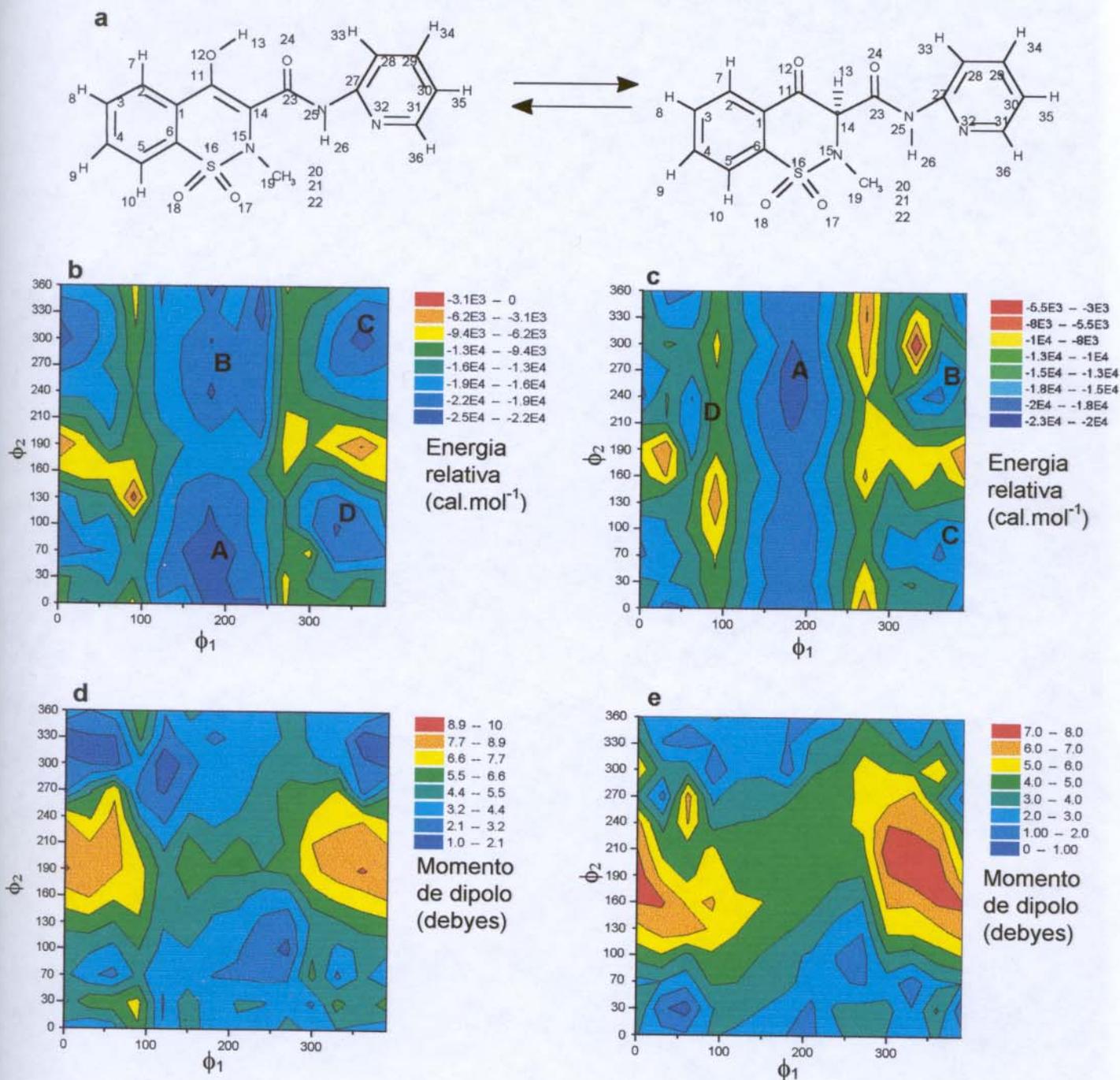


FIGURA IV.2.1. a) PRX em equilíbrio ceto-enólico; b) e c) energia total do sistema em função de ϕ_1 e ϕ_2 (em graus) para as formas enólica e cetônica do PRX, respectivamente; d) e e) momento de dipolo total da molécula em função de ϕ_1 e ϕ_2 (em graus) para as formas enólica e cetônica do PRX, respectivamente.

portamento do momento de dipolo da molécula em função da variação dos ângulos diedros para as duas formas, a enólica e a cetônica. Os ângulos foram definidos na seção III.2 mas convém mencionar novamente as designações. Os átomos C(14), C(23), N(25) e C(27) definem o ângulo ϕ_1 e os átomos C(11), C(14), C(23) e O(24) o ângulo ϕ_2 para as duas formas.

Antes de iniciar as discussões propriamente ditas, é importante mencionar que em todas as superfícies analisadas (de energia total, momento de dipolo e as de distribuição de carga) a escala utilizada foi diferente. Os valores para ϕ_2 não seguem, em toda sua extensão, o mesmo passo: para os valores entre 0° e 100° um dos passos foi de 40° (entre 30° e 70°) enquanto que para os demais foi de 30° . Isso ocorreu em função dos primeiros cálculos realizados em que o objetivo inicial estava centrado simplesmente na busca na geometria mais estável e esta possui valores para ϕ_2 no intervalo onde ocorreu a modificação do passo. Os resultados de momento de dipolo (FIG. IV.2.1 d e e) correspondem ao momento de dipolo total da molécula, ou seja, à somatória dos momentos de dipolo em cada eixo: X, Y e Z. Esses eixos são definidos em função da dimensão molecular. O eixo X corresponde à maior dimensão e no caso do PRX (FIG. IV.2.1 a) está em uma linha imaginária passando pelos anéis aromáticos (o benzênico e o piridínico); o eixo Y corresponde à segunda maior dimensão molecular perpendicular a X; o Z corresponde à terceira maior dimensão molecular perpendicular a X e Y.

Analisando-se as superfícies de energia total para os confôrmeros do PRX (FIG. IV.2.1 b e c) pode-se destacar:

- i) para a forma enólica (FIG. IV.2.1 b): a) a presença de quatro poços de potencial, correspondendo a quatro estruturas conformacionais, com as seguintes energias: A) $-4194,08\text{eV}$, B) $-4193,97\text{eV}$, C) $-4194,01\text{eV}$ e D) $-4193,96\text{eV}$, cada um deles separados entre si por barreiras de potencial superiores a $5,0\text{kcal.mol}^{-1}$; b) duas protuberâncias pronunciadas: uma em $\cong 90^\circ$ para ϕ_1 e $\cong 130^\circ$ para ϕ_2 e outra em $\cong 360^\circ$ para o ϕ_1 e $\cong 190^\circ$ para ϕ_2 , relacionadas às estruturas menos estáveis do PRX-enol; c) as estruturas mais estáveis equivalem à rotação da ligação C(14)-C(23) compreendida entre 0° a 360° para ϕ_2 e entre $\cong 125^\circ$ e $\cong 250^\circ$ para ϕ_1 (rotação da ligação C(23)-N(25)).
- ii) para a forma cetônica (FIG. IV.2.1 c): a) a presença de quatro poços de potencial, correspondendo a quatro estruturas conformacionais, com as seguintes energias: A) $-4193,99\text{eV}$, B) $-4193,82\text{eV}$, C) $-4193,80\text{eV}$ e D) $-4193,78\text{eV}$; b) somente o poço de potencial relacionado ao confôrmero A é separado dos demais por barreiras de potencial superiores a $5,0\text{kcal.mol}^{-1}$; c) várias protuberâncias, correspondentes às estruturas menos estáveis da forma cetônica do PRX, próximas a 30° , 90° , 270° e 330° para ϕ_1 e 0° , 130° , 190° , 300° e 330° para ϕ_2 ; d) as estruturas mais estáveis correspondem à rotação da ligação C(14)-C(23) entre 0° a 360° para ϕ_2 e para entre $\cong 125^\circ$ a $\cong 250^\circ$ para o ϕ_1 (rotação da ligação C(23)-N(25))

Como se observaram protuberâncias acentuadas em algumas regiões das superfícies de energia total (FIG. IV.2.1 b e c), outros cálculos mais refinados foram realizados para encontrar

as estruturas conformacionais menos estáveis para o PRX. Isso significa que os passos dos ângulos diedros, correspondentes às referidas regiões na superfície de energia, foram diminuídos para 2°, de modo que mudanças mais sutis na estrutura dos confômeros pudessem ser verificadas. Entretanto, as diferenças de energia entre os dois cálculos (com passo de 10° e 2°) foram tão pequenas que podem ser consideradas irrelevantes.

Analisando o comportamento do momento de dipolo total da molécula em função da variação dos ângulos diedros (FIG. IV.2.1 d e e), destaca-se: a) o momento de dipolo das duas formas apresentou aproximadamente o mesmo comportamento: as regiões de maior momento dipolar estão entre $\cong 160^\circ$ a $\cong 240^\circ$ para ϕ_2 e entre $\cong 0^\circ$ a $\cong 90^\circ$ e $\cong 300^\circ$ a $\cong 360^\circ$ para ϕ_1 ; b) a forma cetônica apresenta maior número de conformações com maior momento dipolar e para a forma enólica maior número de conformações com menor momento de dipolo (quando comparadas entre si); c) os confômeros mais estáveis da forma enólica (região A da FIG. IV.2.1 b) possuem os menores valores para o momento de dipolo (entre 4,4 e 3,2) enquanto que os confômeros mais estáveis da forma cetônica (região A da FIG. IV.2.1 c) possuem valores um pouco maiores (entre 4,0 e 5,0).

A comparação entre os conjuntos de resultados obtidos para as formas enólica e cetônica deve ser evitada pois, na verdade, a estrutura da molécula foi alterada quando o hidrogênio H(13) ligado ao átomo O(12) foi transferido para o átomo C(14).

As distribuições de cargas de alguns dos átomos próximos às ligações rotacionadas em função da variação dos ângulos diedros (das formas enólica e cetônica) foram analisadas preferencialmente por duas razões: a) por terem apresentado determinados padrões que segundo as FIG. IV.2.2 e FIG. IV.2.3 correspondem às superfícies de energia total e b) por apresentarem as variações mais significativas. Os valores a seguir se referem aos da carga líquida de Mulliken como um dos resultados obtidos dos cálculos via MOPAC/AM1. Essa carga, segundo manual do programa, é a soma das cargas nucleares (1,0 para o hidrogênio, 6,0 para o carbono, 8,0 para o oxigênio, etc.) e dos elétrons de valência, ou à densidade eletrônica do átomo.

Observando-se a FIG. IV.2.2 (distribuições de carga para a forma enólica) destaca-se que para o átomo H(26) (valores de ϕ_1 entre $\cong 120^\circ$ e $\cong 240^\circ$ e todos os valores para o ϕ_2) a carga oscilou entre 0,27 e 0,24, ($\Delta = 0,03$, 38% da variação total). Esses valores (dos ângulos), na superfície de energia total (FIG. IV.2.1 b) correspondem a um conjunto de estruturas conformacionais do PRX-enol, com variação de $\cong 9,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (36% do total). Nesse caso específico o átomo H(26) possui maior carga positiva na região citada. Contudo, a distribuição para alguns dos átomos (C(23), O(24), e N(25)) apresentou aproximadamente o mesmo comportamento, ou seja, certa semelhança com a superfície de energia total. Entretanto, há modificação nos sinais das cargas (ora positivos ora negativos) em decorrência dos efeitos mútuos de indução que esses átomos, pelo fato de estarem ligados exercem. A distribuição de carga dos átomos O(24) e C(23) (FIG. IV.2.2), na região para ϕ_1 e ϕ_2 (onde o átomo C(23) possui menor densidade de carga positiva) corresponde aproximadamente à mesma região onde o átomo O(24) possui menor densidade

dade de carga negativa, indicando claramente efeitos de indução, pois quanto menor for essa densidade num átomo, menor será o efeito indutivo no átomo vizinho.

Deve-se ressaltar que a maior variação de carga ocorreu no átomo O(24) ($\Delta_{O(24)} = 0,210$) e para os outros átomos analisados obteve-se: $\Delta_{C(23)} = 0,068$; $\Delta_{H(13)} = 0,080$; $\Delta_{N(32)} = 0,080$; $\Delta_{N(25)} = 0,090$; e $\Delta_{H(26)} = 0,080$. Embora a distância entre os átomos O(24) e H(13) (2,04Å) não caracterize uma ponte de hidrogênio típica (1,7Å na água segundo Allen (1975)) para a estrutura mais estável, é evidente que há interação entre eles a qual exerce influência sobre a estrutura conformacional da molécula tornando-a mais rígida que as demais. Neste contexto quando se observa a distribuição do átomo H(13) (FIG. IV.2.2) verifica-se uma região relativamente grande onde a carga oscilou entre 0,24 e 0,22 e que corresponde às estruturas conformacionais mais estáveis na superfície de energia total (regiões A e B FIG. IV.2.1 b). Entretanto, como o comportamento para o átomo O(24) foi significativamente diferente é evidente a existência de atração entre esses átomos. É interessante destacar que o átomo O(24) tem sua densidade de carga negativa aumentada (FIG. IV.2.2) próximo à região onde os confôrmeros (PRX-enol) são mais estáveis (FIG. IV.2.1 b), sendo mais acentuada para o confôrmero A. Este fato pode ser interpretado por um efeito de delocalização eletrônica pois o oxigênio tem sua densidade de carga negativa aumentada – por ser mais eletronegativo – em detrimento da distribuição eletrônica na molécula. O oxigênio, tornando-se mais estável pelo aumento da densidade de elétrons, também estabiliza o sistema.

Em relação às causas que exercem influência sobre a estrutura conformacional do PRX-enol, direcionando a formação do confôrmero mais estável, pode-se destacar que além dos impedimentos estéricos entre os grupos metila e piridínico é evidente a interação entre os átomos H(13)-O(24), caracterizando uma ligação hidrogênio fraca (FIG. IV.2.2) como mencionado por Aviyente *et al* (1996).

Comparando as distribuições de carga de alguns átomos, próximos às ligações rotacionadas, para o PRX-ceto (FIG. IV.2.3) com a correspondente superfície de energia total (FIG. IV.2.1 c) pode-se destacar: a) os padrões de distribuição são aproximadamente os mesmos daqueles observados para a forma enólica. Um exemplo é a distribuição de carga do átomo O(23) onde os valores entre -0,35 e -0,33, correspondem às estruturas conformacionais mais estáveis desta forma e encontram-se na região de $\cong 120^\circ$ a $\cong 240^\circ$ para o ϕ_1 e para todos os valores do ϕ_2 (FIG. IV.2.3); b) as variações (em ordem decrescente) das cargas dos átomos foram: $\Delta_{O(24)} = 0,157$; $\Delta_{N(32)} = 0,0927$; $\Delta_{H(26)} = 0,0725$; $\Delta_{C(23)} = 0,0685$; $\Delta_{N(25)} = 0,068$; e $\Delta_{O(12)} = 0,0646$, sendo a do átomo O(24) a maior delas, também com a maior variação no PRX-enol; d) o efeito de indução para PRX-ceto (como observado para o PRX-enol) não ocorre, pois a distribuição de carga para o átomo C(23), embora apresente certo padrão, não se assemelha à do átomo O(24); entretanto, o referido efeito é observado entre os átomos N(25) e H(26) (FIG. IV.2.3) em que nas regiões correspondentes a ϕ_1 e ϕ_2 o átomo N(25) apresenta maior densidade de carga

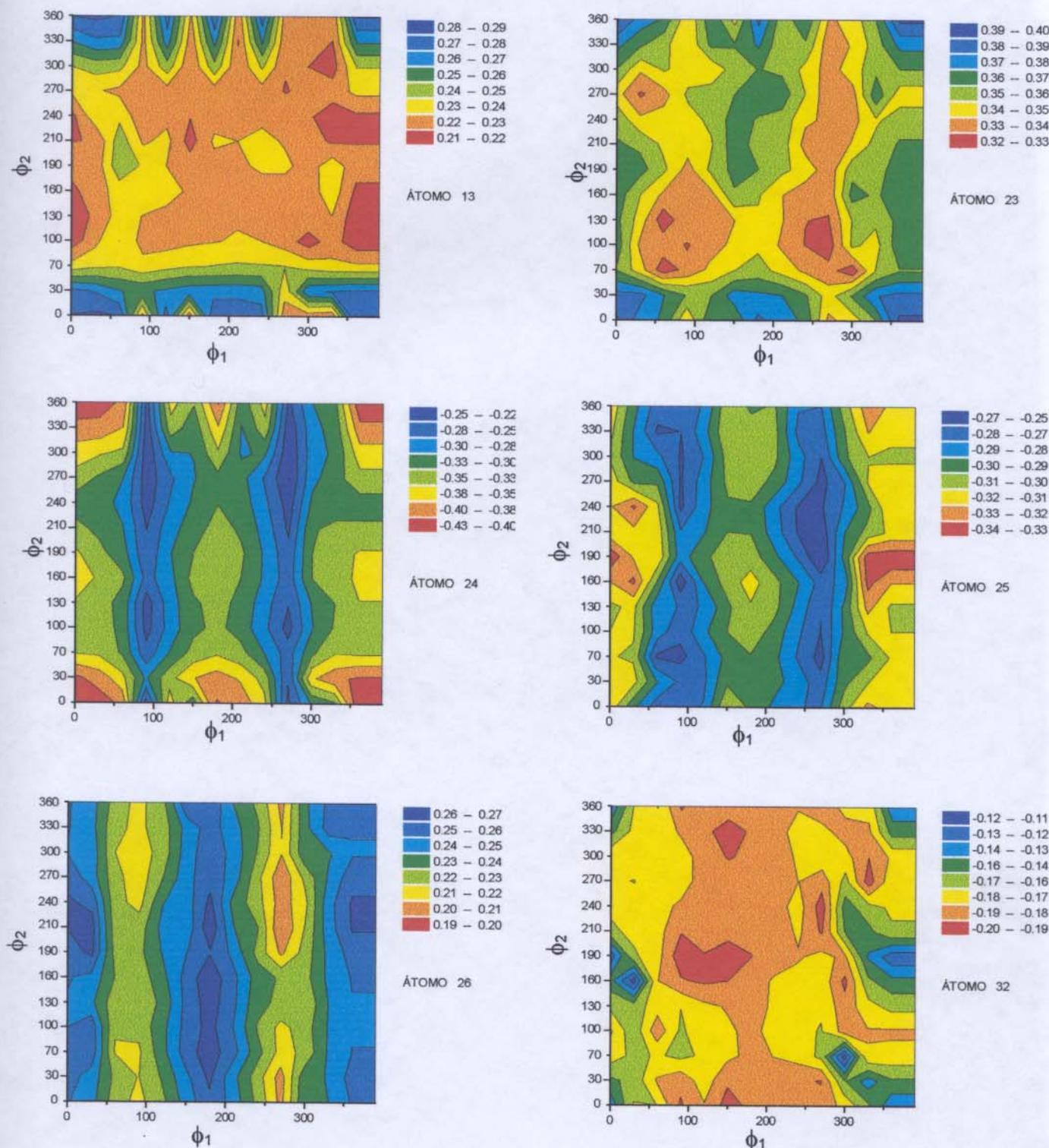


FIGURA IV.2.2 - Carga líquida (Mulliken) dos átomos H(13), C(23), O(24), N(25), H(26) e N(32) em função da variação de ϕ_1 e ϕ_2 (em graus) para a forma enólica.

negativa. O átomo H(26) tem comportamento oposto, pois exibe maior densidade de carga positiva; e) há indícios de efeito de delocalização eletrônica (como citado para o átomo O(24) PRX-enol) embora nenhuma das estruturas conformacionais mais estáveis da forma cetônica apresente a planaridade necessária (FIG. IV.2.5), pois na superfície de distribuição de carga do O(24) em que este apresenta uma das maiores densidades negativa (entre $\cong 120^\circ$ a $\cong 230^\circ$ para ϕ_1 FIG.

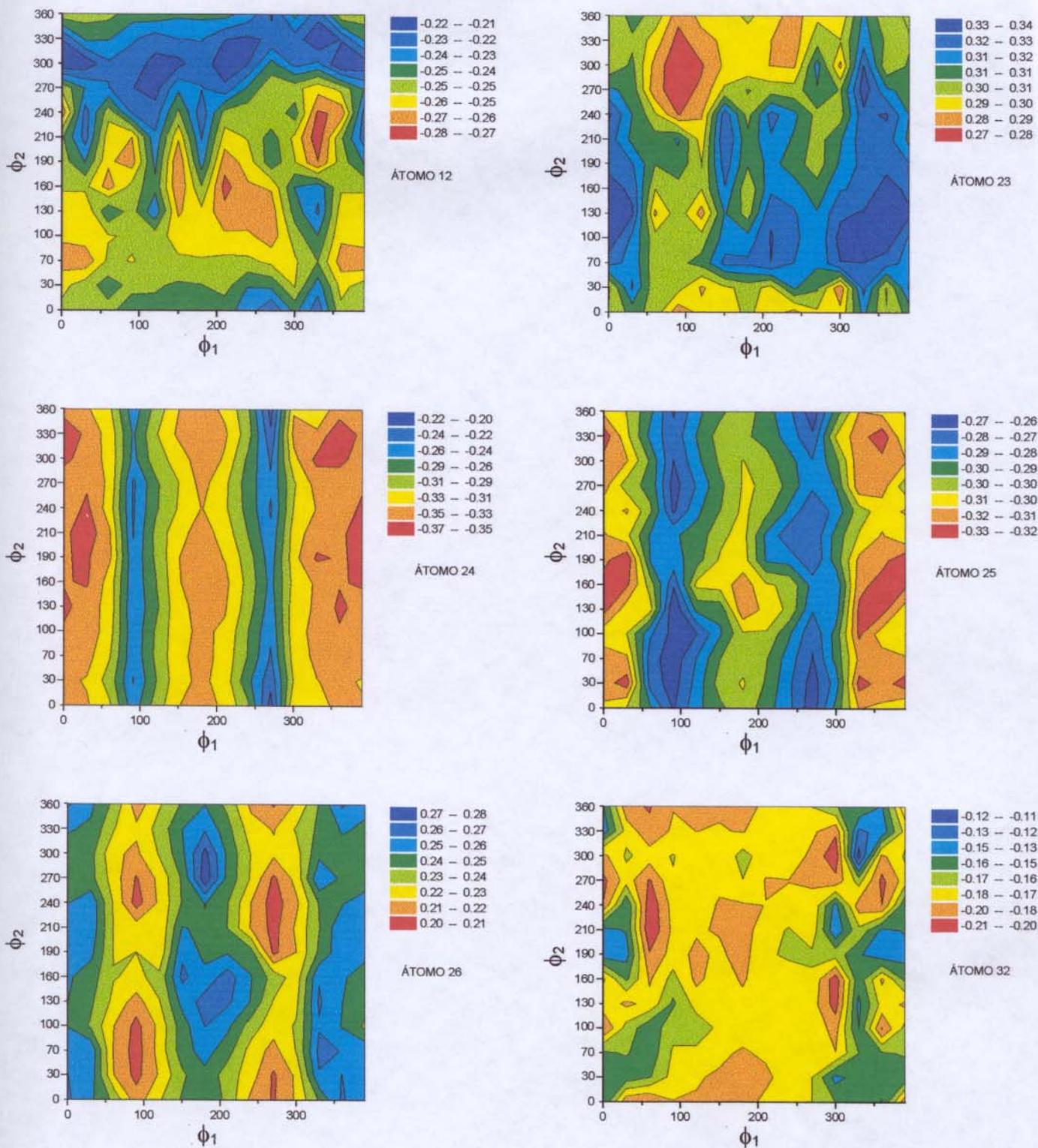


FIGURA IV.2.3 - Carga líquida (Mulliken) dos átomos O(12), C(23), O(24), N(25), H(26) e N(32) em função da variação de ϕ_1 e ϕ_2 (em graus) para a forma cetônica.

IV.2.3) corresponde à região das estruturas conformacionais mais estáveis na superfície de energia total (FIG. IV.2.1 c); f) o átomo O(12) apresenta um comportamento distinto do observado até então, isto é, enquanto todos os átomos analisados apresentaram certa correlação quanto ao padrão de distribuição de cargas com maior variação na direção da rotação da ligação C(23)-N(25) o átomo O(12) mostra maior variação na direção da rotação da ligação C(14)-C(23) tendo

menor densidade de carga na região entre $\approx 270^\circ$ a 350° para ϕ_2 e para aproximadamente todos os valores para ϕ_1 na correspondente superfície (FIG. IV.2.3). Esse comportamento indica que o referido oxigênio sofre influência do átomo O(24) por repulsão de carga, pois é justamente nesse intervalo de variação de ϕ_2 que eles estão mais próximos. Como o anel ao qual o O(12) está ligado é pouco flexível (em função das rotações das ligações), esse átomo pode transferir carga para o anel benzênico (ou a outra parte da molécula) quando alguma modificação relevante ocorrer na estrutura conformacional.

As estruturas conformacionais correspondentes aos mínimos da superfície de energia total das formas enólica (A, B, C e D - FIG. IV.2.1 b) e cetônica (A, B, C e D - FIG. IV.2.1 c) podem ser visualizadas na FIG. IV.2.4 e FIG. IV.2.5, respectivamente.

Estas figuras mostram as principais diferenças existentes entre os confôrmeros e entre as formas enólica e cetônica. Podem-se, assim, obter informações a respeito tanto da posição relativa de determinados grupos cromóforos na molécula como também da planaridade, o que auxilia na compreensão do comportamento espectroscópico da droga.

Alguns aspectos devem ser destacados relativamente às alterações energéticas envolvidas nas modificações conformacionais provocadas por interações específicas. Dentre essas inclui-se: a) ligações químicas simples com caráter de dupla devido à ressonância; b) pontes de hidrogênio intramoleculares e c) repulsão estérica, comentadas a seguir.

- i) o primeiro caso é particularmente importante pois quando ligações simples ocorrem entre ligações duplas alternadas, como nos butadienos e moléculas relacionadas, elas podem adquirir algum caráter de ligação dupla por causa das contribuições das estruturas de ressonância da molécula. Isso é suficiente para levar ao isomerismo cis-trans ou *E-Z* (correspondente à ligação simples) moléculas cujas barreiras de potencial passam a ser descritas por dois poços de potencial ao invés de três. Esses efeitos podem ser mais ou menos pronunciados quando essa ligação ocorre entre grupos doadores ou aceptores de elétrons (por exemplo OCH_3 , NH_2 , $\text{C}=\text{O}$, etc.). Um caso típico desse tipo de interação é o que ocorre com os ésteres carboxílicos onde a ligação central carbono-oxigênio possui propriedades um pouco diferentes da ligação oxigênio-alquil. Isso é atribuído às interações entre o par de elétrons isolado do oxigênio e o sistema π de elétrons da carbonila.
- ii) interações do tipo ligações de hidrogênio intramoleculares têm sido invocadas para explicar o comportamento conformacional e energético de uma série de moléculas: ácidos simples e álcoois e sistemas mais complexos como proteínas e ácidos nucléicos. Esse tipo de interação ocorre, usualmente, quando o hidrogênio está ligado a átomos eletronegativos como nitrogênio, oxigênio, a sistemas com múltiplas ligações duplas conjugadas e a moléculas onde há centros com cargas negativas como átomos com pares de elétrons isolados. A natureza dessas ligações de hidrogênio é objeto de muitas discussões, mas é reconhecido consistir de quatro componentes diferentes: eletronegatividade, delocali-

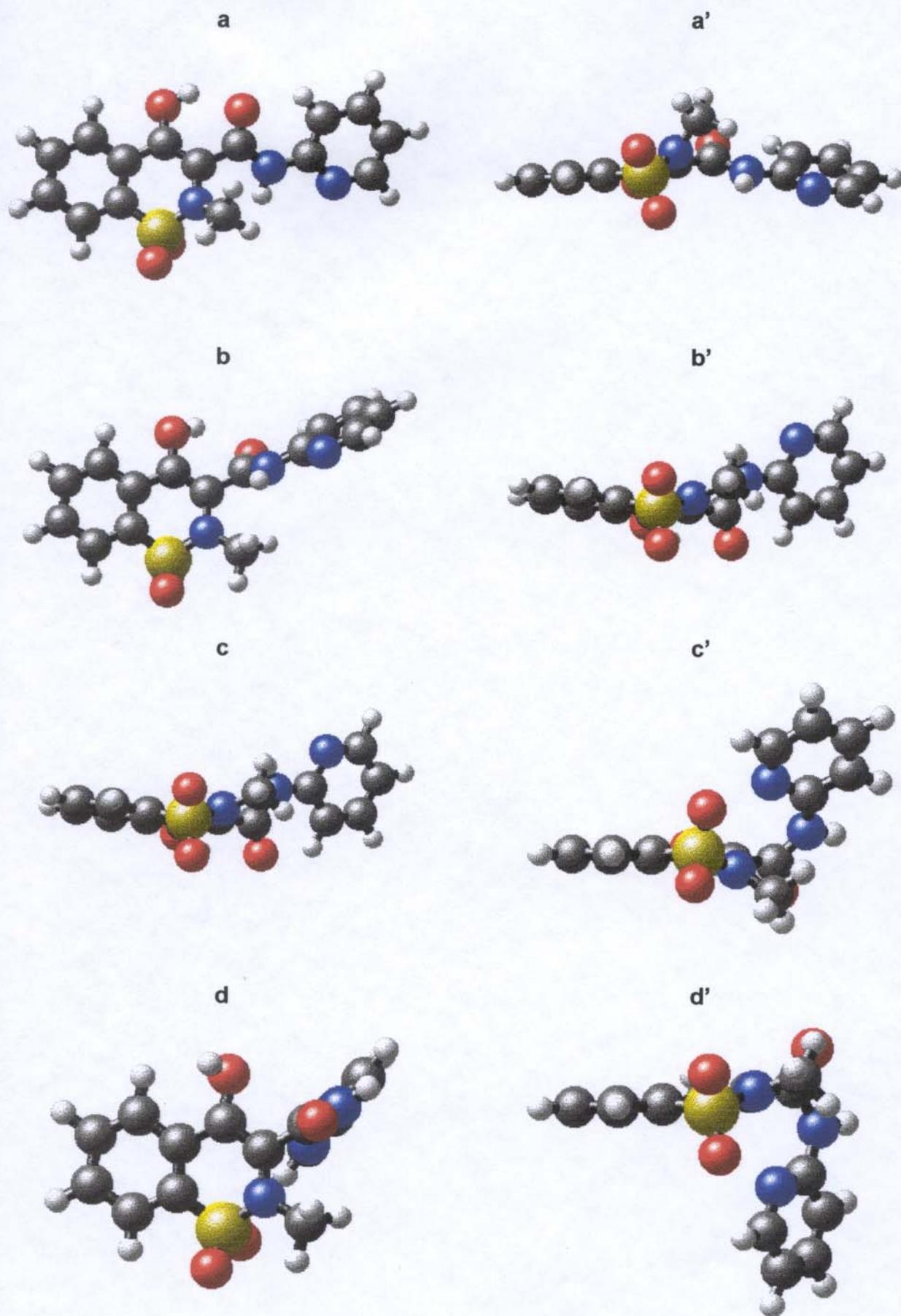


FIGURA IV.2.4 – Duas formas de visualização das estruturas dos conformêros enólicos correspondentes aos mínimos da superfície de energia total (FIG. IV.2.1 b).

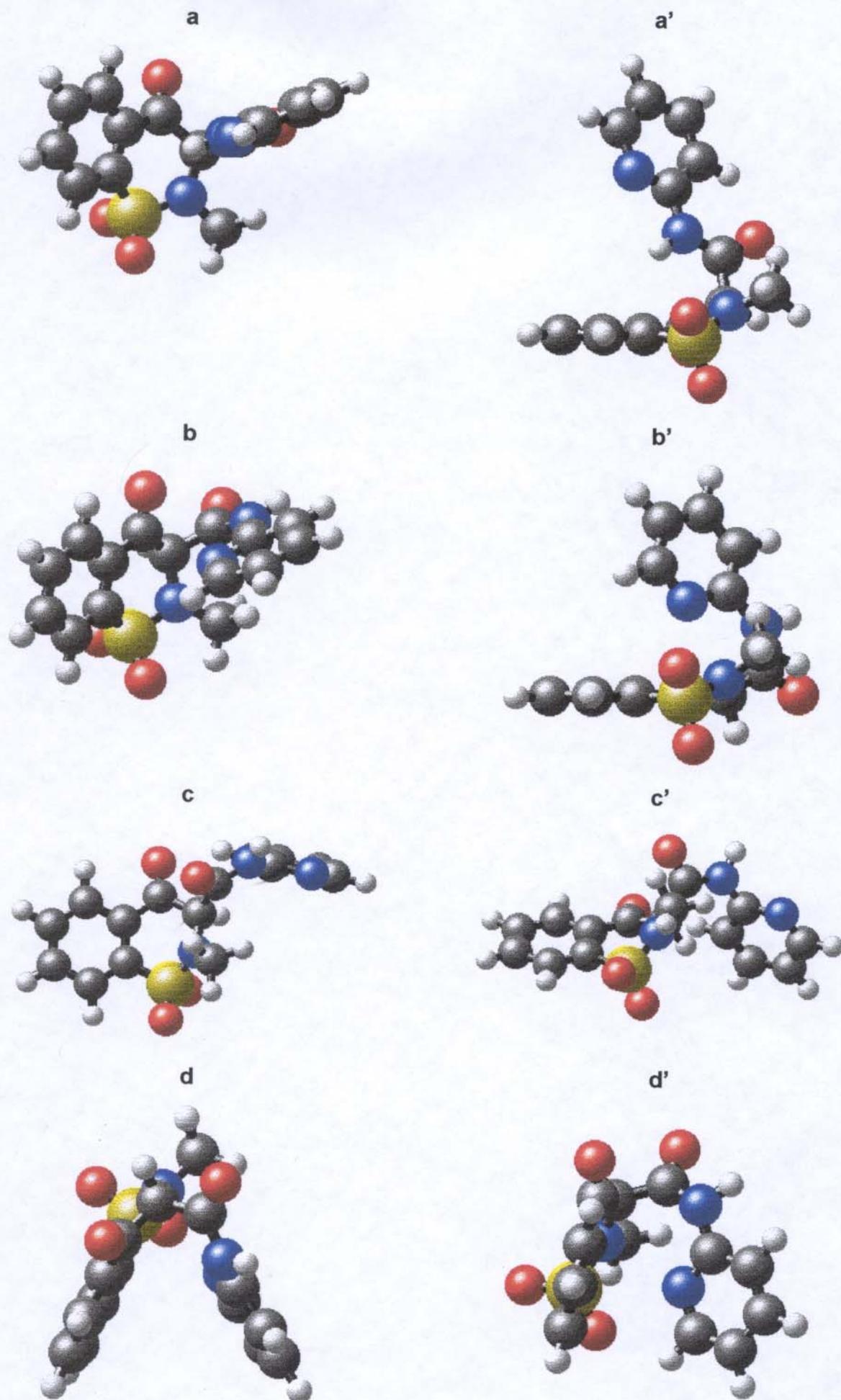


FIGURA IV.2.5 – Duas formas de visualização das estruturas dos confôrmeros cetônicos correspondentes aos mínimos da superfície de energia total (FIG. IV.2.1 c).

zação eletrônica, interação de dispersão e repulsão de cargas, que contribuem aproximadamente com a mesma magnitude

- iii) repulsões estéricas ocorrem quando dois átomos são separados por uma distância menor que a soma dos seus raios de van der Waals, e podem desempenhar papel importante na determinação tanto no isomerismo como na barreira rotacional. Em determinadas circunstâncias quando, por exemplo, dois grupos de átomos estão unidos por ligações simples (que podem ser rotacionadas) essas interações exercem efeitos dramáticos. Um exemplo disso pode ser encontrado quando se compara o efeito de impedimento estérico verificado para a rotação do grupo CH_3 no metil formiato e no metil vinil éter. A barreira de rotação no primeiro é de $1,2\text{kcal.mol}^{-1}$; enquanto que no segundo é de $3,8\text{kcal.mol}^{-1}$, ilustrando claramente a importância desses efeitos (Lister *et al* (1978)).

A TAB. IV.2.1 mostra alguns parâmetros moleculares (relacionados às distâncias de alguns átomos nas estruturas conformacionais) que podem dar indícios de interações do tipo pontes de hidrogênio intramoleculares e da repulsão dos grupos carbonílicos.

TABELA IV.2.1

Alguns parâmetros dos confôrmeros do PRX (FIG. IV.2.4 e 5) obtidos via cálculos MOPAC/AM1

Distância (Å) entre os átomos dos confôrmeros enólicos				
Confôrmero	H(26)-N(15)	H(13)-O(24)	N(32)-H(26)	O(24)-H(26)
Enol-a	2,63	2,04	2,47	-
Enol-b	2,93	2,21	2,47	-
Enol-c	4,11	2,27	3,26	2,41
Enol-d	4,25	3,64	3,26	2,45

Distância (Å) entre os átomos dos confôrmeros cetônicos				
Confôrmero	H(26)-N(15)	O(12)-O(24)	N(32)-H(26)	O(24)-H(26)
Ceto-a	2,86	3,79	2,47	-
Ceto-b	4,15	3,51	3,27	-
Ceto-c	4,30	3,42	2,65	2,43
Ceto-d	4,30	3,60	3,22	2,38

Verifica-se que os confôrmeros enólicos apresentam maior número de interações do tipo pontes de hidrogênio quando comparados com os cetônicos, mesmo porque as estruturas são

diferentes pois o átomo H(13) no PRX-enol foi transferido para o átomo C(14), ficando esse tipo de interação impedida nos confôrmeros do PRX-ceto. Entretanto, para o Ceto-c e o Ceto-d observa-se que as distâncias entre os átomos O(24)-H(26) são menores que as no Enol-d e Enol-c, indicando que pode haver certa rigidez molecular nas estruturas conformacionais cetônicas além de um ganho de estabilidade. Outro fato que contribui para a desestabilização das estruturas conformacionais cetônicas, refere-se à repulsão entre os grupos carbonílicos. Para o Ceto-a (o mais estável) esta distância é a maior ocorrendo, portanto, um ganho de estabilidade.

Analisando as estruturas de todos os confôrmeros (FIG. IV.2.4 e FIG. IV.2.5) mencionados, pode-se inferir que:

- i) a formação dos confôrmeros mais estáveis é direcionada por: a) impedimentos estéricos entre os grupos metila com o anel piridínico e entre H(13) e anel piridínico (PRX-enol); b) repulsão dos grupos carbonílicos para o PRX-ceto; c) interação entre os átomos H(13)-O(24), O(24)-H(26) e H(26)-N(15) para o PRX-enol e entre O(24)-H(26) e H(26)-N(15) para o PRX-ceto; d) delocalização eletrônica na molécula como um todo ou em grupos cromóforos separadamente;
- ii) as estruturas conformacionais mais estáveis para as duas formas (A para o PRX-enol e A para o PRX-ceto) diferem quanto a rotação da ligação C(14)-C(23) e outros parâmetros (a posição relativa dos grupos cetônicos e piridínico, a posição do grupo metila, não planaridade do anel adjacente ao benzênico, etc.);
- iii) o confôrmero enólico B (FIG. IV.2.4 b e b') é mais planar relativamente ao correspondente confôrmero cetônico (FIG. IV.2.5 a e a'). Isso se deve às interações mencionadas, destacando-se que: a) na forma enólica é possível a formação de uma ponte de hidrogênio intramolecular entre os átomos H(13)-O(24) (2,02Å) o que não ocorre na cetônica; b) nesta há repulsão entre os oxigênios O(12) e O(24) de modo que os confôrmeros mais estáveis tendem a manter esses átomos afastados; c) para o PRX-enol, a distância entre os átomos H(26)-N(15) é de 2,93Å enquanto que no PRX-ceto a distância é de 2,86 Å o que indica certa interação entre estes átomos, repercutindo num ganho energético para os dois confôrmeros. Entretanto, como parece haver repulsão entre os oxigênios para o PRX-ceto (item iii b)) estes dados indicam que os átomos que constituem o sistema encontrou outra estrutura conformacional que possibilitasse a referida interação com conseqüente ganho de estabilidade em detrimento da não planaridade;
- iv) todos os confôrmeros do PRX-enol tendem a manter próximos os átomos que podem fazer pontes de hidrogênio intramolecular (ou que podem interagir, como por exemplo, os átomos H(26)-N(32) ou N(15)-H(26)), promovendo maior rigidez molecular;
- v) todos os confôrmeros do PRX-ceto tendem a manter os oxigênios O(12) e O(24) e os grupos piridínico e metila afastados uns dos outros (dificultando a planaridade importante na estabilização por ressonância);

- vi) entre todos os confôrmeros, PRX-enol e PRX-ceto, observa-se uma tendência em manter pelo menos uma parte da molécula plana, seja o anel benzênico com o adjacente ou o piridínico e a ligação peptídica. Contudo, das estruturas conformacionais, a forma PRX-enol-a (FIG. IV.2.4-a) é a mais plana, oferecendo ao mesmo tempo, possibilidade de formação de ponte de hidrogênio intramolecular.

Os fatos mencionados permitem comparar os dados teóricos com os experimentais. Encontram-se na literatura vários trabalhos relacionados ao fenômeno de transferência intramolecular de próton no estado excitado ($TI_{ar}PEE$), mencionado no CAP.I. Para o PRX esse fenômeno foi proposto por Yoon *et al* (1988) e envolve os átomos H(13), O(12) e O(24) (FIG. IV.2.1 a). Segundo os autores a transferência se dá preferencialmente em solventes apolares, nos quais há a possibilidade de formação de ponte de hidrogênio intramolecular no estado fundamental. Quando a molécula se encontra em solventes polares a ponte de hidrogênio se dá preferencialmente entre o soluto (PRX) e o solvente (água por exemplo). Isso dificulta a transferência quando a molécula é excitada, atrasando esse processo. Por conseguinte, a mesma dispõe de tempo suficiente para sofrer relaxação vibracional, alterando ambos a intensidade da fluorescência e o tempo de vida.

As interações soluto-solvente via pontes de hidrogênio são dinâmicas (Flier *et al* (1979), Lesyng e Saenger (1981) e Saenger e Brown (1982)), pois tanto as moléculas do soluto como as do solvente estão em constante movimento. Através de algumas técnicas, como RMN, que poderiam ser utilizadas para investigar essas interações, a resposta obtida é uma média, ou seja, os movimentos são muito rápidos para que os aparelhos utilizados (sem resolução temporal) possam distinguir todas as interações que nesses casos são interpretadas como a variação das distâncias da ligação de hidrogênio. Sob esse ponto de vista é interessante poder comparar os resultados teóricos com os experimentais pois é possível inferir como ocorrem as interações soluto-solvente, com conseqüente aprofundamento dos conhecimentos.

Vários autores investigaram a influência do meio sobre equilíbrios ceto-enólicos em vários compostos. Powling e Bernstein (1951) estudaram, através de espectroscopia vibracional, o efeito de alguns solventes sobre o equilíbrio ceto-enólico da acetilacetona. Burdett e Rogers (1964) investigaram (por RMN 1H) o equilíbrio tautomérico das formas cetônica e enólica de vários compostos β -dicarbonílicos, determinando as respectivas constantes verificando a formação de pontes de hidrogênio intramoleculares. Allen e Dwek (1964) determinaram algumas funções termodinâmicas para a enolização de uma série de β -dicetonas pela medida das constantes de equilíbrio em função da temperatura, mostrando que quanto maior a polaridade do meio, maior será a proporção do constituinte mais polar (forma cetônica). Spencer *et al* (1982) chegaram à mesma conclusão num estudo da influência do solvente nas constantes de equilíbrio ceto-enólico do 2,4-pentanodiona utilizando calorimetria e RMN. Um dado interessante dessa pesquisa é que o conteúdo da forma enólica é 98% em tetracloreto de carbono mas cai para 16% em água. Esses últimos autores investigaram também a entropia e a entalpia do sistema, relacio-

nando-as com a quebra e a formação de pontes de hidrogênio intramoleculares. Mills e Beak (1985) e Almdal *et al* (1986) estudaram sistemas semelhantes utilizando, respectivamente, RMN ^1H , absorção UV/V e voltametria cíclica investigando os mesmos efeitos, ou seja, a influência do solvente no equilíbrio tautomérico dos compostos. Um trabalho interessante foi feito por Alberghina *et al* (1985), que estudaram a influência da polaridade do solvente na barreira rotacional do grupo $(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ para várias substâncias constatando que quanto maior essa polaridade, maior a proporção do confôrmero mais polar e maior a barreira rotacional relacionado ao grupo mencionado.

O interesse nesses estudos está relacionado às interações soluto-solvente que dependem de características intrínsecas de cada componente na solução: a) momento de dipolo; b) acidez; c) basicidade; d) possibilidade de formação de pontes de hidrogênio (intra e intermolecular); e) constante dielétrica etc.. As interações soluto-solvente alteram de modo significativo o equilíbrio ceto-enólico (conforme mencionado) e, no caso do PRX, pode influenciar seu comportamento espectroscópico, isto é, o PRX pode preferencialmente se apresentar na forma de um dos confôrmeros estudados (enólicos ou cetônicos) em função dessas interações. Como cada um desses confôrmeros pode *a priori* apresentar espectros de emissão e excitação mais ou menos diferentes em função das geometrias e de outros fatores, talvez seja possível diferenciá-los e/ou identificá-los usando técnicas experimentais sensíveis.

Em função das informações disponíveis na literatura e dos resultados obtidos via cálculos semi-empíricos foram coletados alguns dados experimentais, via fluorimetria, que pudessem ser correlacionados.

As FIG. IV.2.6 e IV.2.7 mostram as superfícies de emissão total do PRX, conforme estabelecido na seção III.2, com vista lateral e de topo, respectivamente. A TAB. IV.2.2 apresenta a relação entre as concentrações de PRX e nitrometano presentes nas soluções analisadas.

TABELA IV.2.2
Relação entre as concentrações de PRX e nitrometano no estudo fotofísico do PRX em meio com diferentes polaridades.

SOLUÇÃO	01	02	03	04	05	06	07	08
$[\text{CH}_3\text{NO}_2]/[\text{PRX}]$	0	3710	7420	11100	22200	44500	89000	178000

Observando-se as FIG. IV.2.6 e IV.2.7 pode-se constatar que: a) ocorre diminuição da emissão com o aumento da proporção de nitrometano; b) há deslocamento significativo do máximo de excitação para o vermelho (de $\approx 330\text{nm}$ (Solução 1) para $\approx 370\text{nm}$ (Solução 8)); c) não

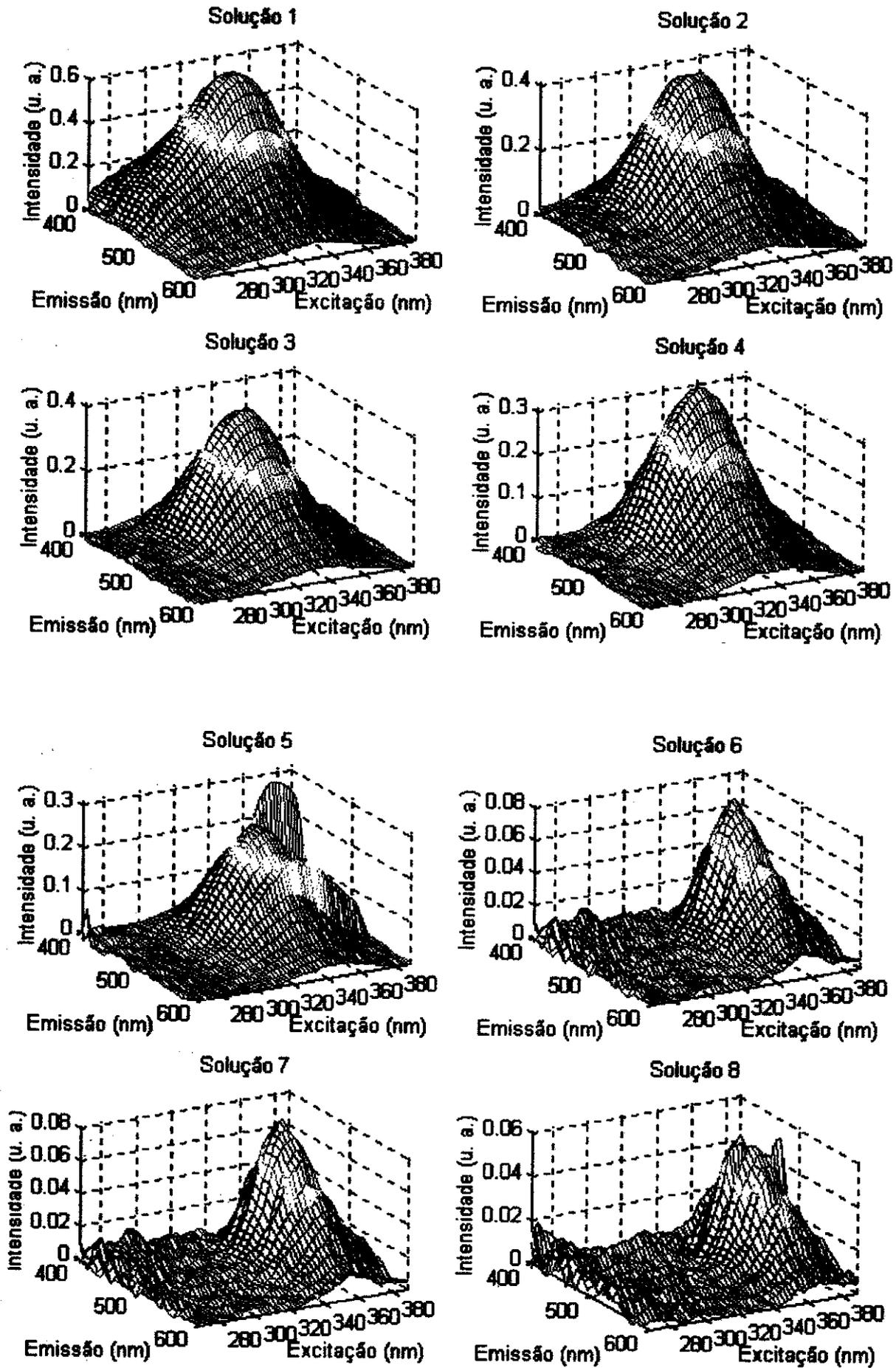


FIGURA IV.2.6 – Vista lateral das superfícies de emissão total para as soluções de PRX (TAB. III.2.2).

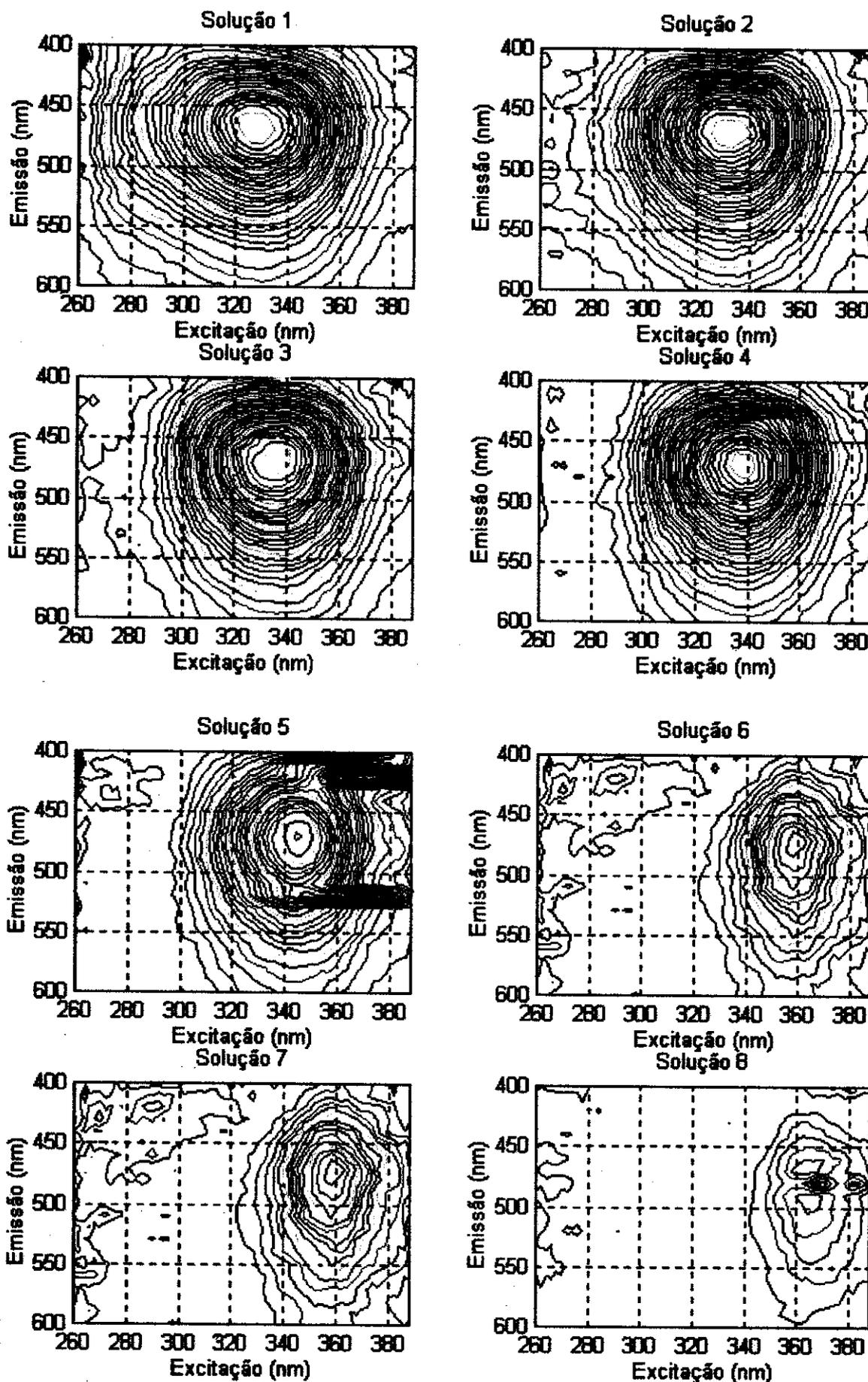


FIGURA IV.2.7 – Vista de topo das superfícies de emissão total para as soluções de PRX (TAB. III.2.2).

houve deslocamento da banda de emissão em $\approx 470\text{nm}$; d) comparando as superfícies de emissão da Solução 1 e 2, observa-se que além da diminuição na intensidade ocorreu pequena modificação no formato da superfície, sendo a região compreendida entre $\approx 260\text{nm}$ e $\approx 300\text{nm}$ para a excitação e toda a correspondente para a emissão, é menos pronunciada para a Solução 2 (FIG. IV.2.6). Contudo, não se verifica, para essas duas soluções, nenhum deslocamento nos máximos de emissão e de excitação (FIG. IV.2.7); e) a Solução 5 apresenta um comportamento fora do padrão observado para as demais. Há bandas em $\approx 420\text{nm}$ e $\approx 530\text{nm}$ para a emissão, e em $\approx 360\text{nm}$ a $\approx 380\text{nm}$ para a excitação, que não são observadas para as soluções com menor quantidade de nitrometano (Solução 1, 2, 3 e 4).

Dessas observações deduz-se que: a) é evidente que as modificações observadas para os deslocamentos e para a variação na intensidade das bandas deve-se às alterações da polaridade do meio pelo aumento da concentração de nitrometano. Entretanto, é importante destacar que as diferenças observadas para a Solução 1 e 2 não são suficientes para afirmar se essas alterações estão relacionadas às interações específicas entre o PRX e o nitrometano pois, de acordo com a TAB. IV.2.2, a quantidade desse último é muito superior à da droga (cerca de 3710 vezes na Solução 2); b) as observações para a Solução 5, fugindo ao comportamento das demais, se devem à mudança das concentrações das possíveis espécies do PRX que podem apresentar emissão. Observando atentamente o formato das superfícies mostradas na FIG. IV.2.7, podem-se separá-las em dois conjuntos distintos: as Soluções 1, 2, 3 e 4 e 6, 7 e 8, respectivamente. Constata-se, assim, que os deslocamentos (para o vermelho) das bandas de emissão parecem ter ocorrido em dois estágios. Contudo, essas modificações foram mais acentuadas entre as soluções 5 e 6. Isto indica que há alguma transição entre as concentrações das espécies, ou seja, até um determinado limite de polaridade do meio a concentração relativa das espécies de PRX não sofreu alterações significativas. Após esse limite a proporção entre as espécies foi significativamente alterada. É importante lembrar que cada uma das espécies de PRX pode ter rendimento quântico de fluorescência bem distinto e outras ainda podem nem apresentar emissão. É isso que justifica a diminuição brusca na intensidade de emissão e dos deslocamentos observados para as Soluções 5 e 6.

Resta a comparação dos dados experimentais (FIG. IV.2.6 e IV.2.7) com os dados teóricos (FIG. IV.2.1-5). Estes últimos podem ser de grande ajuda no entendimento das interações soluto-solvente e seus efeitos nos processos fotofísicos que ocorrem nas moléculas da droga.

De acordo com os dados obtidos pelos cálculos semi-empíricos pode-se inferir que as estruturas conformacionais da forma cetônica são mais estáveis em meios polares por apresentarem momentos dipolares maiores. Em contrapartida, as estruturas conformacionais da forma enólica são mais estáveis em meios apolares justamente por apresentarem momentos dipolares menores, concordando com os dados da literatura, especificamente com o trabalho de Nicolle *et al* (1995) que relaciona o momento de dipolo encontrado via MOPAC/AM1 para um dos conformeros do N-benzil,N-n-propil(2-metil-3-nitrofenil)acetaminda com dados experimentais obtidos via RMN ^1H indicando que a estrutura conformacional mais polar é a mais estável em meio com mai-

or polaridade. Uma das estruturas conformacionais para o PRX-enol (o confôrmero A), encontrada neste trabalho, concorda com os dados apresentados por Alencastro e Neto (1995) utilizando o mesmo método AM1, no sentido de que ambas as estruturas possuem certa planaridade e interações via pontes de hidrogênio, excetuando-se somente a posição relativa do grupo metila que se encontra invertida. Mas como o autor não menciona a energia total da geometria otimizada no referido artigo, não foi possível verificar se essa diferença é significativa ou não. Moses *et al* (1995) investigaram (através de voltametria cíclica) o equilíbrio ceto-enólico do PRX em água (pH de 1,90 a 4,90 à temperatura ambiente e concentração de $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), constatando que a proporção entre os constituintes não variou significativamente, sendo de $\cong 18\%$ para a forma cetônica e $\cong 82\%$ a enólica. Isso parece estar em contradição com os resultados até então obtidos. Entretanto, é preciso levar em conta que: a) a concentração utilizada no referido estudo é uma ordem de grandeza maior que aquela utilizada nesta Tese; b) os autores estudaram o equilíbrio ceto-enólico em água, com variação do pH, enquanto que nesta Tese o meio considerado foi uma mistura de CCl_4 e CH_3NO_2 ; c) os autores utilizaram solução-tampão para manter o pH constante e como já mencionado um dos objetivos deste trabalho é procurar estudar o comportamento espectroscópico do PRX com mínima influência de outros componentes, pois a técnica utilizada (fluorimetria) é suficientemente sensível para investigar determinadas interações que não seriam percebidas por meio de outras técnicas (UV/V).

Como as modificações conformacionais para o PRX parecem ser dinâmicas para uma série de confôrmeros e polaridade do meio deve direcionar qual deles terá preferência. Os resultados dos cálculos semi-empíricos (poços de potencial correspondendo a cada confôrmero), indicam que algumas dessas formas serão menos preferenciais em virtude das barreiras de potencial, mas a molécula deve encontrar um ponto que contrabalance as forças que direcionam a formação dos confôrmeros, tanto aquelas intrínsecas da molécula como aquelas resultantes das interações com o solvente (impedimentos estéricos, interações entre os átomos via pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, delocalização eletrônica, variação do momento de dipolo do soluto e do meio, interação específica etc.). Pode-se concluir que:

- i) algumas das estruturas conformacionais mais estáveis do PRX-enol e do PRX-ceto, obtidas via cálculos semi-empíricos, não devem, quando em solução, apresentar grandes modificações. De acordo com as superfícies de energia total e de momento de dipolo em função de ϕ_1 e ϕ_2 (FIG. IV.2.1), observa-se que: a) a estrutura mais estável do PRX-enol (forma A) apresenta um dos menores momentos de dipolo juntamente com a forma D; b) duas das estruturas estáveis do PRX-ceto (as formas B e D) apresentam um dos maiores momentos de dipolo, tendo a forma A um valor intermediário.
- ii) para PRX-enol as várias estruturas conformacionais A, C e D encontram barreiras de potencial superiores a $5,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (FIG. IV.2.1 a) para que uma seja convertida na outra. Levando-se em consideração que esses valores podem estar subestimados (Fabian

(1988) e Nicolle *et al* (1995)), esses confôrmeros tendem a ficar com essas estruturas, salvo pequenas alterações em alguns parâmetros moleculares. Uma dessas estruturas (FIG. IV.2.4 a) obedece a duas condições básicas para apresentar emissão fluorescente: a) planaridade, facilitando a delocalização eletrônica; b) rigidez, pela formação de pontes de hidrogênio intramoleculares (TAB. IV.2.2) além de outras interações, constatadas pela análise de distribuição de cargas. Estes dados indicam que a estrutura PRX-enol-a deve ser uma das mais rígidas o que dificulta a desativação por relaxação vibracional e, conseqüentemente, favorece a emissão;

- iii) o PRX-ceto também pode apresentar várias estruturas conformacionais mas o comportamento nesse caso é o inverso do observado para o PRX-enol: as barreiras de potencial que separam esses confôrmeros são menores do que $5,0\text{kcal.mol}^{-1}$, exceto para o A. Segundo o raciocínio apresentado no item anterior, há indícios de que eles possam ser interconvertidos. A emissão fluorescente dessas espécies, se houver, deve ser menor pelas razões inversas daquelas mencionadas para o PRX-enol-a, ou seja, elas não possuem planaridade. Portanto, o fenômeno de delocalização eletrônica que poderia favorecer a emissão fluorescente fica prejudicado. Mesmo não apresentando uma das características necessárias para a emissão, isso não exclui a possibilidade de que alguns dos confôrmeros do PRX-ceto tenham esse comportamento. Uma observação atenta na FIG. IV.2.5 constatará que embora esses confôrmeros não sejam planares como num todo, existe certa planaridade em alguns dos seus grupos cromóforos e, também, certa rigidez (TAB. IV.2.1). Um indicativo disso são as distâncias entre os átomos H(25)-N(14) para o PRX-ceto-a e para PRX-enol-b (de 2,86 Å e de 2,93Å, respectivamente);
- iv) como as formas enólicas e cetônicas do PRX não existem independentemente em solução, há equilíbrio entre elas. Embora todas, em princípio, possam absorver luz somente algumas parecem preencher os requisitos necessários para apresentar emissão. Por essa razão, quando a polaridade do meio varia um (ou alguns) desses confôrmeros serão formados preferencialmente em detrimento de outros, pois a concentração total de PRX não é modificada. Os dados experimentais são claros no sentido de que o rendimento quântico de fluorescência total (somatória dos rendimentos quânticos de todas as espécies químicas fluorescentes presentes em solução) sofre variação. Logo, é evidente que dentre as espécies presentes, os rendimentos quânticos são diferentes e que a variação na concentração relativa dessas espécies (com emissão fluorescente diferente) causa as alterações observadas nos dados experimentais.

Um dos pontos mais interessantes neste estudo se refere às atribuições das bandas de emissão, ou seja, qual banda estaria relacionada com qual dos confôrmeros. Entretanto, deve-se levar em conta que: a) segundo os dados experimentais desta seção há somente duas espécies que emitem (uma na região em $\approx 330\text{nm}$ para a excitação e em $\approx 470\text{nm}$ para a emissão e outra na região $\approx 360\text{nm}$ para a excitação e em $\approx 470\text{nm}$ para a emissão (FIG. IV.2.6)); b) segundo os

dados teóricos há três possíveis espécies para o PRX-enol e mais duas para os PRX-ceto (FIG. IV.2.1 b e c) que *a priori* podem emitir pelo fato de apresentar certa planaridade e rigidez bem como estar confinada no correspondente mínimo na superfície de energia total (barreiras superiores a $5,0\text{kcal.mol}^{-1}$). A magnitude das barreiras de potencial, o comportamento do momento de dipolo em função da rotação das ligações bem como alguns parâmetros relacionados com algumas interações interatômicas (TAB. IV.2.1), fornecem indicações de qual das espécies teria maior probabilidade de fluorescer. Portanto, levando-se em conta essas questões bem como as conclusões apresentadas, pode-se dizer que o PRX-enol-a (FIG. IV.2.4-a) corresponde à espécie responsável pela emissão na região em $\cong 470\text{nm}$ com excitação em $\cong 330\text{nm}$ nas soluções 1, 2, 3 e 4 (FIG. IV.2.7). Resta a outra espécie que apresenta emissão correspondente às soluções 6, 7 e 8 (FIG. IV.2.7) a qual pode ser atribuída a qualquer um dos conformeros mencionados, pois a maioria deles preenche o requisito básico para apresentar um pequeno rendimento quântico de emissão ou ainda que a espécie detectada experimentalmente seja uma que não tenha sido investigada através dos cálculos semi-empíricos realizados nesta Tese. É essencial lembrar que a análise dos resultados experimentais com conseqüente atribuição das emissões somente tem sentido, neste conjunto de dados analisados, para aquelas espécies do PRX que apresentam emissão e é por essa razão que a questão das atribuições será discutida novamente na próxima seção (IV.3) onde outros dados experimentais foram tratados com recursos de deconvolução espectral (PARAFAC), que auxiliará a compreensão do comportamento espectroscópico do PRX.

IV.3 – ESTUDO FOTOFÍSICO DO PIROXICAM EM MEIO HIDROFÍLICO EM PRESENÇA DE CICLODEXTRINAS.

A FIG. IV.3.1 mostra os dados de emissão total obtidos para algumas das amostras correspondentes ao conjunto Qualificativo (Q, Solução 5) e para o conjunto Planejamento (P, Ensaios 13, 14 e 15) conforme especificado nas TAB. III.3.2 e III.3.1, respectivamente (seção III.3).

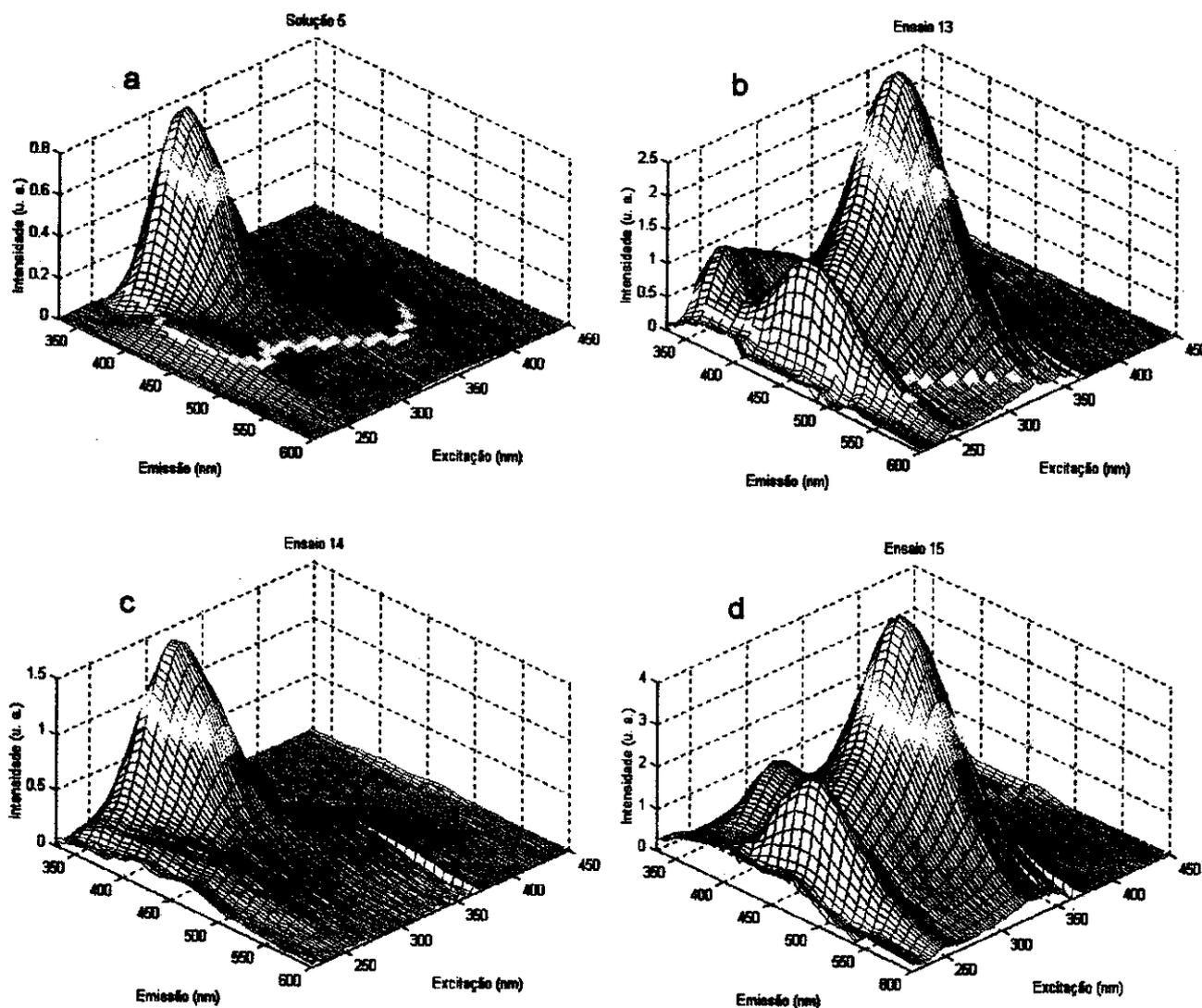


FIGURA IV.3.1 – Alguns resultados de emissão total obtidos para o conjunto Q e P conforme TAB. III.3.2 e TAB. III.3.1 respectivamente (seção III.3); a) Q, b) X-beta, c) X-alfa e d) X-gama.

Numa primeira observação dos resultados mostrados na FIG. IV.3.1, que correspondem a uma pequena fração de todos os dados coletados nessa etapa do trabalho, pode-se dizer que: a) a presença da α -ciclodextrina não provocou modificações relevantes no comportamento espectral do PRX; b) os perfis de excitação-emissão do PRX foram significati-

vamente alterados na presença de β -CD e de γ -CD, como pode ser constatado pela comparação entre os dados das amostras (Solução 5 e Ensaios 13 e 15); c) comparando-se as superfícies de emissão total para uma das mostras do conjunto X-beta (Ensaio 13) com uma das amostras do conjunto X-gama (Ensaio 15) observa-se que as ciclodextrinas alteraram de modo diferente os espectros de excitação-emissão do PRX. Essas discussões serão aprofundadas no decorrer desta seção, porque estes resultados se referem a menos de um quinto de toda a informação coletada e a comparação de todos esses dados seria exaustiva, o que dificultaria a interpretação tendo reflexo nas conclusões. Então, um método que possibilite a redução da dimensionalidade destas informações, como o PARAFAC, sem perda da estrutura original dos dados, poderia auxiliar nesta interpretação. Essa foi uma das razões pela qual este tipo de tratamento foi escolhido.

Um ponto que deve ser destacado se refere erro envolvido no experimento e na construção dos modelos. O conjunto denominado Q foi construído a partir de cinco amostras mais duas duplicatas. Portanto, sete superfícies de emissão total, o que possibilitou calcular o erro envolvido no processo. A magnitude desses erros pode ser estimada pela análise dos perfis de concentração relativa das espécies de PRX (FIG. IV.3.4-c). Assim, para as amostras com concentração igual a $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, observam-se dois pontos para cada curva. A média dos desvios-padrão encontrada para esses pontos foi de 0,0398 enquanto que o erro calculado a partir dos valores experimentais brutos, sem tratamento e somente para os dados coletados em duplicata, foi de 0,057. A partir destes valores encontrou-se que o erro envolvido em todo o processo ficou ao redor de 8%, um valor dentro dos padrões para dados de fluorescência.

A FIG. IV.3.2 apresenta alguns exemplos de amostras reconstituídas (utilizando-se o PARAFAC) para os conjuntos Q (Solução 5) e P (Ensaios 13, 14 e 15) e o resíduo para cada uma delas. Os cálculos para a reconstituição de uma das amostras foram ilustrados na seção III.5 e todas as outras superfícies foram obtidas do mesmo modo.

A FIG. IV.3.3 mostra o resíduo total médio para cada um dos conjuntos de dados: Q, X-alfa, X-beta e X-gama. O resíduo total médio corresponde à média da soma dos quadrados das diferenças entre as amostras reconstituídas e as correspondentes originais.

Antes de iniciar a discussão dos resultados dos cálculos é importante destacar a questão relativa à escolha do número de componentes utilizado na construção de cada modelo. Esse número está intimamente relacionado com os erros envolvidos na construção dos modelos e com aqueles inerentes ao experimento, ou seja, ao sistema em estudo e à técnica utilizada para investigação.

Para garantir homogeneidade na análise dos resultados alguns critérios foram adotados e aplicados na construção de todos os modelos: a) o perfil da variância percentual

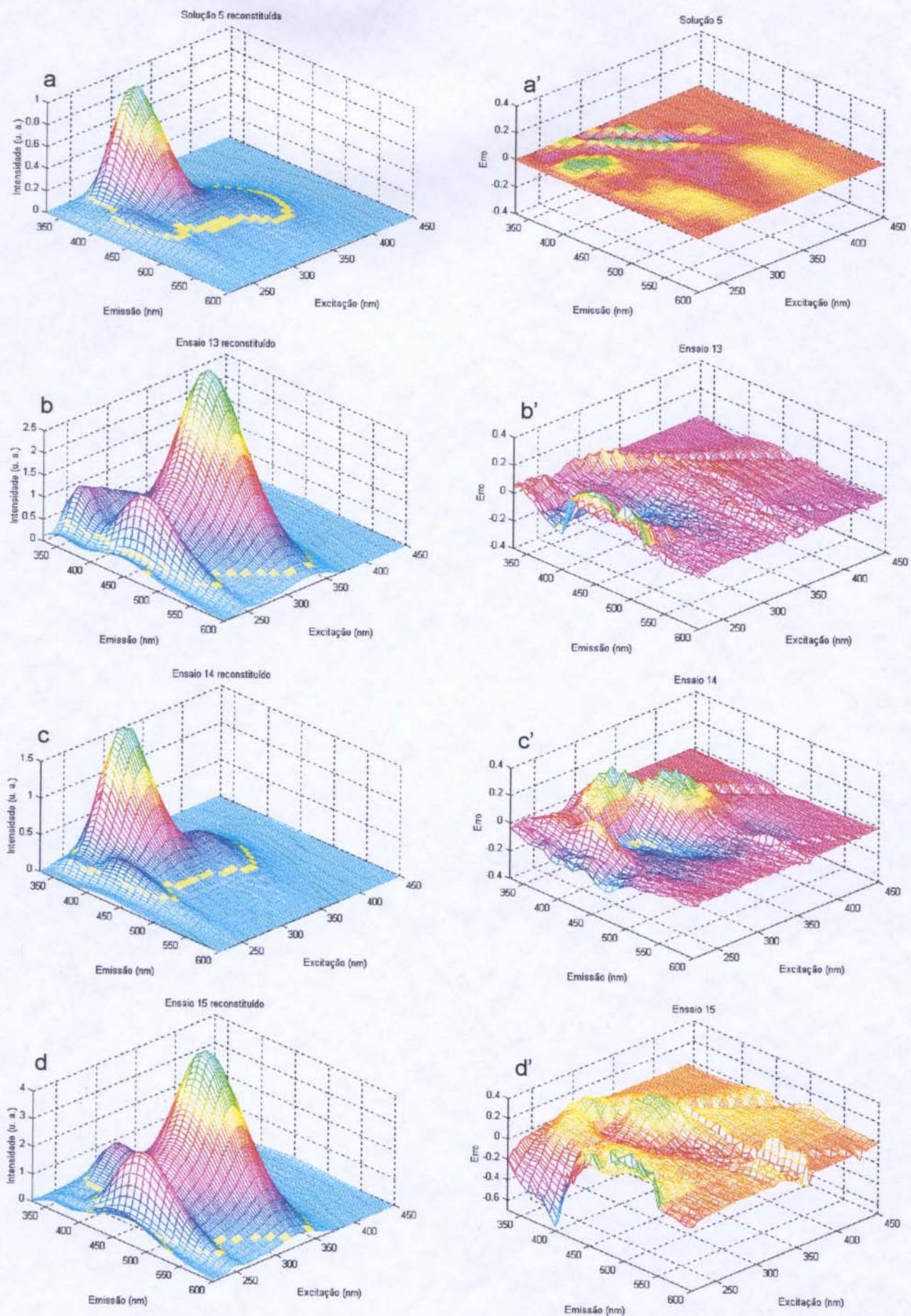


FIGURA IV.3.2 – Alguns exemplos de amostras reconstituídas para os conjuntos Q e P: a) Solução 5, b) Ensaio 13, c) Ensaio 14 e d) e Ensaio 15 e os resíduos das correspondentes amostras: a'), b'), c') e d').

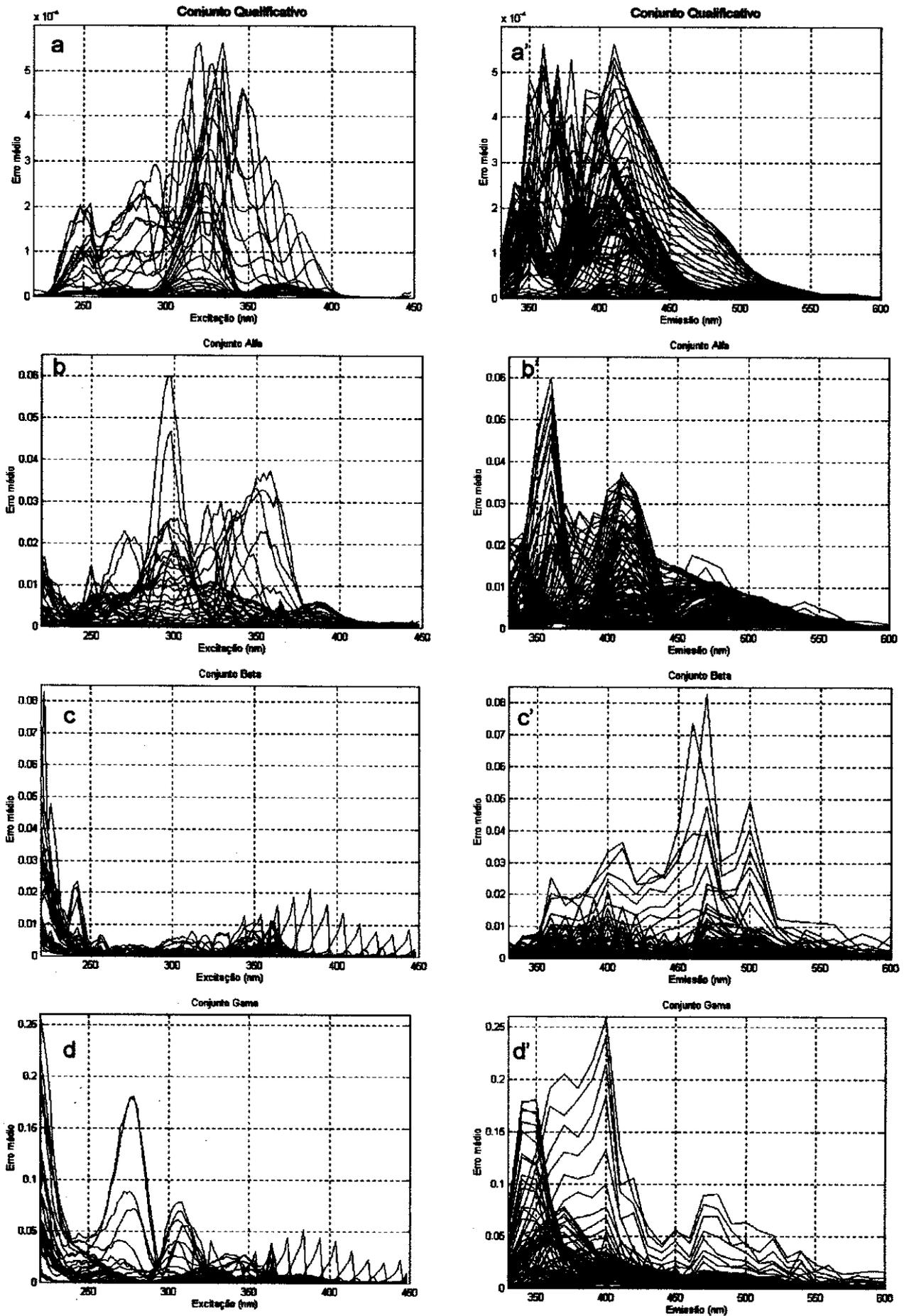


FIGURA IV.3.3 – Erro médio para cada conjunto de dados tratados nos modos excitação e emissão respectivamente: a) e a') Q, b) e b') X-alfa, c) e c') X-beta e d) e d') X-gama.

total explicada dada pelos valores de var, ssq e S5 (a serem discutidos posteriormente) em cada modelo deve atingir um patamar, ou se aproximar dele, de modo que com a adição de mais um componente ao modelo nenhuma informação relevante seja acrescentada. Assim, por exemplo, a adição do quinto componente na construção do modelo para o conjunto Q, não acrescenta informação significativa (FIG. IV.3.4-d); b) os perfis dos "loadings" para o primeiro e segundo modos, que correspondem respectivamente aos espectros de emissão e de excitação de cada provável espécie química, não devem apresentar nenhuma irregularidade, isto é, nenhuma descontinuidade ou outro comportamento que não caracterize um espectro de emissão e/ou de excitação da droga. Esses perfis são conhecidos em trabalhos disponíveis na literatura (já apresentados na introdução desta Tese) e que será de grande utilidade quando os resultados obtidos dos cálculos via PARAFAC forem analisados; c) todos os modelos que apresentaram variações significativas e/ou sistemáticas nos resíduos, com valores acima do erro experimental aceito ($\cong 10\%$) foram descartados, pois isso indica que deve haver informações relevantes nesses resíduos e que o modelo não consegue extraí-los em função do número de componentes utilizados na construção ser pequeno; d) todos os modelos que apresentaram perfis de concentração negativos não foram considerados, pois os cálculos de deconvolução para todos os dados discutidos nesta seção, foram realizados sem restrições para o terceiro modo (o da concentração) o que poderia facilitar a detecção de problemas de ajuste (mais detalhes a respeito das restrições nos cálculos de deconvolução são encontrados no Anexo II).

Uma análise dos resíduos dos modelos construídos ilustra o que foi discutido. A FIG. IV.3.2 apresenta os resíduos para algumas amostras. Esta é a diferença entre os dados da amostra reconstituída e os da amostra original e indica que a pequena variação sistemática não é relevante pois se encontra dentro do limite de erro de $\cong 10\%$ (aceito para os dados de fluorescência). Dentre os exemplos apresentados, os resíduos para a amostra Solução 5, do conjunto Q foram os menores. Constata-se que não há maneira de verificar se o ajuste está realmente bom ou não simplesmente comparando-se as superfícies reconstituídas (FIG. IV.3.2) com as originais (FIG. IV.3.1), pois as primeiras são muito semelhantes às segundas. Isso não deixa de sugerir que o modelo, pelo menos numa primeira aproximação, explica bem os dados experimentais. Mas, os resultados que permitem verificar se o modelo é bom ou não com maior grau de confiabilidade são aqueles mostrados na FIG. IV.3.3. Esses correspondem à média da soma dos quadrados das diferenças entre as amostras reconstituídas e as correspondentes originais. Numa observação atenta dos mesmos pode-se constatar que todos os modelos apresentam resíduos abaixo do erro experimental. Contudo, todos os resíduos apresentam certa variação sistemática, sendo maior naqueles do conjunto X-gama. É importante, neste momento, lembrar de todas as informações a respeito do sistema em estudo. Como discutido na seção III.3 a droga sob investigação pode ser fotodegradada pela luz do aparelho que atua como fonte de excitação durante a coleta dos dados. Considerando este fato e aqueles mencionados na referida seção, inferir-se que: a) os resíduos do

modelo do conjunto Q foram os menores e mesmo com aquelas variações sistemáticas eles podem ser considerados irrelevantes; b) os resíduos do modelo do conjunto X-beta também não são relevantes e a maior variação observada, correspondente à região de 220nm a 250nm para os espectros de excitação e à região de 350nm a 500nm para os espectros de emissão, podem ser atribuída a problemas de espalhamento de luz Rayleigh das amostras. A variação sistemática que existe na região de 350nm a 450nm para os mesmos espectros está relacionada ao espalhamento Raman. Essas últimas informações mostram que, na verdade, o modelo construído é muito bom, pois o método conseguiu separar somente as informações relevantes, deixando nos resíduos o que não é de interesse; c) estas justificativas não são suficientes para explicar toda a variação sistemática observada nos resíduos dos conjuntos X-alfa e X-gama, embora todos eles estejam abaixo do erro experimental. A justificativa encontrada para explicar essas variações está relacionada com a fotoestabilidade da droga, pois mesmo com todas as precauções (discutidas na seção III.3) o PRX pode ter sofrido fotodegradação durante a coleta de dados. Alguns deles (não incluídos nesta Tese) sugerem que essas variações podem de fato ocorrer, o que é suficiente para aceitar os problemas relativos à falta de ajuste do modelo.

A FIG. IV.3.4 apresenta os resultados obtidos nos cálculos de deconvolução espectral com o PARAFAC, para o conjunto Q (TAB. III.3.2). Os resultados var , ssq e $S5$ são correspondentes respectivamente: a) à variância relativa explicada para cada componente; b) à soma dos quadrados da diferença entre o modelo e os dados originais; c) à soma da variância explicada para cada componente. Esses últimos parâmetros indicam se o modelo escolhido para um determinado conjunto de dados apresenta um bom ajuste ou não, ou seja, o quanto dos dados originais o modelo explica sem perda de informações relevantes. Sem dúvida essas informações são importantes para a escolha correta do número de componentes de cada modelo, que é interpretado como o número de espécies quimicamente fluorescentes.

Um dos objetivos deste trabalho é fazer as atribuições das bandas de excitação-emissão às prováveis espécies da droga. Como mencionado na introdução e discutido na seção IV.2, o PRX pode se apresentar de diversas formas em função de suas características intrínsecas. Segundo Cho *et al* (1994), que estudaram o comportamento espectroscópico do PRX em metanol em função da concentração, há três espécies fluorescentes, cada qual numa região espectral. Geckle *et al* (1989) mostraram que o PRX pode se apresentar na forma de um "zwitterion" que também fluoresce e Moses *et al* (1995) investigaram, utilizando voltametria cíclica, o equilíbrio ceto-enólico da droga em água. Todavia, além dessas possibilidades o composto pode também apresentar comportamentos distintos em função das estruturas conformacionais que pode assumir, como discutido na seção IV.2. Neste sentido e numa primeira tentativa de atribuição das bandas de emissão da droga (FIG. IV.3.4) e segundo dados dos pesquisadores Cho *et al* (1994), tem-se: a) banda em $\cong 480\text{nm}$

para a forma enólica, b) banda em $\approx 420\text{nm}$ para a espécie "zwitterion", c) banda em $\approx 370\text{nm}$ para a forma Ceto-I; d) banda em $\approx 360\text{nm}$ para a forma Ceto-II.

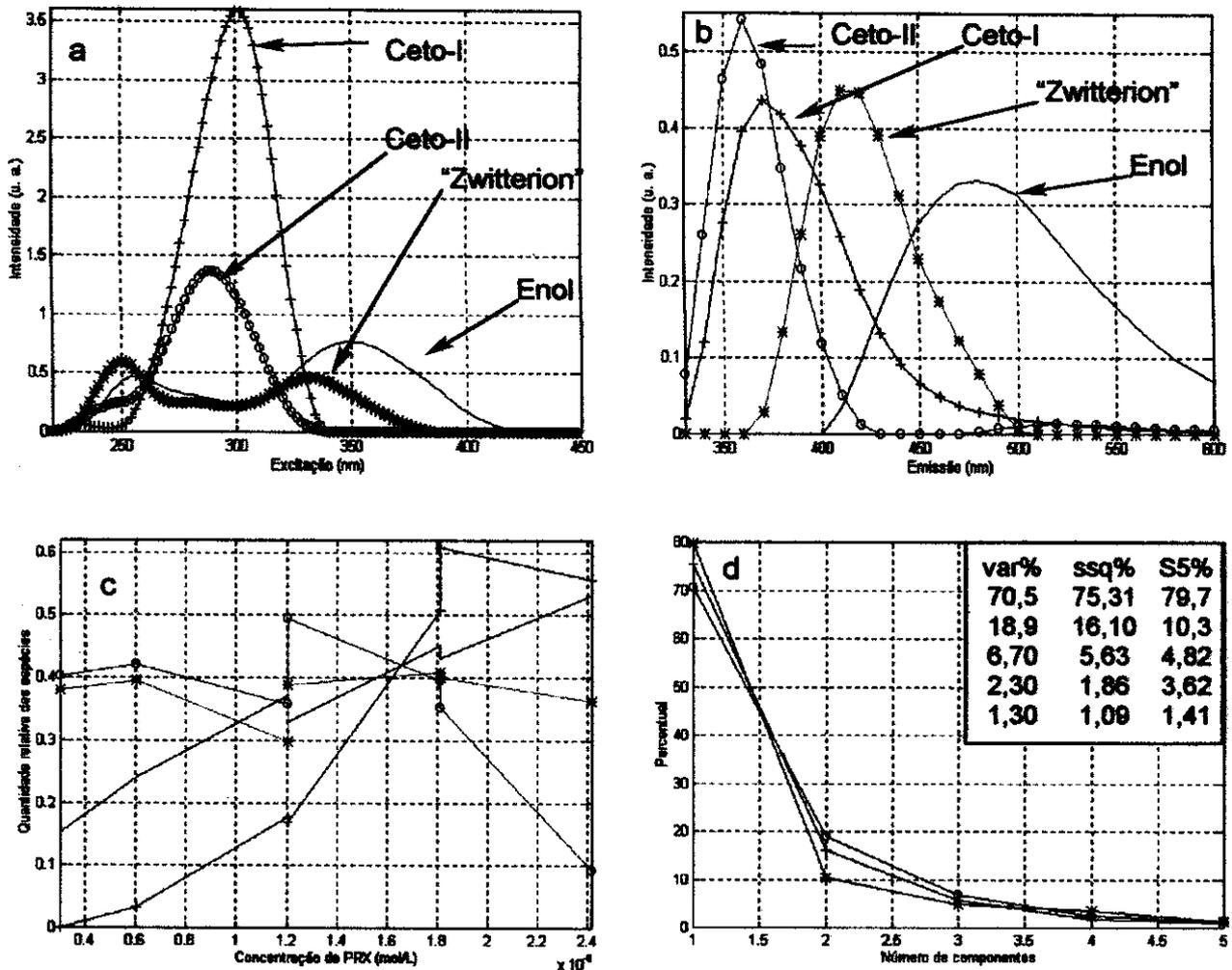


FIGURA IV.3.4 – Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto Q com quatro componentes (+ CP1, o CP2, – CP3 e * CP4): a) "loadings" para o primeiro modo, correspondentes ao perfis dos espectros de excitação, b) "loadings" para o segundo modo, correspondentes aos perfis dos espectros de emissão, c) "loadings" para o terceiro modo, correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes.

Os resultados mostrados na FIG. IV.3.4-c estão de acordo com aqueles observados por Cho *et al* (1994), pois há variação na quantidade relativa das espécies em função da concentração do PRX indicando, por exemplo, que a quantidade da espécie com emissão em $\approx 420\text{nm}$ ("zwitterion") permanece aproximadamente constante. Contudo, o mesmo não ocorre com a espécie com emissão em $\approx 370\text{nm}$ (Ceto-I), onde a concentração relativa aumenta continuamente até $1,8 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$ de PRX. O mesmo comportamento é verificado para a espécie cuja banda é observada a $\approx 480\text{nm}$ (Enol).

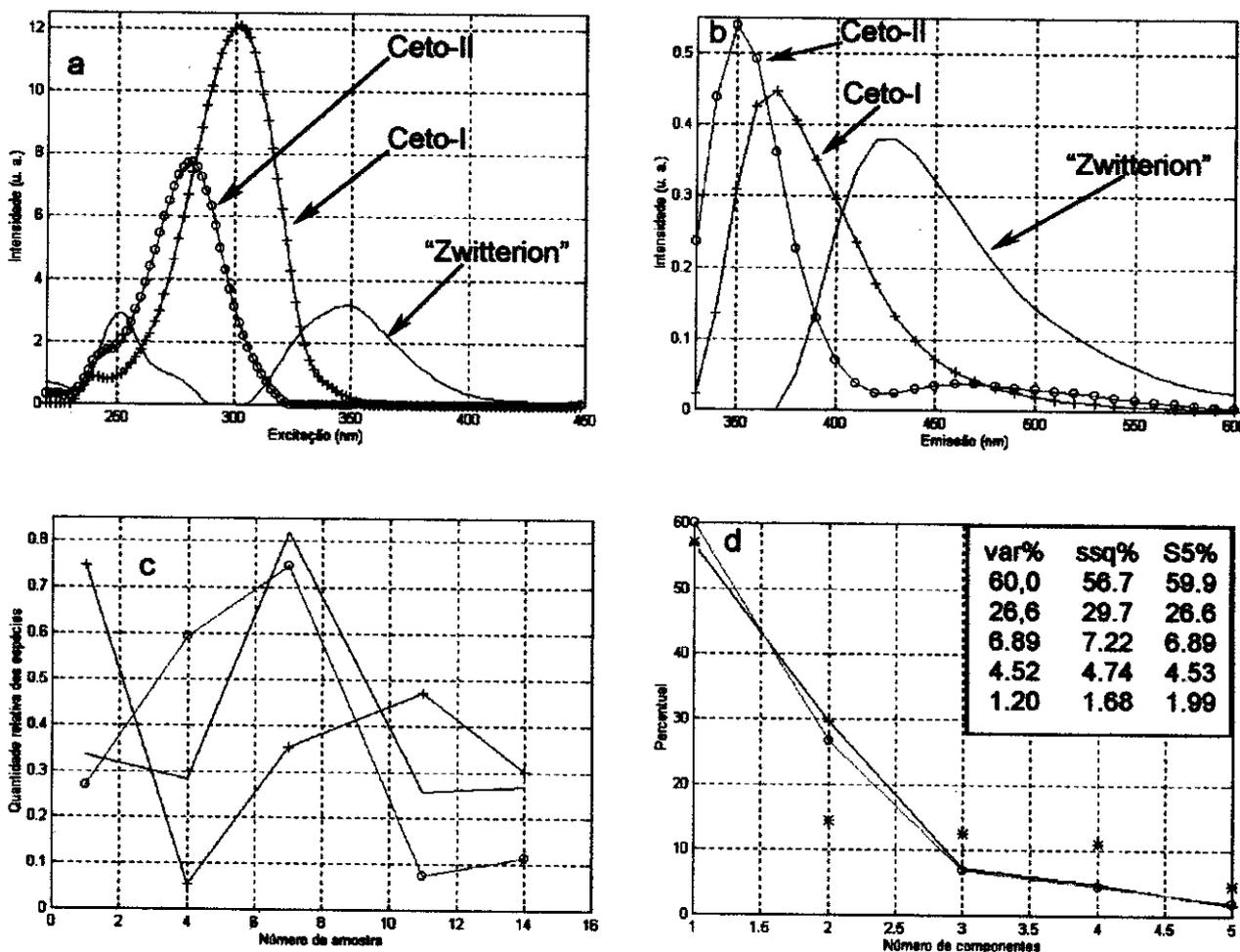


FIGURA IV.3.5 - Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto X-alfa com três componentes (+ CP1, o CP2 e - CP3): a) "loadings" para o primeiro modo correspondentes aos perfis dos espectros de excitação, b) "loadings" para o segundo modo correspondentes aos perfis dos espectros de emissão, c) "loadings" para o terceiro modo correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes.

Estas atribuições poderão ser confirmadas quando estes resultados forem comparados com aqueles provenientes do conjunto P, onde em função do próprio experimento, planejado com o intuito de extrair o máximo de informação do sistema, haverá possibilidade para discussões mais amplas.

As FIG. IV.3.5–7 mostram os resultados dos cálculos obtidos para o conjunto P. Como especificado na seção III.4 este conjunto foi subdividido em três pois dessa maneira os cálculo de deconvolução apresentaram os melhores resultados e em concordância com o planejamento experimental. As FIG. IV.3.5, IV.3.6 e IV.3.7 apresentam os resultados dos cálculos para cada conjunto de amostras, isto é, aquelas que têm em comum a α -, a β - e a γ -CD, respectivamente.

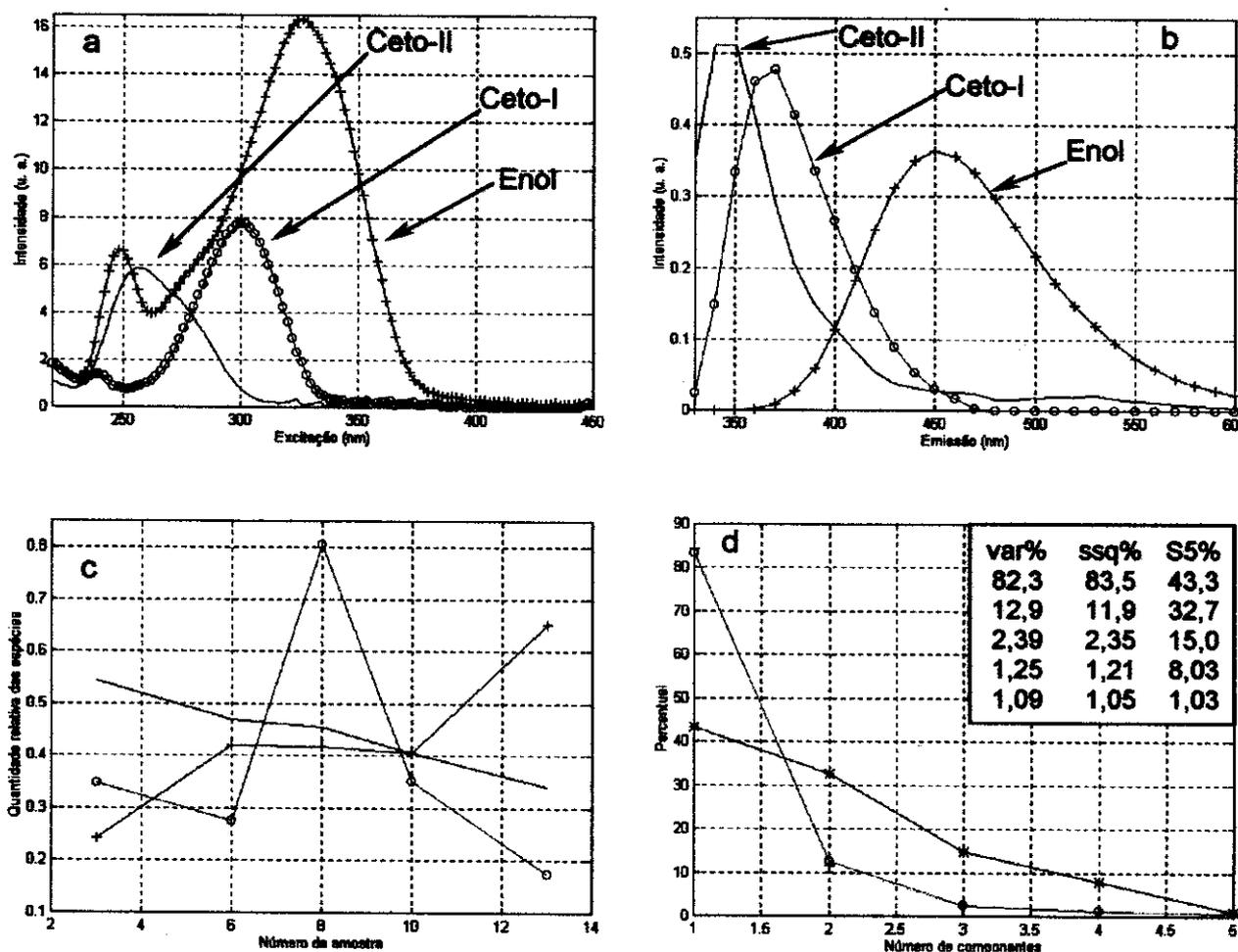


FIGURA IV.3.6 - Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto X-beta com três componentes (+ CP1, o CP2 e - CP3): a) "loadings" para o primeiro modo correspondente ao perfis dos espectros de excitação, b) "loadings" para o segundo modo correspondente aos perfis dos espectros de emissão, c) "loadings" para o terceiro modo correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e * S5 em função do número de componentes.

Em relação à concordância com o planejamento é importante mencionar que foram tentados vários tipos de agrupamento das amostras na expectativa de melhorar a resolução dos espectros, pois para alguns desses conjuntos os resultados determinados via PARAFAC se apresentaram inconsistentes por razões inerentes ao sistema. Mas todos os resultados devem estar em concordância com o próprio planejamento e também com outras informações que se têm a respeito do sistema sob investigação. Como será discutido em momento oportuno, o planejamento procurou contemplar situações que possibilitassem o entendimento do comportamento espectroscópico da droga, isto é, tendo como uma das variáveis o tipo de ciclodextrina, que está diretamente relacionado com o tamanho da cavidade pela qual o PRX pode se complexar. Poder-se-ia esperar que pelo fato de haver várias es-

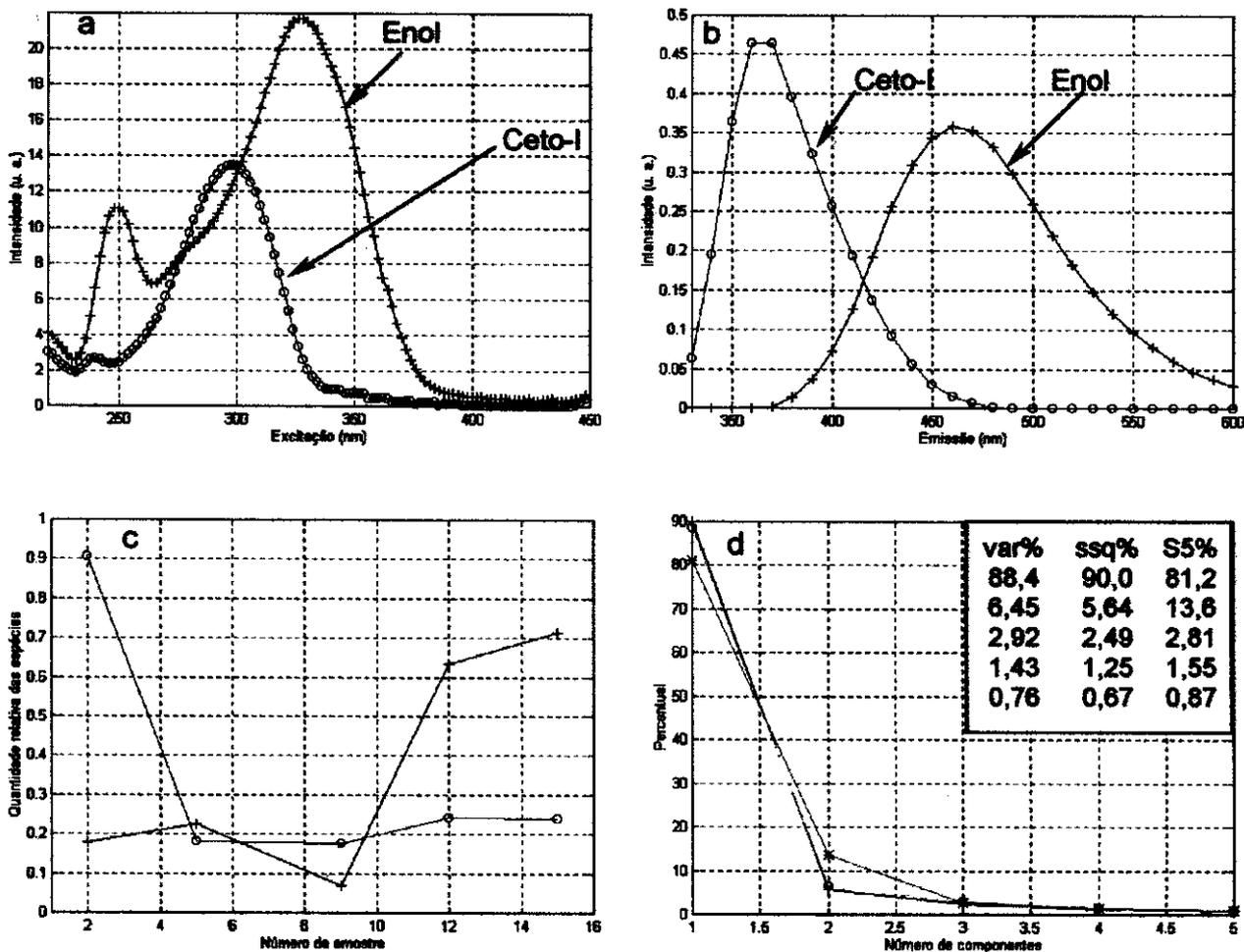


FIGURA IV.3.7 – Resultados obtidos dos cálculos realizados com o PARAFAC para o conjunto X-gama com dois componentes (+ CP1 e o CP2): a) “loadings” para o primeiro modo correspondente ao perfis dos espectros de excitação; b) “loadings” para o segundo modo correspondente aos perfis dos espectros de emissão; c) “loadings” para o terceiro modo correspondentes aos perfis de concentração das prováveis espécies de PRX e d) o var, + ssq e + S5 em função do número de componentes.

pécies químicas presentes no meio, algumas delas tivessem preferência para sofrer determinadas interações com as referidas cavidades em detrimento de outras e como tudo está em equilíbrio (a concentração total de PRX não varia) algumas dessas espécies podem ter suas concentrações diminuídas a ponto de que não possam ser detectadas via fluorescência. Mas, como a diferença de tamanho das cavidades das CD's não é tão significativa (TAB. I.1) e pode ocorrer que a mesma espécie química de PRX tenha afinidade com todas as CD's, ela pode comportar-se de modo diferente em função do grau de complexação. Suponha que uma das formas do PRX (a enólica, menos polar) tenha preferência na comple-

xação. Para α -CD há um determinado grau de encapsulamento; para a β -CD esse grau é maior, pelo fato da cavidade ser maior, e para a γ -CD esse grau pode ser ainda maior ou o encapsulamento não ocorre justamente porque a cavidade é muito grande.

Enfim, para uma mesma espécie (a enólica) o grau de encapsulamento pode variar em função do tamanho da cavidade da CD e como é de se esperar isso refletirá no seu comportamento espectroscópico, o que pode ser verificado pelas diferenças nos espectros de excitação-emissão. Entretanto, como é possível que o grau de encapsulamento varie pouco entre as CD's pode ocorrer que os espectros de excitação-emissão apresentem também pequenas alterações com pequenos deslocamentos, os quais dificultam o processo de deconvolução espectral. Esta é a razão pela qual, quando o conjunto P foi dividido em três grupos (de acordo com o tipo de ciclodextrina o X-alfa, X-beta e o X-gama) os resultados dos cálculos não apresentaram problemas de inconsistência segundo o PARAFAC. Os problemas surgem devido ao alto grau de correlação que os dados possuem, porque as espécies-complexos presentes no sistema são muito parecidas, resultando em comportamentos espectroscópicos semelhantes em alguns casos.

Numa primeira comparação entre todos os resultados obtidos dos cálculos de deconvolução para os conjuntos Q e P (FIG. IV.3.4-7) pode-se observar que o número de componentes utilizado na construção de cada modelo foi diminuindo: para o conjunto Q utilizaram-se quatro componentes, para o X-alfa e o X-beta três e para o X-gama somente dois. Isso confirma que com o aumento da cavidade da CD, uma das espécies de PRX (aquela com a maior afinidade, provavelmente a enólica), sofreu complexação e a modificação no grau dessa complexação deslocou o equilíbrio alterando as concentrações relativas das outras espécies, pois a quantidade das CD foi mantida aproximadamente constante, e muito superior à da droga em todo o experimento (15mmol.L^{-1}), variando a concentração total do PRX e a de oxigênio.

O que é efetivamente medido no aparelho deve estar relacionado às alterações nas concentrações das espécies e a deslocamentos nos máximos de excitação-emissão para uma espécie específica; logo, se alguma alteração ocorrer nessas concentrações ou nos deslocamentos, em função de um planejamento, espera-se que seja constatado também na construção dos modelos utilizando os métodos de deconvolução espectral. Isso pode ser verificado, por exemplo, quando se analisa os resultados dos perfis da quantidade relativa das espécies para o conjunto X-beta (FIG. IV.3.6-c). Observa-se que para a espécie correspondente ao primeiro componente do modelo (CP1, com máximo de emissão em $\approx 450\text{nm}$ e excitação em $\approx 250\text{nm}$ e em $\approx 330\text{nm}$) o perfil da concentração apresenta um comportamento concordante com o planejamento (FIG. IV.3.8). Para as amostras 3, 6, 8, 10 e 13 há uma variação de concentração de PRX da seguinte forma: menor para a amostra 3, intermediária para as amostras 6, 8 e 10 e superior para a 13. Observa-se, também, que o perfil da variação da quantidade relativa para o CP2 (com emissão em $\approx 370\text{nm}$ e excitação em $\approx 300\text{nm}$)

não segue o mesmo padrão da espécie anterior. Contudo, quando se compara com o planejamento (FIG. IV.3.8) constata-se que a amostra 8, com maior quantidade dessa espécie, apresenta uma concentração intermediária para o oxigênio e para as demais amostras essa concentração é inferior (amostra 3) ou superior (amostra 10), o que justifica essa diferença.

A interpretação desses resultados não é tarefa simples pois o sistema, além de ser complexo pelo fato do PRX se apresentar de várias formas diferentes, sofre influência diferentemente de acordo com a modificação de algumas variáveis em conformidade com o planejamento. Portanto, quando uma variável é modificada para investigar o comportamento do sistema é preciso ter mente que cada espécie presente pode perceber essa influência de maneira diferente. Sem dúvida todas as espécies estão interligadas por causa dos equilíbrios, mas nem sempre as informações coletadas neste estudo (embora em grande quantidade) são suficientes para que se tenha uma visão clara de como essas espécies estão relacionadas Talvez uma das maneiras que possibilite a interpretação de todos esses dados seja a construção do que se chama de superfície de respostas (Box *et al* (1987)), que utiliza o planejamento experimental. Entretanto, para que isso pudesse ser feito nesta Tese seria preciso completar a coleta de dados. Como discutido na seção III.3 utilizou-se um planejamento fracionário com o objetivo de investigar somente alguns comportamentos do PRX com o mínimo esforço possível, o que foi realizado pelo menos num sentido qualitativo, trazendo bastante informação sobre este sistema complexo.

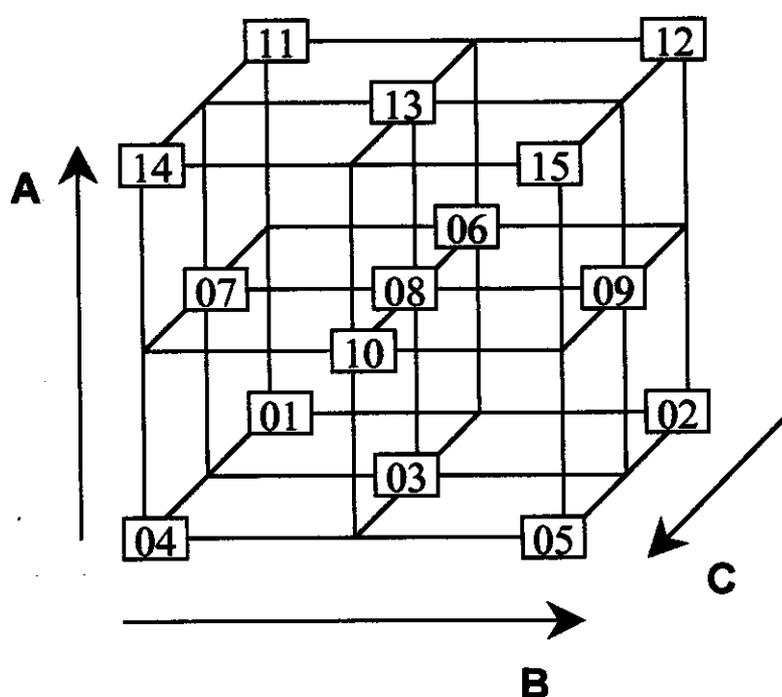


FIGURA IV.3.8 – Representação geométrica do planejamento cúbico de face centrada com uma amostra central. Variável A: concentração de PRX. Variável B: tipo de ciclodextrina. Variável C: concentração de oxigênio (conforme TAB. III.3.1).

É imprescindível mencionar que os resultados obtidos dos cálculos de deconvolução espectral, os "loadings" dos modos de emissão e de excitação, foram interpretados como espectros verdadeiros das espécies químicas nas atribuições, pois assim as discussões são facilitadas, principalmente para as pessoas que não estão acostumadas com a terminologia quimiométrica.

Como já mencionado nesta seção, o número de componentes utilizado na construção de cada modelo, para os diferentes conjuntos de dados (Q, X-alfa, X-beta e X-gama), foi modificado em função de alguns critérios estabelecidos para garantir a homogeneidade dos resultados e que concordaram com o método PARAFAC pois foram consistentes, sem problemas de degenerescência (seção III.4) ou outros que discordassem de outras informações da literatura a respeito do sistema (Cap. I).

Considerando as atribuições das bandas de excitação-emissão para as espécies do PRX, já mencionadas nesta seção, podem-se observar comportamentos concordantes com o planejamento experimental. Essas atribuições poderão ser confirmadas com os dados provenientes da literatura e daqueles da seção IV.2, o que será feito logo em seguida. Nesse sentido tem-se:

- i) A espécie Ceto-I, no conjunto Q (FIG. IV.3.4), com máximo de emissão em $\approx 370\text{nm}$ e de excitação em $\approx 300\text{nm}$, tem sua concentração alterada de modo inversamente proporcional às concentrações de oxigênio e total de PRX, isto é, para as amostras cujos níveis no planejamento experimental são todos inferiores ou todos superiores para estas duas variáveis (as amostras rotuladas com os maiores números para cada conjunto apresentam os níveis superiores para a concentração de oxigênio e para a de PRX e as menores o inverso (TAB. III.3.1 e FIG. IV.3.8)). Assim, por exemplo, para a amostra 1 que possui os níveis (0, 0, 0) ($[\text{O}_2]$, [tipo de ciclodextrina], [PRX]) a concentração relativa da referida espécie é maior do que aquela para a amostra 14 com níveis em (1, 0, 1). Este comportamento é observado para os demais conjuntos (X-alfa, X-beta e X-gama, FIG. IV.3.5-7-c). Observa-se, também, que os espectros de excitação-emissão dessa espécie não sofreram deslocamentos significativos em função do planejamento, excetuando-se que as respectivas bandas de emissão para os conjuntos Q e X-alfa apresentam pequeno alargamento quando comparadas com os resultados dos demais conjuntos. Comparações entre as concentrações relativas das espécies entre os diferentes conjuntos devem ser evitadas pois para cada um deles foi construído um modelo diferente, o que dificulta qualquer afirmação. Entretanto, verifica-se tendências em cada caso separadamente o que pode ser utilizado para comparações;
- ii) A espécie Ceto-II, com máximo de emissão em $\approx 360\text{nm}$ e de excitação em $\approx 280\text{nm}$, segundo atribuição dada para o conjunto Q (FIG. IV.3.4-a e b), apresenta aproximadamente o mesmo comportamento da espécie Ceto-I em relação à sua concentração

relativa, mas com deslocamentos nos máximos de emissão e de excitação para o azul, passando respectivamente a $\approx 345\text{nm}$ e a $\approx 255\text{nm}$ no conjunto X-beta, com posições intermediárias no conjunto X-alfa. Verifica-se que esta espécie está ausente no conjunto X-gama e isso sugere que a concentração de todas as espécies está se alterando em virtude das modificações das variáveis no planejamento que ora pode favorecer a formação de uma espécie, ora a formação de outra, pois a concentração total de PRX foi mantida aproximadamente constante em todo o experimento. Essa observação indica a ocorrência de dois fenômenos: a) que o tipo de ciclodextrina tem influência marcante nos equilíbrios existentes entre as espécies de PRX; b) uma dessas espécies, provavelmente a enólica (menos polar, (seção IV.2)), apresenta maior afinidade pela γ -CD em função desta última possuir maior cavidade, o que possibilita maior encapsulamento.

- iii) O enol (com emissão em $\approx 475\text{nm}$ e excitação em de $\approx 350\text{nm}$ e em $\approx 260\text{nm}$ no conjunto Q (FIG. IV.3.4-a e b)), não é detectado no conjunto X-alfa. No entanto ele reaparece no conjunto X-beta, com emissão deslocada para o azul de $\approx 25\text{nm}$ (em $\approx 450\text{nm}$) e excitação, também deslocada para o azul de $\approx 20\text{nm}$, para a primeira banda ($\approx 330\text{nm}$) e de $\approx 10\text{nm}$ para a segunda banda ($\approx 250\text{nm}$). Para o conjunto X-gama essa espécie apresenta emissão em $\approx 460\text{nm}$ (deslocada de $\approx 20\text{nm}$ para o azul em relação ao conjunto Q) e excitação em $\approx 330\text{nm}$ e em $\approx 250\text{nm}$ (deslocadas para o azul, em relação ao mesmo conjunto, de $\approx 20\text{nm}$ e de $\approx 10\text{nm}$, respectivamente). Essas observações confirmam a suposição feita anteriormente, isto é, alguma variação relevante no grau de encapsulamento de uma determinada espécie pode ser verificada por modificação em seu comportamento espectral.
- iv) A espécie "zwitterion" (emissão em $\approx 415\text{nm}$ e excitação em $\approx 340\text{nm}$ e em $\approx 250\text{nm}$ no conjunto Q (FIG. IV.3.4-a e b)) sofre um pequeno deslocamento para o vermelho em suas bandas: de emissão e de excitação de $\approx 10\text{nm}$, surgindo a $\approx 425\text{nm}$ e a $\approx 350\text{nm}$, respectivamente. Essa espécie é detectada somente nos conjuntos Q e X-alfa sugerindo, novamente, a marcante influência das ciclodextrinas nos equilíbrios entre as espécies de PRX. A modificação das outras variáveis (concentração de oxigênio e de PRX) também provocou alterações significativas no comportamento espectral do PRX, como observado pela análise das concentrações relativas das espécies. Entretanto, foi alterando a variável tipo de ciclodextrina que se conseguiu obter os melhores resultados de deconvolução espectral.

Estas atribuições foram feitas em vista das informações disponíveis na literatura (já mencionada) e os resultados obtidos da análise conformacional do PRX (seção IV.2). Entretanto, é importante não confundir as atribuições feitas na seção anterior com aquelas desta seção. Estas foram feitas com base naqueles resultados para facilitar a localização das bandas e as discussões, mas isto não significa que sejam as mesmas. Contudo, este é

o momento de agrupar todas essas informações. Algumas das espécies químicas mencionadas nessa seção poderão ser comparadas e/ou igualadas com aquelas apresentadas na seção anterior, auxiliando as discussões e conclusões.

Yoon *et al* (1988) e Yoon e Kim (1989) mostraram que o PRX apresenta o fenômeno de transferência intramolecular de próton no estado excitado ($T_{1st}P_{EE}$) o qual pode ser favorecido em função da polaridade do meio e por interações tipo pontes de hidrogênio intermoleculares devido à natureza do solvente. Assim, quanto menor a polaridade do meio, maior será a quantidade relativa da espécie menos polar que pode apresentar o fenômeno de $T_{1st}P_{EE}$ devido à formação de ponte de hidrogênio intramolecular. Outras interações soluto-solvente podem favorecer ou não o referido fenômeno em função das estruturas conformacionais que as espécies do PRX podem assumir. Um exemplo dessa interação, e que será discutido com maior profundidade, é o caso da formação de complexos com ciclodextrinas, que podem alterar significativamente o comportamento espectral das substâncias. Kim *et al* (1994) estudaram o comportamento fluorescente do PRX em água (pH=4,0) em função da variação da concentração da β -CD e constataram que o aumento da CD provocou um aumento na fluorescência da droga ($\approx 450\text{nm}$). Com essas informações e segundo os resultados obtidos dos cálculos semi-empíricos, este aumento foi favorecido pela complexação com a β -CD pois a espécie de PRX complexada adquiriu uma conformação que as hidroxilas da β -CD auxiliaram a $T_{1st}P_{EE}$. A FIG. IV.3.9 mostra o complexo onde se visualiza a conformação aludida. Segundo os mesmos pesquisadores o PRX não se complexa com a

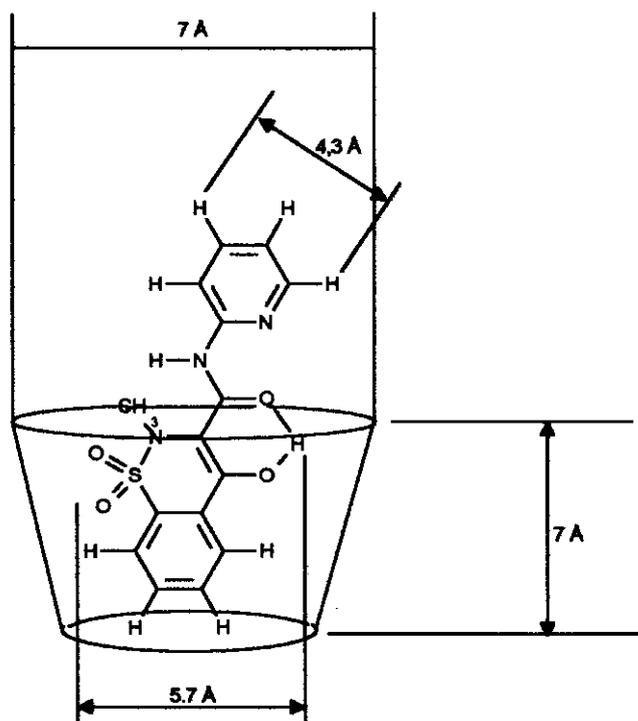


FIGURA IV.3.9 - Complexo formado entre a β -CD e o PRX (Kim *et al* (1993)).

α -CD devido ao pequeno tamanho da cavidade desta, e o espectro de absorção da droga apresenta máximo em $\approx 330\text{nm}$ quando complexado em β -CD. Isso concorda com os resultados obtidos para a referida espécie, conforme observado nas FIG. IV.3.5-7. É importante dizer que as condições experimentais utilizadas pelos pesquisadores na investigação não foram as mesmas utilizadas nos estudos desta Tese. Segundo os autores, as devidas precauções foram tomadas para evitar qualquer tipo de interferência, como por exemplo, impurezas fluorescentes da água e de outros meios. Todavia, as informações desse estudo indicam que os autores investigaram somente uma espécie do PRX, pois foi utilizado um meio aquoso com $\text{pH} \approx 4,0$. Deve-se lembrar que nos estudos realizados nesta Tese, além das condições experimentais serem diferentes ($\text{pH} \approx 7,0$ em solução 0,09% de KNO_3), a quantidade de dados coletados foi muito maior (115 espectros de excitação monitorados em 28 comprimentos de onda de emissão, para cada amostra) o que possibilita estudar sistemas complexos como misturas de compostos ou misturas de espécies químicas da mesma substância.

Considerando os comentários sobre o Enol e os resultados experimentais obtidos nesta seção, inferir-se que: a) para o conjunto X-alfa a mesma não é observada indicando que a α -CD provoca deslocamentos nos equilíbrios entre as espécies e que a concentração do enol diminui em detrimento do aumento do "zwitterion", Ceto-I e Ceto-II, pois a espécie enólica é observada no conjunto Q; b) os resultados observados para os conjuntos X-beta e X-gama concordam com os apresentados por Kim *et al* (1994) e com aqueles apresentados na seção IV.2 visto que, segundo a atribuição feita nesta seção, o Enol apresenta uma das bandas de excitação a $\approx 330\text{nm}$ e a banda de emissão a $\approx 450\text{nm}$ no conjunto X-beta e a $\approx 460\text{nm}$ no conjunto X-gama, sendo próxima das atribuições feitas pelos autores.

A comparação entre as concentrações relativas das espécies de um conjunto para outro deve ser evitada, mas através dos dados de variância explicada para cada componente em cada modelo construído pode-se ter uma idéia se a concentração do Enol no conjunto Q, por exemplo, é maior ou menor que no conjunto X-beta ou X-gama. Assim, é possível dizer que a concentração dessa espécie é bem menor que a do Ceto-I, no conjunto Q (FIG. IV.3.4), pelo fato de que a variância percentual explicada pelo correspondente componente no modelo é bem menor. Mas, a concentração desta última espécie (Ceto-I) no conjunto X-gama torna-se menor que a do Enol, pela mesma razão (FIG. IV.3.7). Conclui-se que: a) o aumento da cavidade da CD (uma das variáveis no planejamento experimental (FIG. IV.3.8)), provocou aumento na concentração do Enol porque este apresenta estrutura conformacional adequada para encapsulamento (FIG. IV.3.9); b) como a concentração total do PRX não varia, o aumento da concentração do Enol no conjunto X-beta e X-gama em comparação com o conjunto X-alfa, provoca diminuição na concentração das outras espéci-

es a ponto de somente duas delas serem detectadas no conjunto X-gama e, ainda assim, a espécie Ceto-I numa concentração bem inferior à do Enol (FIG. IV.3.7).

Cabem algumas observações sobre o fenômeno de TI_{ar} PEE e da complexação, empregando-se os resultados obtidos na seção anterior. Como há várias espécies químicas do PRX em solução, é possível que uma delas tenha preferência pelo encapsulamento pelo fato de apresentar estrutura conformacional adequada para o fenômeno. Embora algumas dessas espécies possam apresentar os requisitos necessários para a complexação, pode ocorrer que algumas delas, quando complexadas, não apresentem emissão. Quando se fala de estruturas conformacionais deve-se lembrar dos conhecimentos adquiridos no estudo anterior sobre os rotâmeros do PRX para as formas cetônicas e enólicas. Assim, sugere-se que o Enol, ao qual foi atribuído as bandas de excitação-emissão obtidas no tratamento de deconvolução espectral nesta seção (FIG. IV.3.4), seja a espécie PRX-enol-a (FIG. IV.2.4) obtida pelos cálculos semi-empíricos (Seção IV.2). Isso confirma o que foi suposto, pois esta espécie apresenta todos os requisitos necessários para o encapsulamento e para a emissão fluorescente, ou seja: a) planaridade; b) pequena polaridade, sendo mais estável em meios menos polares, o que favorece a complexação pelo fato da cavidade da CD apresentar pequena polaridade; c) formação de ponte de hidrogênio intramolecular, tornando a molécula mais rígida com menor probabilidade de sofrer relaxação vibracional nos processos fotofísicos quando excitada com luz visível. Essas observações corroboram o que foi comentado em relação à complexação da espécie enólica no sentido de que o encapsulamento favorece o fenômeno TI_{ar} PEE pelo fato da CD apresentar dois quesitos importantes: a) cavidade com baixa polaridade e b) hidroxilas nas bordas, que auxiliam a transferência do próton quando a molécula é excitada pela formação de pontes de hidrogênio intermolecular entre essas últimas e o PRX. Isso não acontece quando a molécula está num meio menos ordenado ou com maior polaridade, como a água, embora esta também possibilite de formação de pontes de hidrogênio.

Inferências semelhantes podem ser feitas também para as outras espécies químicas do PRX (PRX-ceto-c, PRX-ceto-c, etc. (FIG. IV.2.5)) segundo os resultados dos cálculos teóricos (seção IV.2). Assim, restam outras três espécies químicas às quais pode ser atribuída alguma estrutura conformacional obtida dos cálculos semi-empíricos. Duas dessas atribuições podem ser feitas com os referidos resultados, mas uma, a "zwitterion", não, pois os cálculos teóricos não foram realizados considerando possíveis cargas na molécula. O "zwitterion" teve suas bandas atribuídas de acordo com dados de Cho *et al* (1994) obtidos através de fluorescência resolvida no tempo.

Das conclusões apresentadas dos cálculos semi-empíricos tem-se que as formas PRX-ceto-a (FIG. IV.2.1 e IV.2.5) não devem ser interconvertidas nas demais, pelo fato de que a barreira rotacional possui energia elevada (superior a 5,0kcal/mol) mas as outras podem ser interconvertidas entre si. Logo, há duas estruturas conformacionais cetônicas que

podem ser atribuídas às espécies obtidas dos dados de deconvolução espectral. Desse modo a forma PRX-ceto-a (FIG. IV.2.1-e e FIG. IV.2.5, a mais estável) deve ser a Ceto-I segundo os resultados de deconvolução (FIG. IV.3.4). Os parâmetros do componente correspondente a essa espécie (perfis de excitação-emissão e concentração relativa) estão relacionados à maior variância percentual explicada para os dados de deconvolução (PARAFAC). Isto sugere que essa espécie, a mais abundante, deve ser a mais estável no referido meio. É preciso lembrar que o planejamento experimental (TAB. III.3.1) contemplou a presença de KNO_3 numa concentração fixa (equivalente ao meio fisiológico), para verificar possível influência do sal neste sistema.

A segunda espécie química cetônica (Ceto-II, FIG. IV.3.4, segundo os dados experimentais deconvoluídos) pode ser atribuída, em princípio, a qualquer uma das outras espécies do PRX-ceto (FIG. IV.2.1-e e FIG. IV.2.5). De acordo com os resultados dos cálculos semi-empíricos, todos os outros confômeros (excetuando-se o PRX-ceto-a) podem ser interconvertidos entre si por apresentar barreiras de potencial inferior a 5,0kcal/mol. A estrutura mais estável encontrada (depois da PRX-ceto-a) é a correspondente ao PRX-ceto-b. Contudo, embora as diferenças de energia entre elas sejam muito pequenas uma delas apresenta uma característica que pode ser utilizada para distingui-la das demais: o número de interações do tipo pontes de hidrogênio intramolecular (TAB. IV.2.1). A estrutura, dentre essas três, que possui o maior número dessas interações é a PRX-ceto-c. Por essa razão deve apresentar maior rigidez. Alguns estudos (Mordzimski e Grellmann (1986), Laerner *et al* (1988), Grabowska *et al* (1991), Yoon *et al* (1992) e Lavtchieva *et al* (1993)) demonstram que mesmo a molécula não possuindo um estrutura completamente planar pode apresentar emissão fluorescente em função da possibilidade de formação de pontes de hidrogênio intramolecular, o que torna a estrutura mais rígida.

A seguir serão destacados outros pontos relacionados às discussões feitas e que poderiam suscitar alguma dúvida quanto às conclusões apresentadas. Alguns deles servirão para afirmar essas conclusões e outros necessitam de estudos mais específicos com a utilização de outras técnicas:

- i) modificações observadas nos resultados dos conjuntos X-beta e X-gama, discutidas em termos da formação de complexos entre as diferentes espécies de PRX e as ciclodextrinas, provocando alterações nos equilíbrios e conseqüentemente na quantidade das mesmas. Poder-se-ia supor que essas alterações fossem devidas exclusivamente à presença das hidroxilas no meio (favorecendo, por exemplo, o fenômeno $\text{TI}_{\text{ar}}\text{PEE}$) e não à formação de complexos de inclusão que auxiliam o fenômeno, pois a concentração das CD's é muito superior à de PRX (entre 1.500 a 15.000 vezes). Como a α -CD possui 18 hidroxilas, β -CD 21 e γ -CD 24, a quantidade total das hidroxilas no meio é efetivamente ainda maior. Entretanto, os resultados do conjunto X-alfa são patentes no sentido de que somente a presença dessas hidroxilas não é su-

ficiente para provocar as modificações observadas. Caso contrário verificar-se-ia a presença do Enol para esse conjunto, o que não foi constatado. Outras informações advindas da literatura (Bergeron (1977), Hoshino *et al* (1981), Yorozu *et al* (1982), Hamai (1989), Zung *et al* (1990), Hansen *et al* (1992), Cho *et al* (1993), Park *et al* (1994), Sarkar *et al* (1995), Kim *et al* (1996) e Cho *et al* (1996)) confirmam o observado, sendo relatadas investigações sobre o efeito das ciclodextrinas nos comportamentos espectroscópicos de diversas substâncias que apresentam modificações significativas em seus espectros de excitação-emissão em função do meio em que se encontram.

- ii) comparando os espectros de excitação e de emissão da espécie Ceto-II em todos os conjuntos (Q, X-alfa e X-beta (FIG. IV.3.4-6)) verifica-se que eles sofrem deslocamentos para o azul indicando que esta espécie tem os correspondentes níveis de energia desestabilizados em função da presença da α -CD para o conjunto X-alfa e do aumento da cavidade da ciclodextrina para o conjunto X-beta. Isso sugere que essa espécie consegue perceber pequenas alterações na polaridade do meio, pois a presença das ciclodextrinas altera essa propriedade em função da enorme quantidade de hidroxilas que possuem. Há informações acerca dos efeitos do solvente sobre equilíbrios ceto-enólicos de vários compostos na literatura (Powling e Bernstein (1951), Burdett e Rogers (1963), Allen e Dwek (1966), Spencer *et al* (1981), Svoboda *et al* (1983), Mills e Beak (1985), Alberghina *et al* (1985), Almdal *et al* (1986), Lahmani *et al* (1990)). Elas indicam que em função da disponibilidade de prótons e/ou da polaridade do solvente os equilíbrios são influenciados de maneira que somente uma espécie química pode ser detectada pelas técnicas disponíveis.
- iii) informações disponíveis na literatura sobre a forma "zwitterion" são limitadas. Entretanto, um dado interessante é que embora houvesse certa quantidade de KNO_3 no meio (0,09%), que poderia favorecer sua formação, a sua concentração relativa nos conjuntos Q e X-alfa foi pequena (maior que a quantidade do Enol somente no conjunto Q). Isso indica que o equilíbrio que leva à formação do "zwitterion" é pouco afetado nas condições experimentais; portanto, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer esta questão.
- iv) para todos os conjuntos do planejamento (X-alfa, X-beta e X-gama) houve uma tendência com relação à presença do oxigênio, isto é, para todas as amostras em que a quantidade desse gás esteve presente no nível maior, segundo o planejamento experimental (TAB.III.3.1 e FIG. IV.3.9); a quantidade relativa das espécies cetônicas I e II (FIG. IV.3.5-c a FIG. IV.3.7-c) é menor. Esse fato sugere que ou o oxigênio tem influência sobre os fenômenos de complexação dessas espécies ou atua somente como agente supressor diminuindo o rendimento quântico de fluorescência dessas espécies. A este respeito também são necessários outros estudos.

- v) algumas diferenças observadas no formato das bandas de emissão do "zwitterion" nos diferentes conjuntos de dados (FIG. IV.3.4-b e FIG. IV.3.5-b) podem estar relacionadas aos fenômenos de inclusão e ao ajuste dos modelos nos processos de deconvolução espectral. Portanto, algumas explicações para essas observações precisam de critérios bem definidos caso contrário pode-se cair em erros de interpretação.
- vi) construção dos modelos para os diferentes conjuntos analisados, isto é, para alguns conjuntos de dados pode ocorrer que dois componentes de um modelo construído sejam necessários para explicar a variância dos dados de uma única espécie química. Esta dúvida poderia surgir também em relação aos resultados obtidos na deconvolução espectral dos dados analisados neste trabalho. Um exemplo disso são os resultados correspondentes às espécies Ceto-I e Ceto-II. Segundo a atribuição feita, cada um desses componentes do modelo corresponde às referidas espécies. Mas poderia haver dúvidas se na verdade esses dois componentes do modelo não estariam explicando a variância de somente um componente químico. Essa dúvida é sanada ao se lembrar que o Ceto-I apresenta um comportamento aproximadamente constante em todos os conjuntos estudados (Q, X-alfa, X-beta e X-gama, FIG. IV.3.4-7) relativamente à posição das bandas de emissão e de excitação e o Ceto-II um comportamento diferente, estando ausente num dos conjuntos (X-gama) e com alteração nas posições das bandas de excitação-emissão.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Os objetivos desta Tese foram: a) preparar e caracterizar o complexo PRX- β -CD por meio de algumas técnicas como DSC, TGA, difração de raios-X e MEV; b) utilizar as ciclodextrinas como ferramentas no entendimento dos processos fotofísicos do PRX; c) estudar a fotofísica do PRX em meio hidrofóbico e em meio hidrofílico na presença de ciclodextrinas auxiliado com os resultados obtidos via cálculo semi-empírico (MOPAC/AM1) comparando os resultados teóricos com os experimentais e fazendo inferências sobre as interações soluto-solvente; d) a utilização de planejamento fatorial para desenhar um dos experimentos; e) utilizar um dos métodos de tratamentos de dados multivariados (PARAFAC) para tratar e auxiliar na interpretação dos resultados; f) fazer atribuições das bandas de excitação-emissão (obtidas experimentalmente) às prováveis espécies da droga conseguidas via cálculo semi-empírico. Pode-se dizer que estes objetivos foram alcançados.

Diversas estruturas conformacionais do PRX foram obtidas com o pacote computacional MOPAC/AM1 e para a maioria dessas foram propostos determinados comportamentos espectroscópicos concordantes com informações da literatura. Algumas dessas foram utilizadas em um planejamento experimental pois quaisquer dados disponíveis sobre o sistema devem, a princípio, serem considerados antes de realizar outros estudos. Pôde-se verificar neste trabalho que com o crescente avanço de novas metodologias para a aquisição de dados e com novas ferramentas para o tratamento dessas informações, sistemas cada vez mais complexos poderão ser estudados.

Os resultados obtidos via cálculo semi-empírico foram úteis nas interpretações das atribuições das bandas de excitação-emissão das diversas espécies químicas da droga. Parte desses resultados concordam com os de outros autores pois, neste trabalho, foi obtida uma análise conformacional completa para duas espécies químicas do PRX, a enólica e a cetônica. Constata-se, mais uma vez, a potencialidade desses métodos no auxílio às interpretações de comportamentos espectroscópicos de moléculas orgânicas.

A quantidade de dados obtidos na Seção IV.3 (ESTUDO FOTOFÍSICO DO PIROXICAM EM MEIO HIDROFÍLICO EM PRESENÇA DE CICLODEXTRINAS) foi grande, permitindo verificar a potencialidade do PARAFAC como método de deconvolução espectral. Sem ele a interpretação dos dados seria difícil e maiores as chances de erro. Pôde-se observar, também, que embora este método seja potente, principalmente para dados de fluorescência, pode ocorrer problemas de ajuste de modelo. Isto é esperado, pois cada sistema apresenta um comportamento distinto e, em alguns casos, tratamentos mais específicos são exigidos para que os resultados sejam melhores.

Na introdução da Tese foi feita alusão aos efeitos colaterais do PRX, ou seja, a fotolergia e/ou fototoxicidade. Como se observou a molécula desta substância pode apresentar várias conformações dependendo da polaridade do meio, da concentração da droga e do grau de organização (presença de ciclodextrinas). Algumas das espécies químicas propostas apresentam comportamentos diferentes em função das modificações destas variáveis;

logo, correlações poderiam ser feitas entre estes comportamentos e os referidos efeitos colaterais. Embora este não tenha sido um dos objetivos desta Tese, algumas pistas podem levantadas para estudos futuros mais específicos quanto a este assunto.

Graças à complexidade do sistema é que se pôde aplicar as ferramentas teóricas MOPAC/AM1 e PARAFAC, pois à medida que as dificuldades de interpretação dos resultados foram aparecendo é que se foi buscando alternativas e, conseqüentemente, sendo encontradas algumas soluções. Entretanto, mais estudos são necessários para aprofundar os conhecimentos sobre o comportamento fotofísico/fotoquímico do Piroxicam.

CAPÍTULO VI

ESTUDOS FUTUROS

A seguir serão enumerados alguns pontos que poderiam ser estudados dando continuidade à investigação do comportamento do PRX com conseqüente aprofundamento nos conhecimentos já adquiridos.

- i) O sal do PRX pode ser investigado via RMN ^1H , em água deuterada, na presença das três diferentes ciclodextrinas, objetivando verificar a formação de complexos com alguns dos prováveis confôrmeros sugeridos nesta Tese.
- ii) Algumas superfícies de respostas podem ser construídas utilizando-se os dados obtidos no ESTUDO FOTOFÍSICO DO PIROXICAM EM MEIO HIDROFÍLICO EM PRESENÇA DE CICLODEXTRINAS com o auxílio do planejamento experimental cúbico de face centrada com uma amostra central (FIG. III.3.1). Provavelmente algumas interpretações sobre os efeitos provocados pelas variáveis consideradas seriam facilitadas.
- iii) Como a Tese abordou os aspectos fotofísicos do sistema e sabendo-se que a droga pode ser fotodegradada, outros estudos podem ser feitos a respeito do comportamento fotoquímico do PRX, empregando o planejamento cúbico de face centrada.
- iv) Como o método de deconvolução espectral (PARAFAC) utilizado neste trabalho auxiliou enormemente na interpretação dos resultados, o mesmo pode ser utilizado na investigação de sistemas semelhantes – outras drogas que podem apresentar diversos equilíbrios como o PRX – e em outros sistemas compostos de várias substâncias, cada qual com padrões bem definidos nos seus espectros de excitação-emissão.
- v) Os dados experimentais obtidos no estudo fotofísico do PRX em meios com diferentes polaridades (CAP. III.2) podem ser tratados via PARAFAC (ou métodos semelhantes) com o intuito de obter mais informações sobre o sistema, como por exemplo, correlações entre a polaridade do meio e o comportamento espectroscópico da droga.
- vi) Outras técnicas experimentais poderiam ser utilizadas para a determinação dos possíveis confôrmeros do PRX, tais como RMN de ^1H ou ^{13}C ou ainda RMN bidimensional com variação de temperatura. Assim, os resultados obtidos dos cálculos semiempíricos poderiam ser interpretados com o auxílio destas técnicas para dar mais subsídios às conclusões.
- vii) Métodos *ab initio* poderiam ser utilizados para a obtenção da energia total dos confôrmeros encontrados via MOPAC/AM1 para que os mesmos pudessem ser utilizados na interpretação dos resultados experimentais de excitação-emissão e servir como suporte das conclusões nessa parte do trabalho.

- viii) Utilizando métodos semi-empíricos de cálculos de espectros moleculares, como o ZINDO/S, outras informações poderiam ser obtidas sobre os níveis energéticos de cada estrutura conformacional encontrada para que os mesmos auxiliassem na interpretação dos resultados experimentais de excitação-emissão.
- ix) Com resultados provenientes dos cálculos semi-empíricos (MOPAC/AM1), algumas correlações poderiam ser encontradas entre os dados teóricos e os experimentais empregando os métodos de tratamento de dados de ordem superior (PARAFAC), como por exemplo, entre as energias do HOMO e LUMO de todos os conformeros com as superfícies de emissão total.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXO I – ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO

Podem-se encontrar muitos livros textos que abordam as técnicas espectroscopia de absorção e de emissão. Portanto, o objetivo deste ANEXO é de apresentar resumidamente alguns aspectos sobre o assunto para facilitar o entendimento daqueles que não estão acostumados com a terminologia espectroscópica.

Uma das definições de espectroscopia é: a medida de absorção ou emissão de luz por determinados cromóforos em função da energia. A medida dessa quantidade é conhecida como espectros de absorção ou emissão e fornecem dados sobre os níveis de energia no estado excitado e fundamental. Por meio de interpretações teóricas desses níveis os físicos e químicos podem estudar a estrutura dos átomos e moléculas

Algumas definições devem ser lembradas:

- i) cromóforo: tem a propriedade de absorver e/ou emitir luz e pode ser constituído por íons, moléculas ou parte de moléculas. Os cromóforos podem ter desde a dimensão de um único íon como, por exemplo, o CrO_3^- ou I_3^- , até a dimensão de uma molécula, constituída por inúmeros átomos formado por vários anéis aromáticos unidos entre si como, por exemplo, o antraceno, o fenantreno, o pirileno, etc.;
- ii) fluoróforo: são os cromóforos que emitem luz numa quantidade detectável.

Pode ocorrer que em grandes moléculas somente uma pequena parte tenha a propriedade de absorver e/ou emitir luz, dentro de um intervalo espectral mais ou menos fixo. Este pode variar em função da estrutura molecular – geométrica e conformacional – e de determinadas interações com o meio. Como numa molécula podem existir vários grupos cromóforos e fluoróforos, cada qual com propriedades mais ou menos distintas, há possibilidade de que um grupo cromóforo absorva luz e outro emita, pois quando um cromóforo absorve luz toda a molécula tem sua energia alterada.

Observa-se na TAB. A.I.1 os tipos de espectroscopia molecular. O intervalo espectral abordado neste trabalho vai desde 10^3 a 10^5cm^{-1} mas é mais comum encontrar trabalhos que representem esse mesmo intervalo em nm, ou seja, de 200 a 800nm, aproximadamente.

A energia de uma molécula pode ser expressa como a soma das contribuições das energias eletrônicas, vibracionais e rotacionais (EQ. A.I.1). Embora seja uma aproximação esta equação pode explicar muitos comportamentos observados nos espectros moleculares.

$$E = E_{\text{elet}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} \quad \text{Equação - A.I.1}$$

TABELA – A.I.1
Tipos de espectros ópticos (Moore (1976)).

Tipo de espectroscopia	Intervalos de energia			Tipo de energia molecular	Informação obtida
	Frequência (Hz)	(cm ⁻¹)	kJ.mol ⁻¹		
Microondas	10 ⁹ - 10 ¹¹	0,03 – 3	4.10 ⁻⁴ – 4.10 ⁻²	Rotação de moléculas	Distâncias interatômicas, momentos dipolares, interações nucleares
Infravermelho longínquo	10 ¹¹ - 10 ¹³	3 – 300	4.10 ⁻² – 4	Rotação de moléculas leves, vibrações de moléculas pesadas	Distâncias interatômicas, constantes de força de ligações
Infravermelho	10 ¹³ - 10 ¹⁴	300 – 3000	4 - 40	Vibrações de moléculas leves, vibração rotação de moléculas pesadas	Distâncias interatômicas, constantes de força de ligações, distribuições de cargas em moléculas
Raman	10 ¹¹ - 10 ¹⁴	3 – 3000	4.10 ⁻² - 40	Rotação pura ou vibração-rotação	Distâncias interatômicas, constantes de força de ligações
Visível e ultravioleta	10 ¹⁴ - 10 ¹⁶	3.10 ³ – 3.10 ⁵	40 – 4000	Transições eletrônicas	Todas as propriedades acima e mais energias de dissociação

As moléculas podem sofrer modificação em seus níveis de energia de duas maneiras diferentes além daquelas associadas às transições eletrônicas: a) através de variações na energia vibracional de seus núcleos; b) através da energia rotacional. Todas estas são quantizadas de modo que a molécula só pode existir em certos níveis discretos. A separação destas, como colocada na EQ. A.I.1, não é estritamente correta e os termos separados nesta equação é na verdade a aproximação de Born-Oppenheimer. *“Uma molécula estável consiste em elétrons em movimento rápido em torno de um certo número de núcleos, enquanto esses próprios núcleos executam um movimento oscilatório, mais pesado, em torno de suas posições médias”*. As energias vibracionais e rotacionais também não podem ser estritamente separadas uma da outra, porque os átomos, numa molécula em rápida rotação,

são forçados a se separar por força centrífuga, que desta maneira afetam o caráter das vibrações.

As separações entre os níveis de energia eletrônicos são, geralmente, muito maiores que aquelas entre os níveis de energia vibracionais, que, por sua vez, são muito maiores que aquelas dos níveis rotacionais. A FIG. A.I.1 mostra um diagrama de níveis de energia que retrata vários estados eletrônicos de uma molécula simples, e os processos fotofísicos unimoleculares que podem ocorrer. Associado a cada nível eletrônico existe um conjunto de níveis vibracionais e, a cada um destes, um conjunto de níveis rotacionais. A estrutura de bandas dos espectros moleculares se deve às diferenças de energia muito pequena entre os sucessivos níveis rotacionais. A FIG. A.I.2 apresenta uma parte do diagrama, acima mencionado, ampliado, onde se pode observar alguns níveis vibracionais do estado fundamental S_0 e alguns níveis rotacionais do nível vibracional S_0v_1 de uma molécula simples. Processos unimoleculares são, geralmente, estudados com moléculas isoladas, no estado de vapor a baixa pressão, ou, então, em soluções diluídas num meio transparente, isto é, num meio não absorvente.

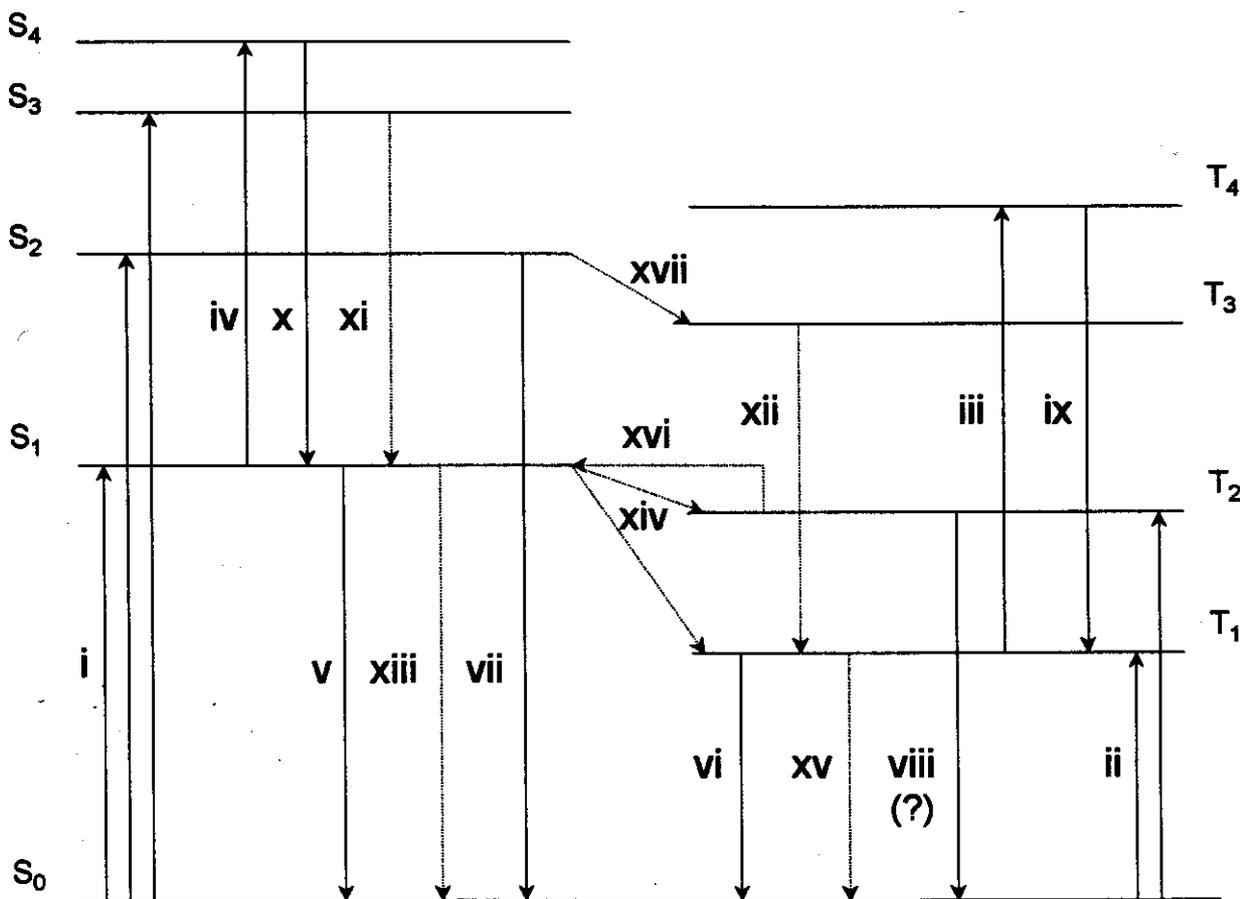


FIGURA – A.I.1 – Processos fotofísicos unimoleculares. Linhas sólidas: transições radiativas; linhas tracejadas: transições não radiativas (Birks (1970)).

- (i) $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_p$: absorções permitidas por spin, correspondem aos espectros eletrônicos de absorção.

- (ii) $S_0 \rightarrow T_1$ e $S_0 \rightarrow T_q$: absorções proibidas por spin, mas podem ser observadas pela utilização de fontes de luz muito intensas, ou por métodos de perturbação.
- (iii) $T_1 \rightarrow T_q$: absorção comumente observada por fotólise de "flash". T_1 é populado por cruzamento intersistemas de S_1 , que é excitado inicialmente por luz muito intensa. A absorção transiente é observada durante o tempo de vida do estado T_1 .
- (iv) $S_1 \rightarrow S_p$: absorção observada por fotólise de "flash". S_1 é populado por luz muito intensa de tempo de vida muito curto, e a absorção transiente é observada durante o tempo de vida do estado S_1 .
- (v) $S_1 \rightarrow S_0$: fluorescência de curta duração ($\sim 1 - 10^3$ ns) corresponde a fluorescência normal de emissão.
- (vi) $T_1 \rightarrow S_0$: fosforescência, que geralmente ocorre com um tempo de vida da ordem de ~ 1 a 10^4 ms, devido à transição proibida por spin.
- (vii) $S_p \rightarrow S_0$: fluorescência, observada em poucos compostos.
- (viii) $T_q \rightarrow S_0$: fosforescência, reportada para poucos compostos e é um processo muito pouco provável.
- (ix) $T_q \rightarrow T_1$: fluorescência, correspondendo ao inverso da absorção $T_1 \rightarrow T_q$ (iii), reportada para o azuleno e naftaleno.
- (x) $S_p \rightarrow S_1$: fluorescência, o inverso do processo (iv).
- (xi) $S_2 \rightarrow S_1$ e $S_p \rightarrow S_{p-1}$: conversão interna que ocorre usualmente muito rápida e, desse modo, muitas moléculas não apresentam emissão fluorescente $S_p \rightarrow S_0$.
- (xii) $T_2 \rightarrow T_1$ e $T_q \rightarrow T_{q-1}$: conversão interna usualmente muito rápida, dificultando o processo de fosforescência $T_q \rightarrow S_0$.
- (xiii) $S_1 \rightarrow S_0$: conversão interna para o estado fundamental.
- (xiv) $S_1 \rightarrow T_1$ e $S_1 \rightarrow T_q$: cruzamento intersistemas e supressão interna, que compete com o processo normal de fluorescência (v).
- (xv) $T_1 \rightarrow S_0$: cruzamento intersistemas que compete com o processo normal de fosforescência (vi).
- (xvi) $T_1 \rightarrow S_1$: cruzamento intersistemas que pode ocorrer por ativação térmica do estado T_1 , durante o tempo de vida desse estado excitado, a um nível isoenergético em S_1 . Esse processo leva a emissão denominada de emissão atrasada do tipo E, que apresenta o mesmo espectro de fluorescência normal (v), mas com características de temperatura e tempo de vida diferentes.
- (xvii) $S_p \rightarrow T_q$: cruzamento intersistemas de um estado excitado singlete para um estado excitado triplete, observado para alguns compostos.

Os espectros na região do visível e ultravioleta são devidos às transições entre diferentes níveis de energia eletrônicos. Os espectros na região do infravermelho (300 a 3000 cm^{-1}) são originados pelas transições entre níveis de energia vibracionais e são denominados de espectros vibracionais-rotacionais. As transições entre os níveis de energia rotacionais dão origem aos espectros rotacionais puros e ocorrem no infravermelho longínquo ($3 - 300$ cm^{-1} TAB. A.I.1).

Um processo fotofísico pode ser definido como um processo físico (em que não ocorrem mudanças químicas) resultado de excitação eletrônica de uma molécula ou sistema de moléculas por radiação eletromagnética.

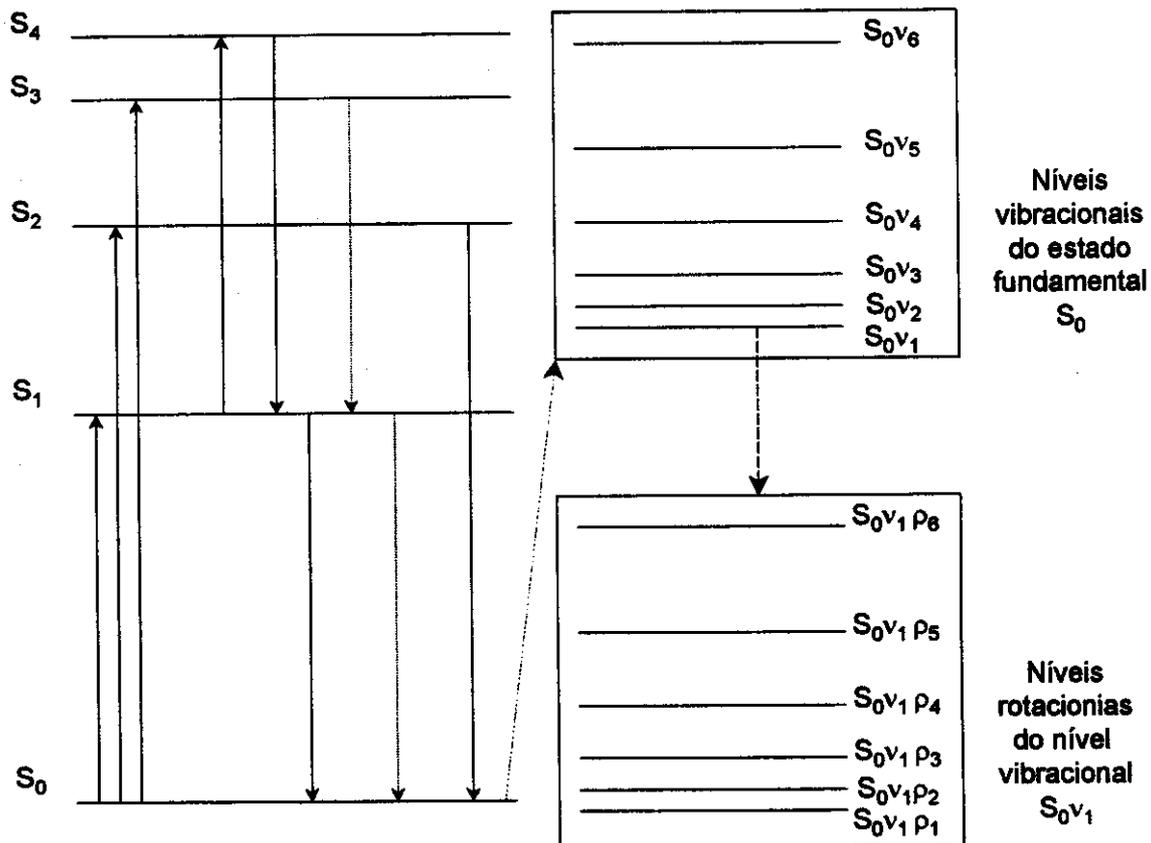


FIGURA – A.1.2 – Processos fotofísicos unimoleculares com alguns níveis vibracionais do estado fundamental \$S_0\$ e alguns níveis rotacionais do nível vibracional \$S_0v_1\$.

Quando luz incide sobre um sistema macroscópico, ela pode ser refletida, transmitida, refratada e espalhada ou absorvida. A fração de luz incidente absorvida depende da espessura da amostra. A lei de absorção, originalmente enunciada em 1729 por P. Bouguer, que foi posteriormente redescoberta por Lambert, pode ser expressa como

$$-dI/I = bdx \quad \text{Equação A.1.2}$$

onde \$I\$ é a intensidade da luz na distância \$x\$ de sua entrada no meio e \$b\$ é o coeficiente de absorção. Integrando-se a EQ. A.1.2 com a condição de contorno \$I = I_0\$ para \$x = 0\$, tem-se

$$I = I_0 e^{-bx} \quad \text{Equação A.1.3}$$

Assim,

$$\ln I/I_0 = \ln T = -bx \quad \text{Equação A.1.4}$$

onde T é a transmitância interna.

Os que trabalham neste campo preferem usar logaritmos decimais, de modo que também se define

$$\log I/I_0 = \log T = -ax \quad \text{Equação A.1.5}$$

Sendo a o coeficiente de absorção (linear). Quando se diz apenas coeficiente de absorção, subentende-se esta quantidade.

Em 1852, Beer mostrou que, para muitas soluções de compostos absorventes em solventes praticamente transparentes, o coeficiente a é proporcional à concentração do soluto c . Assim, a lei de Beer é

$$\log I/I_0 = -\epsilon cX \quad \text{Equação A.1.6}$$

sendo c a concentração em mol.L⁻¹ e ϵ , o coeficiente de absorção molar. Essas leis da absorção são as bases para vários métodos espectrofotométricos de análise e são obedecidas estritamente apenas para luz monocromática.

Teoricamente pode-se representar as transições eletrônicas de um sistema por diagramas de energia potencial. A FIG. A.1.3 mostra um destes para uma molécula simples. A curva A representa o estado fundamental. A curva B representa o estado excitado com um mínimo de energia, de modo que a molécula é estável mesmo no estado excitado, ou seja, não sofre dissociação devido à excitação. A curva C representa um estado excitado sem um mínimo de energia, indicando que a molécula é instável nesse estado.

Uma transição do estado fundamental a um estado excitado instável será seguida imediatamente pela dissociação da molécula. Tais transições originam uma banda de absorção contínua. Transições entre diferentes níveis vibracionais de dois estados eletrônicos estáveis também conduzem a bandas no espectro, mas, neste caso, a banda pode ser analisada em termos de linhas densamente empacotadas, cada uma delas correspondente a uma transição entre níveis rotacionais e vibracionais.

O princípio de Franck-Condon estabelece que, devido ao tempo requerido para uma transição eletrônica ser desprezível comparado com o movimento nuclear, é muito provável que a transição vibrônica, entre os diferentes estados eletrônicos, seja uma que não envolva

mudança nas coordenadas nucleares. Essa transição, que é denominada de máximo de Franck-Condon, representa uma transição vertical na curva de energia potencial (FIG. A.1.3).

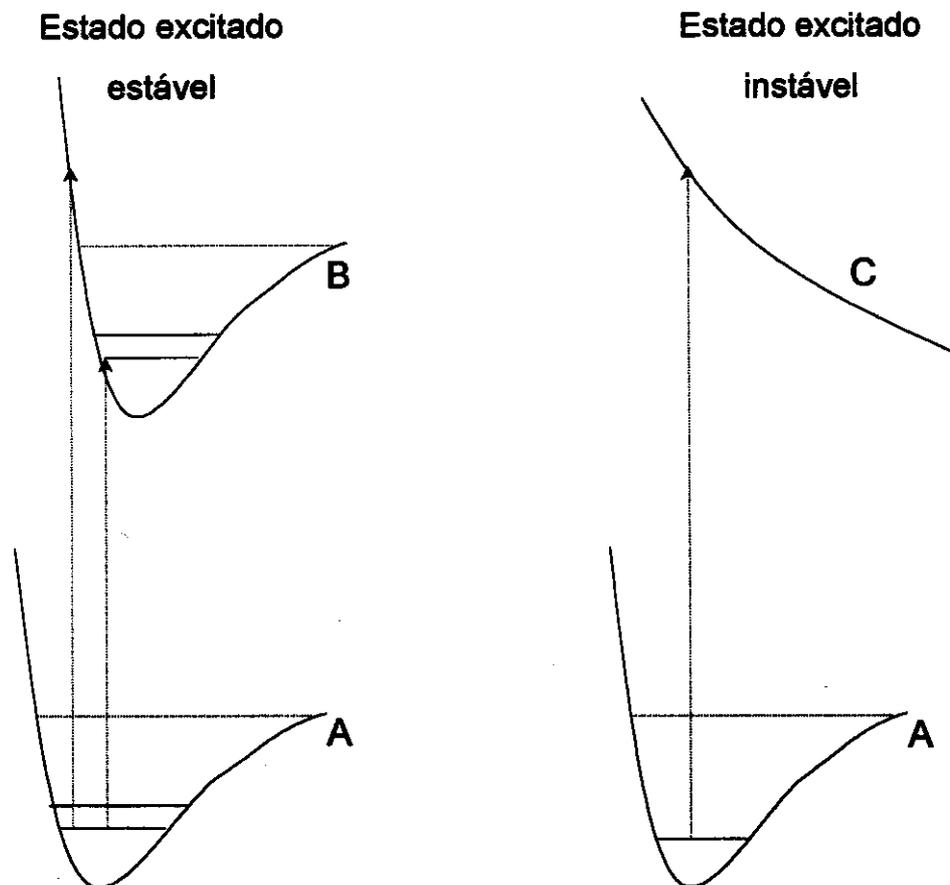


FIGURA A.1.3 – Diagramas de energia potencial de moléculas no estado excitado e no estado fundamental com a transição de Franck-Condon (Moore (1976)).

Em termos de mecânica quântica, o máximo de Franck-Condon corresponde a uma sobreposição máxima entre as funções de onda de um nível vibrônico do estado fundamental com outro do estado excitado.

O conjunto de bandas vibrônicas em uma banda de absorção é correspondente a um conjunto de transições de Franck-Condon. Isso aproxima a posição da banda vibrônica mais intensa de absorção. Se a última transição é a $0 \rightarrow 0$, como na transição $S_0 \rightarrow S_1$ de muitos hidrocarbonetos aromáticos a configuração média dos núcleos no estado excitado é similar àquela do estado fundamental. Em moléculas como o benzeno, onde a transição eletrônica pura é proibida por simetria, a banda $0 \rightarrow 0$ é ausente ou fraca, e deve ser ignorada no conjunto de transições de Franck-Condon. Para outras moléculas em que o máximo de Franck-Condon é deslocado relativamente à transição $0 \rightarrow 0$ a configuração nuclear média do estado excitado é diferente daquela do estado fundamental.

Informações sobre a configuração nuclear no estado eletrônico excitado podem ser obtidos pela análise da estrutura vibrônica das bandas de absorção. Em soluções fluidicas, à temperatura ambiente, a estrutura vibrônica das bandas de absorção $S_0 \rightarrow S_1$ de muitos compostos aromáticos são relativamente simples. Algumas moléculas apresentam estruturas vibrônicas na forma de dupletes ou mais complexas, devido a interações com o solvente.

Algumas informações da configuração nuclear no estado fundamental são obtidas das análises da estrutura vibrônica dos espectros de fluorescência. Em muitos casos esta é aproximadamente a imagem especular da banda de absorção $S_0 \rightarrow S_1$, indicando uma similaridade nas configurações nucleares nos dois estados, S_0 e S_1 .

A transição $S_1 \rightarrow S_0$, portanto a fluorescência, corresponde ao inverso da transição $S_0 \rightarrow S_1$, a absorção (FIG. A.I.1). Desde que o tempo de vida do estado excitado singlete S_1 seja suficientemente longo para que o equilíbrio térmico se estabeleça, a emissão fluorescente ocorre basicamente do nível vibracional de menor energia do estado S_1 . Essa condição é geralmente válida se a molécula está num meio condensado, como por exemplo, em solução, mas isso nem sempre é verdadeiro quando a amostra se encontra no estado de vapor, em que as moléculas não podem perder o excesso de energia vibracional por meio das colisões. Em solução o espectro de fluorescência corresponde às transições vibrônicas dos vários níveis vibracionais do estado excitado (S_1) para o fundamental (S_0).

Pode-se definir eficiência quântica de fluorescência molecular q_{FM} como a razão entre o número de fons emitidos por um sistema de moléculas, em uma solução diluída, pelo número de moléculas excitadas ao estado S_1 , ou seja, pelo número de fons absorvidos. O espectro de fluorescência molecular $F(\nu)$ é então definido como a intensidade relativa de fluorescência à frequência ν , normalizada pela relação

$$q_{FM} = \int_0^{\infty} F(\nu) d\nu \quad \text{Equação A.I.7}$$

A probabilidade, isto é, a intensidade quântica relativa, da transição vibrônica de fluorescência $u0 \rightarrow lm$ é dada pelo coeficiente A de Einstein,

$$A_{u0 \rightarrow lm} = 8\pi h \nu_{u0 \rightarrow lm}^3 n^3 c^{-3} B_{u0 \rightarrow lm} \quad \text{Equação A.I.8}$$

onde

$$B_{u0 \rightarrow lm} = K |M_{u0 \rightarrow lm}|^2 \quad \text{Equação A.I.9}$$

$$M_{u0 \rightarrow lm} = \int \Phi_{u0}^*(Q) M_{ul}(Q) \Phi_{ml}(Q) dQ \quad \text{Equação A.I.10}$$

$$= \langle \Phi_{u0} | M_{ul} | \Phi_{ml} \rangle \quad \text{Equação A.I.11}$$

Então,

$$A_{u0 \rightarrow lm} \propto \int F(\nu) d\nu \quad \text{Equação A.I.12}$$

onde a integral é feita no intervalo de $u0 \rightarrow lm$ para a banda vibrônica de fluorescência.

O tempo de vida radiativo τ_{FM} é definido como o recíproco da probabilidade radiativa de transição k_{FM} (em s^{-1}). k_{FM} é igual ao coeficiente A de Einstein somado sobre todo o espectro de fluorescência

$$\frac{1}{\tau_{FM}} = k_{FM} = A_{u0 \rightarrow l} = \sum_m A_{u0 \rightarrow lm} \quad \text{Equação A.I.13}$$

Dois tipos de condições de excitação, fotoestacionária e transiente, são comumente consideradas quando se discute fluorescência e processos fotofísicos. Seja uma solução diluída de uma espécie com concentração $[^1M]$, excitada ao estado S_1 fornecendo uma concentração $[^1M^*]$ da espécie no estado excitado correspondente. $^1M^*$ pode voltar para o estado fundamental radiativamente, por emissão de luz com uma constante k_{FM} , ou não radiativamente por supressão interna, com constante k_{IM} .

Na condição fotoestacionária a amostra é excitada com luz contínua de intensidade I_0 einstenios $l^{-1}s^{-1}$ ($= I_0[M]$ absorvem ftons s^{-1} ; o einstenio é uma unidade fotoquímica, equivalente a um número correspondente à constante de Avogadro de ftons). A EQ. A.I.13 para $[^1M^*]$ é então

$$\frac{d[^1M^*]}{dt} = I_0 - (k_{FM} + k_{IM})[^1M^*] \quad \text{Equação A.I.14}$$

Sob condições fotoestacionárias $d[^1M^*]/dt = 0$. A taxa de emissão fluorescente é $k_{FM}[^1M^*]$, e o rendimento quântico de fluorescência é

$$q_{FM} = \frac{k_{FM} [^1M^*]}{I_0} = \frac{k_{FM}}{k_{FM} + k_{IM}} \quad \text{Equação A.I.15}$$

Em condições transientes a excitação a $t = 0$ por um pulso de luz (em forma de uma função- δ) produz uma concentração inicial $[^1M^*]_0$ de moléculas excitadas. A função $i(t)$ de resposta de fluorescência de qualquer sistema molecular é definida como a intensidade de fluorescência a um tempo t , após uma excitação com um pulso de luz. Dessa forma a EQ. A.I.15 (a $t > 0$) é agora

$$\frac{d[^1M^*]}{dt} = -(k_{FM} + k_{IM})[^1M^*] \quad \text{Equação A.I.16}$$

tal que

$$i_M(t) = k_{FM} [^1M^*] / [^1M] \quad \text{Equação A.I.17}$$

$$= k_{FM} e^{-k_M t} = k_{FM} e^{-t/\tau_M} \quad \text{Equação A.I.18}$$

onde

$$\tau_M = 1/k_M = 1/(k_{FM} + k_{IM}) \quad \text{Equação A.I.19}$$

é definido como tempo de vida de fluorescência molecular. Integrando a intensidade de fluorescência, tem-se

$$q_{FM} = \int_0^{\infty} i_M(t) dt = k_{FM} / k_M \quad \text{Equação A.I.20}$$

Dessa maneira obtém-se

$$q_{FM} = \frac{k_{FM}}{k_{FM} + k_{IM}} = \frac{\tau_M}{\tau_{FM}} = \int_0^{\infty} F(\nu) d\nu \quad \text{Equação A.I.21}$$

Além dos processos unimoleculares, mencionados até agora (FIG. A.I.1) conhecem-se outros processos, os bimoleculares, que competem com a emissão fluorescente (e a supressão interna) em soluções, e, portanto, modificam as características fluorescentes do objeto em estudo. Dentre esses processos pode-se citar: a) supressão colisional de impurezas, b) supressão por transferência de energia, c) supressão por concentração e d) migração radiativa.

A supressão colisional por impurezas pode ocorrer quando moléculas de uma espécie Q, cuja concentração é [Q], colidem com a espécie excitada M*. O rendimento quântico de fluorescência é reduzido de q_{FM} (EQ. A.I.15) para

$$\Phi_{FM} = \frac{k_{FM}}{k_{FM} + k_{IM} + k_{QM}[Q]} = \frac{q_{FM}}{1 + \tau_M k_{QM}[Q]} \quad \text{Equação A.I.22}$$

e o tempo de vida fluorescente é reduzido do seu valor τ_M , (EQ. A.I.19) para

$$\tau = \frac{1}{k_{FM} + k_{IM} + k_{QM}[Q]} = \frac{\tau_M}{1 + \tau_M k_{QM}[Q]} \quad \text{Equação A.I.23}$$

A razão é

$$\tau/\Phi_{FM} = \tau_{FM}/q_{FM} = \tau_{FM} \quad \text{Equação A.I.24}$$

na ausência de Q.

O oxigênio, sendo um dos supressores mais comuns presente nos solventes alifáticos, pode causar inúmeros problemas em estudos de fluorescência. Isso pode ser resolvido pela eliminação desse supressor com borbulhamento de um gás que não contenha oxigênio (comumente o nitrogênio com elevado grau de pureza). A presença de oxigênio numa solução de benzeno em n-hexano chega a diminuir o tempo de vida desse de $\tau = 26$ para $\tau = 5,7$ ns, e o rendimento quântico de fluorescência por um fator semelhante de 4,5. Em com-

postos cujo tempo de vida de fluorescência é maior, a supressão causada pelo oxigênio é ainda mais pronunciada.

A supressão provocada por transferência de energia ocorre quando uma solução contém uma concentração $[Y]$ de uma certa impureza Y , cujas moléculas têm nível de energia do estado eletrônico excitado singlete S_{1Y} abaixo daquele correspondente $^1M^*$. Então, um outro tipo de supressão por impureza pode ocorrer, devido agora não mais a fatores de ordem colisional mas por transferência de energia não radiativa para Y . Em solução de baixa viscosidade e em alguns outros sistemas, como por exemplo em cristais aromáticos, a supressão de $^1M^*$ pode ser descrita por uma constante k_{YM} , de maneira similar à supressão provocada por colisão, de modo que o termo $(-k_{YM}[Y][^1M^*])$ é adicionado à EQ. A.I.14 e 15, obtendo-se:

$$\Phi_{FM} = \frac{k_{FM}}{k_{FM} + k_{IM} + k_{YM}[Y]} = \frac{q_{FM}}{1 + \tau_M k_{YM}[Y]} \quad \text{Equação A.I.25}$$

$$\tau = \frac{1}{k_{FM} + k_{IM} + k_{YM}[Y]} = \frac{\tau_M}{1 + \tau_M k_{YM}[Y]} \quad \text{Equação A.I.26}$$

e uma relação semelhante à EQ. A.I.24. Em soluções com viscosidade muito elevada k_{YM} é uma função do tempo t , e o decaimento fluorescente de $^1M^*$ apresenta um comportamento não exponencial.

A presença de dois tipos de impurezas que causam supressão enfatiza a necessidade de que todos os solventes e solutos utilizados em espectroscopia de fluorescência, tenham um grau de pureza muito elevado. Os solventes devem ter pureza espectroscópica, ou seja, não se deve detectar fluorescência nos solventes utilizados para esse fim, a menos que um solvente aromático fluorescente esteja sendo utilizado. Os solutos comercialmente disponíveis geralmente não têm a pureza necessária, logo, eles devem passar por processos de purificação como: destilação fracionada, recristalização e/ou por coluna cromatográfica, etc.. Algumas substâncias são quimicamente ativas, como por exemplo, o antraceno e alguns hidrocarbonetos poliaromáticos, devendo portanto, ser armazenadas em local escuro. O tempo de vida ou o rendimento quântico de fluorescência freqüentemente são utilizados como critério de pureza, justamente por serem muito sensíveis à presença de qualquer impureza no meio. Qualquer substância indesejável que apresente fluorescência e o estado eletrônico S_1 abaixo da espécie química sob investigação, pode ser detectada pela ocorrência de uma banda deslocada para o vermelho no espectro de emissão.

A supressão provocada pela concentração se deve ao aumento da concentração da espécie 1M , a espécie sob investigação, no rendimento quântico de fluorescência Φ_{FM} . Essa supressão se deve à formação de excímero, que é uma espécie formada no estado excitado durante o tempo de vida de 1M . Desde que os processos de colisão são controlados por difusão, eles podem ser descritos, numa primeira aproximação, por k_{DM} , resultando num termo adicional, $(-k_{DM}[^1M][^1M^*])$ na EQ. A.I.14 e 15

$$\Phi_{FM} \cong \frac{k_{FM}}{k_{FM} + k_{IM} + k_{DM}[^1M]} = \frac{q_{FM}}{1 + \tau_M k_{DM}[^1M]} \quad \text{Equação A.I.27}$$

$$\tau \cong \frac{1}{k_{FM} + k_{IM} + k_{DM}[^1M]} = \frac{\tau_M}{1 + \tau_M k_{DM}[^1M]} \quad \text{Equação A.I.28}$$

Há ainda a migração radiativa de energia que comumente ocorre quando há sobreposição entre as bandas de absorção e de emissão das espécies presentes no meio. Esse problema normalmente é evitado quando soluções muito diluídas são utilizadas ou quando a amostra é acomodada num recipiente de caminho óptico pequeno. Esse tipo de migração compete com a fluorescência normal e modifica tanto o rendimento quântico como o tempo de vida de fluorescência.

Considerando um sistema com rendimento quântico de fluorescência q_{FM} e tempo de vida τ_M , em que a é a probabilidade de auto absorção de um fóton emitido, tal que $(1-a)$ é a probabilidade de um fóton escapar desse meio os fotons que são absorvidos são reemitidos com uma eficiência quântica q_{FM} e tempo de vida τ_{FM} . O rendimento quântico de fluorescência efetivamente medido é dado por,

$$\Phi_{FM} = q_{FM} (1 - a)[1 + aq_{FM} + a^2q_{FM}^2 + \dots] \quad \text{Equação A.I.29}$$

$$= q_{FM}(1 - a)/(1-aq_{FM}) \quad \text{Equação A.I.30}$$

Os sucessivos termos na série correspondem à possibilidade de escape de um fóton após 1, 2, 3, ... emissões.

A auto-absorção diminui com a diminuição da concentração de $^1M^*$, portanto da EQ. A.I.16 tem-se

$$\frac{d[{}^1M^*]}{dt} = -\{(1-a)k_{FM} + k_{IM}\}[{}^1M^*] \quad \text{Equação A.I.31}$$

$$= -[{}^1M^*] / \tau \quad \text{Equação A.I.32}$$

desde que a excitação de $ak_{FM}[{}^1M^*]dt$ moléculas não escape. O tempo de vida efetivamente medido é diminuído de

$$\tau = \frac{1}{(1-a)k_{FM} + k_{IM}} \quad \text{Equação A.I.33}$$

$$= \frac{\tau_M}{1 - aq_{FM}} \quad \text{Equação A.I.34}$$

O parâmetro a em fenômenos de auto absorção depende da sobreposição dos espectros de absorção $\varepsilon(\nu)$ e de fluorescência $F(\nu)$, da concentração da espécie, $[M]$, e também do caminho, x , que o fóton deve percorrer através da solução sem ser absorvido. Em termos desses parâmetros

$$aq_{FM} = \int_0^{\infty} F(\nu) \{1 - 10^{-\varepsilon(\nu)[M]x}\} d\nu \quad \text{Equação A.I.35}$$

Na discussão feita acima, deve-se assumir que a é uma constante, independente do ponto de origem e direção da emissão do fóton. Essa suposição é razoavelmente válida quando a fluorescência é originada no centro de uma esfera, mas para excitações próximas à superfície de uma amostra, x (e também a) dependem se o fóton é emitido para o interior ou para fora do meio.

O efeito de auto absorção é menor quando a fluorescência é observada em reflexão, ou seja, na mesma superfície em que a amostra é excitada, quando comparada com a emissão que é observada pela transmissão, ou seja, em superfície diferente da qual ocorreu

a excitação. Entretanto, utilizando-se o primeiro método, alguns compostos com alto rendimento quântico de fluorescência apresentam erros acentuados.

Muitos estudos de fluorescência e absorção e outras propriedades fotofísicas de moléculas aromáticas são feitos em solução. Dessa forma a espécie absorvente ou o cromóforo são expostos à influência das moléculas vizinhas do solvente, que podem provocar modificações significativas em suas propriedades.

Moléculas isoladas podem ser estudadas no estado de vapor a baixa pressão. Alguns autores têm observado o efeito de gases nos espectros de fluorescência bem como no rendimento quântico Φ_{FM} de algumas substâncias aromáticas no estado de vapor. A menos que o gás não seja um supressor (oxigênio ou óxido nítrico), a presença dos mesmos aumenta o rendimento quântico de fluorescência, Φ_{FM} , devido à estabilização térmica do estado excitado das moléculas no estado excitado. Isso tem sido usado para estudar processos de transferência de energia vibracional durante as colisões.

Quando uma amostra em solução é excitada por luz contínua ou pulsada as espécies no estado excitado interagem de vários modos com moléculas do solvente, dependendo de suas polaridades, antes de retornar para o estado fundamental. As interações entre as espécies excitadas e o solvente são freqüentemente verificadas tanto pelas posições dos máximos e pelo formato das bandas de emissão como pelo tempo de vida do estado excitado.

Considerando as relações existentes entre a posição das bandas de emissão e as propriedades do solvente, há um tempo de relaxação, τ_R , para que as moléculas do solvente, próximas à espécie excitada, sofram rearranjo, e há também um tempo de vida da espécie excitada, τ_{FM} .

Em casos que $\tau_R \gg \tau_{FM}$ a emissão ocorrerá antes de qualquer rearranjo do solvente na camada de solvatação do soluto. O estado inicial do processo de emissão é o estado excitado e o estado final é o estado fundamental no equilíbrio. Portanto, o comprimento de onda de emissão será igual ao comprimento de onda correspondente à absorção. Entretanto, em casos onde $\tau_R \ll \tau_{FM}$ (conforme FIG. A.1.4) as moléculas do solvente têm tempo suficiente para se rearranjarem em torno da espécie excitada sendo estabelecida uma nova situação de equilíbrio. A fluorescência observada à temperatura ambiente é originada desse equilíbrio. Por analogia, há um estado fundamental após a emissão, que persiste momentaneamente até que as moléculas do solvente reorganizem-se ao redor da espécie no estado fundamental.

Uma explicação geral do efeito do solvente nos espectros de emissão pode ser dada da seguinte maneira: Se, por exemplo, a molécula fluorescente tem um momento de dipolo maior no estado excitado em comparação com aquele no estado fundamental, o fóton emitido terá muito menos energia que aquele absorvido quanto maior for a interação entre as

moléculas do soluto com o solvente; conseqüentemente, haverá um deslocamento da banda de fluorescência para o vermelho. Então, as bandas de emissão sofrem um deslocamento batocrômico com o aumento da polaridade do meio.

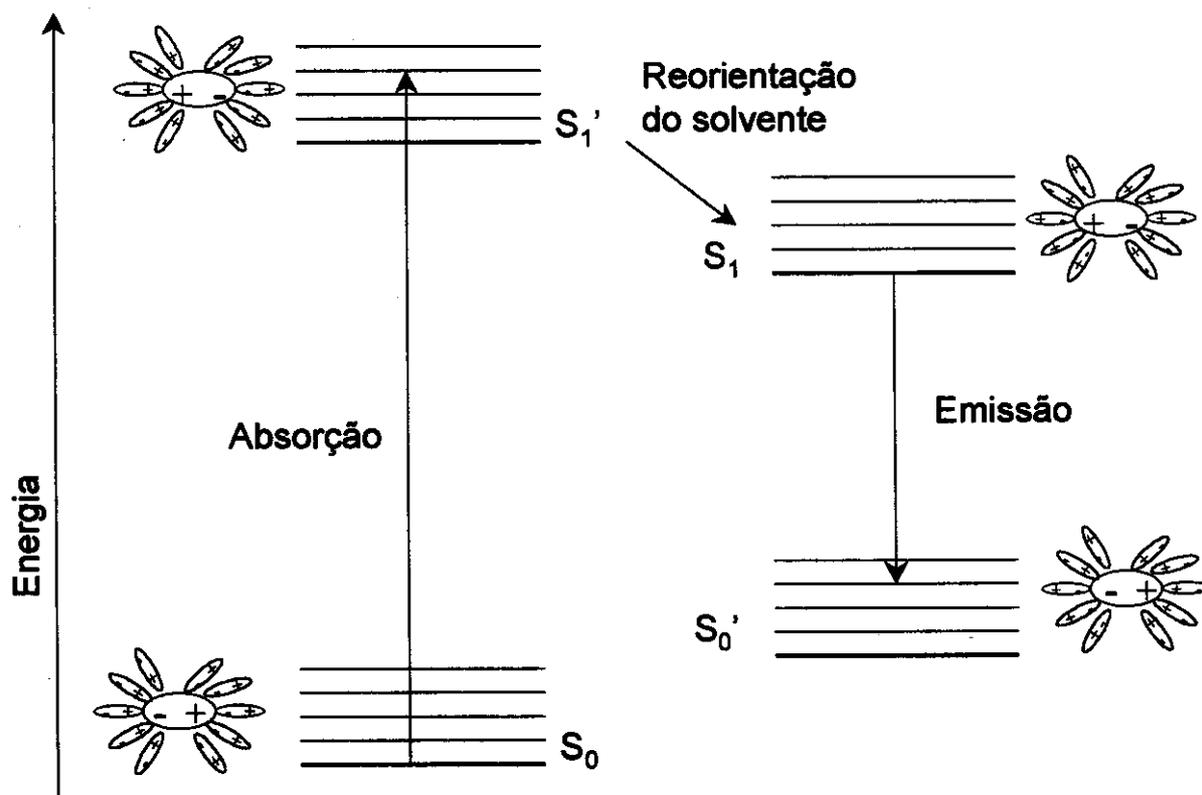


FIGURA A.1.4 – Efeito de reorientação das moléculas do solvente ao redor da espécie excitada. S_1' e S_0' são os estados de Franck-Condon excitado e fundamental, respectivamente; S_1 e S_0 são correspondente aos estados de equilíbrio; para $\tau_R \ll \tau_{FM}$ (Reichardt (1990)).

Um exemplo que ilustra esse efeito nos espectros de absorção e de emissão é dado pelo composto 7-amino-4-trifluorometilcumarina (FIG. A.1.5 e TAB. A.1.2). É importante observar o impedimento de movimentos de rotação no grupamento amino que é inerente à estrutura conformacional rígida desta molécula.

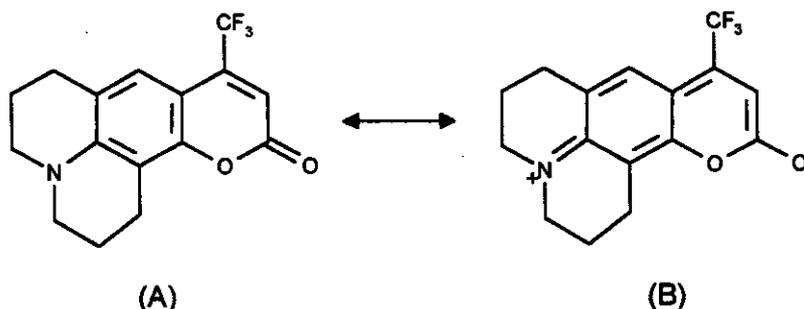


FIGURA A.1.5 – Estrutura molecular de 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Reichardt (1990)).

TABELA A.I.2

Deslocamento das bandas de absorção e emissão do composto 7-amino-4-trifluormetilcumarina (Reichardt (1990)).

SOLVENTE	$o\text{-C}_6\text{H}_{12}$	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	CH_3CN	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	H_2O	$\Delta\lambda$ (nm)
Absorção λ_{max} (nm)	393	409	418	421	430	+37
Emissão λ_{max} (nm)	455	501	521	531	549	+94

Com o aumento da polaridade do solvente ambas as bandas (absorção e emissão) sofrem deslocamento batocrômico, sendo mais pronunciado na banda de emissão. Isso indica um processo de transferência de carga intramolecular. A espécie A, de menor polaridade e predominante no estado fundamental, absorve luz e o processo de transferência ocorre, levando à formação da espécie (B), de maior polaridade. Aumentando a polaridade do solvente a espécie excitada, por ser mais polar, é mais estabilizada que a molécula no estado fundamental. Portanto, há um deslocamento para o vermelho do máximo de emissão.

O efeito da variação da polaridade do meio nos espectros de absorção e de fluorescência são mais ou menos pronunciados em função dessas interações, que dependem não somente da variação do momento de dipolo da espécie quando excitada mas, também, de fatores como a viscosidade do solvente, o tamanho da molécula do solvente relativamente ao do cromóforo, tempo de vida da espécie no estado excitado, a presença de grupo cromóforo na molécula excitada com mobilidade rotacional, a presença de grupos cromóforos aceptores e doadores de elétrons, etc..

ANEXO II – PARAFAC. UM MÉTODO MULTIDIMENSIONAL DE DECONVOLUÇÃO

Será dada aqui uma visão sucinta da metodologia PARAFAC (“Parallel Factor Analysis”) para tratamento de dados multidimensionais. Um resumo mais detalhado é apresentado por Bro (1997). Contudo, antes dessa introdução algumas definições se fazem necessárias tanto a respeito do método quanto da técnica utilizada para a coleta de dados, a fluorimetria. Embora no ANEXO I possa ser encontrado um resumo que trata da técnica com mais profundidade, será mostrado aqui, brevemente, a ligação entre a técnica e a metodologia para o tratamento dos dados.

Importante mencionar, neste ponto, alguns aspectos gerais a respeito dos métodos de decomposição multivariada. Stähle (1989) apresenta alguns aspectos da análise de dados trilineares e propõem um algoritmo para tratamento destes dados. Smilde (1992) aborda resumidamente várias metodologias de decomposição trilineares e a teoria básica envolvida, bem como algumas perspectivas futuras para a melhoria desses métodos e aplicações. A análise multivariada é particularmente interessante na manipulação de grandes quantidades de dados, desde que o problema para o qual os dados foram coletados apresentem natureza multivariada. Mitchell e Burdick (1993) propõem, sinteticamente, dois métodos para serem usados na resolução de problemas multidimensionais, dando especial enfoque ao PARAFAC no que tange à questão dos ruídos, mencionando que este método resolve bem inúmeros sistemas mesmo com a presença de dessas interferências. Burdick (1995) apresenta uma breve introdução à análise tensorial aplicada em dados de ordem superior a um, mostrando conceitos básicos de álgebra linear envolvidos nesses métodos, evitando abstrações que geralmente dificultam o entendimento para pessoas iniciantes. Bro (1996) estudou além dos problemas relativos à resolução espectral de misturas complexas, também a questão da calibração desses, ou seja, além da análise qualitativa simplesmente o autor mostrou a aplicação em análise quantitativa de grande interesse para quem estuda essas questões.

O PARAFAC é um método para tratamento de dados multidimensionais originário dos estudos realizados pelos psicometristas e vem ganhando mais e mais interesse de quimiometristas e outras áreas correlatas, por uma série de razões. Uma das principais é sua simplicidade e facilidade para estudar sistemas complexos.

Dados multidimensionais podem ser caracterizados por um conjunto de variáveis medidas que são agrupadas de modo ordenado. Por exemplo, os dados de fluorescência medidos em vários comprimentos de onda de excitação e monitorados em vários comprimentos de onda de emissão para várias amostras ou, então, o tempo de vida de fluorescência medido para vários comprimentos de onda de emissão e de excitação simultaneamente para uma série de amostras. Alguns desses agrupamentos resultarão em dados de terceira ordem, definidos na introdução deste trabalho, como por exemplo, um conjunto de dados,

correspondendo a uma matriz (superfície de emissão total ou luminescência total) coletada para cada amostra.

É importante neste ponto esclarecer o significado dos termos multidimensionais e multivariados. Todos os dados que são constituídos por mais de uma resposta para cada amostra podem ser classificados como dados multivariados. Os dados multidimensionais dependem, também, da forma como são gerados. Um exemplo torna o entendimento mais fácil: seja várias amostras com diferentes concentrações de um analito de interesse constituindo um sistema; este conjunto por si só (as amostras) constitui uma dimensão (da concentração); se para cada uma dessas amostras forem coletados uma única resposta têm-se dados univariados, mas se forem coletados várias respostas, como por exemplo espectro de excitação, têm-se dados multivariados. Entretanto, a concentração e os espectros de excitação podem ser classificados como dimensões independentes. Portanto, neste exemplo têm-se dados com duas dimensões. Mas se para cada um dos comprimentos de onda de excitação para cada amostra for registrado um espectro de emissão outra dimensão (emissão) é acrescentada ao conjunto de dados que passa a ter três dimensões: concentração-excitação-emissão; portanto, dados multidimensionais. Cada uma dessas dimensões pode receber a demoninação de "modo", o que será encontrado várias vezes nesta Tese. Segundo terminologia quimiométrica os dados multivariados são mais gerais que dados multidimensionais, compreendendo-se que dados multidimensionais são aqueles que possuem três dimensões ou mais (dados de segunda ordem ou superiores).

Leurgans e Ross (1992) trazem algumas das definições e nomenclaturas para os espectroscopistas não familiarizados com as terminologias comuns em quimiometria. Os autores introduzem o assunto na espectroscopia de modo claro e resumido.

A espectroscopia de interesse neste momento usa radiação eletromagnética correspondente à luz visível. Diferentes tipos de espectroscopia usam diferentes intervalos do espectro eletromagnético, no limite compreendido de 10^{-10} a 10^4 m. Um exemplo de espectroscopia que será tratada neste ANEXO, bem como neste trabalho, envolve a faixa de radiação eletromagnética do visível e ultravioleta (V/UV) entre 10^{-7} a 10^{-6} m, ou entre 220 e 800nm aproximadamente.

Uma amostra típica pode conter um número muito grande (10^{13} a 10^{16}) de cromóforos. O processo de absorção de luz pode ser quase inteiramente confinado a uma pequena parte da molécula, o cromóforo. Por exemplo, uma pequena proteína pode ser constituída por 100 amino ácidos ligados quimicamente; as proteínas são simples moléculas, mas para muitos propósitos, partes de amino ácidos individuais serão considerados como cromóforos independentes.

Quando um raio de luz incide em uma amostra, a intensidade de da radiação absorvida é

$$dI = -\sigma n I_x dx \quad \text{Equação A.II.1}$$

onde σ é a secção de choque de absorção em cm^2 , n é a densidade de cromóforos e I_x é a intensidade da luz a uma distância x na amostra.

Em aplicações comuns de espectroscopia em química, as amostras são soluções homogêneas de cromóforos confinadas em cubetas de comprimento L (usualmente 1cm). A integração de dI/I em EQ. A.II.1 com algumas mudanças nas unidades dará o que se conhece como lei de Beer.

$$A[\lambda] = -\log_{10}(I/I_0) = \varepsilon[\lambda]cL \quad \text{Equação A.II.2}$$

onde A é a absorbância, I/I_0 é a fração de intensidade de luz de comprimento de onda λ que passa pela solução, e c é a concentração dos cromóforos. A propriedade fundamental do cromóforo é o $\varepsilon[\lambda]$ (coeficiente de extinção molar), cuja unidade é $[\text{comprimento de onda} \cdot \text{concentração}]^{-1}$ e é equivalente à secção de choques.

A variável independente em espectroscopia é o comprimento de onda da radiação absorvida ou emitida. Um experimento pode envolver muitas variáveis adicionais independentes. Com múltiplos cromóforos f e comprimentos de onda i em diferentes concentrações j das espécies químicas, pode-se ter uma equação bilinear

$$A[i, j] = \sum_f \varepsilon_f [i] c_f [j] L \quad \text{Equação A.II.3}$$

onde $\varepsilon_f [i]$ é o coeficiente de extinção molar do cromóforo f no comprimento de onda λ_i e $c_f [j]$ é a concentração de f na circunstância j .

A absorção de luz coloca o cromóforo num estado excitado o qual perde energia extra e decai para o estado fundamental, usualmente num tempo de 10^{-9} s. Alguns decaimentos podem ser acompanhados por emissão de luz (fluorescência) e neste caso os cromóforos são chamados de fluoróforos.

Em espectroscopia de fluorescência, as amostras são iluminadas com luz de comprimento de onda λ_{ex} , e emitem luz com um comprimento de onda λ_{em} . A seqüência de

eventos que ocorrem durante um experimento desse gênero está esquematizada sucintamente na FIG. A.II.1.

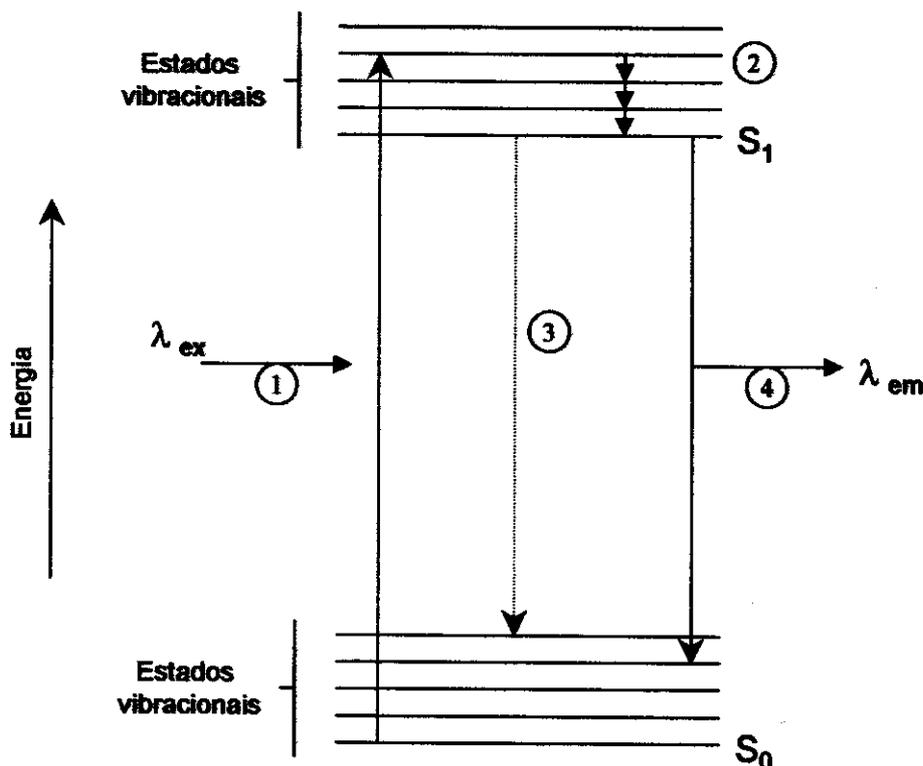


FIGURA A.II.1 – Representação esquemática sucinta de alguns processos fotofísicos que podem ocorrer com um fluoróforo. ①: Luz de comprimento de onda λ_{ex} é absorvida e um elétron é transferido de um orbital de menor energia para um de maior energia, o sistema passa do estado fundamental para o excitado. ②: Os núcleos atômicos se movimentam para encontrar a nova geometria mais estável no estado excitado. ③: Com probabilidade $(1 - \varphi)$ o elétron retorna, levando o sistema ao estado fundamental sem emissão de luz. ④: Com probabilidade de φ , o elétron retorna, levando o sistema ao estado fundamental com emissão de luz λ_{em} .

Caso a radiação usada para excitação esteja na região V/UV haverá excitação eletrônica, de modo que a geometria mais estável do cromóforo no estado excitado pode ser diferente daquela que o mesmo possuía no estado fundamental. Entretanto, como a absorção é muito rápida (10^{-15} s), os núcleos da molécula, sendo mais pesados que os elétrons, não têm tempo suficiente para se ajustarem à nova distribuição eletrônica. Em realidade esta readaptação dos núcleos ocorre na escala de tempo de picosegundos. As propriedades da espécie no estado excitado são independentes da maneira como a excitação foi feita, o mesmo ocorrendo com a probabilidade dos eventos posteriores.

Com múltiplos cromóforos, tem-se a seguinte equação trilinear

$$\mu[i, j, k] = \sum_f \epsilon_f [i] \pi_f [j] c_f [k] \tag{Equação A.II.4}$$

onde $c_f[k]$ é a concentração de cromóforos f na circunstância k , $\varepsilon_f[j]$ é a secção de choques de absorção, relativa do cromóforo f ao comprimento de onda λ_{ex} e $\pi_f[l]$ a intensidade de emissão, detectada no comprimento de onda λ_{em} . A equação EQ. A.II.4 corresponde na verdade ao modelo PARAFAC que será apresentado com mais detalhes logo a seguir.

Aplicações simples da EQ. A.II.4 requerem que as amostras sejam pequenas e que as excitações não sejam transferidas entre os cromóforos, ou seja, a absorção de um fóton por um cromóforo não leva à emissão de um fóton por outro cromóforo. Entretanto, não linearidades devido à absorbância podem ser corrigidas, e a energia transferida pode ser tratada com modelos multilineares diferentes. A primeira aplicação de um modelo trilinear à espectroscopia foi feita por Appellof e Davidson (1981), aplicando a EQ. A.II.4, com a eluição de uma amostra em uma coluna cromatográfica servindo para variar a concentração das espécies.

Há outros dois modos de expandir a EQ. A.II.4 para se obter uma variável independente. Uma expansão é especialmente importante se uma das três variáveis nesta equação é inefetiva. Por exemplo, a concentração relativa dos diferentes fluoróforos pode ser fixada, talvez porque eles sejam todos parte da mesma molécula.

O primeiro método para se obter uma variável independente é considerar que na amostra, de alguma maneira, a quantidade total de luz emitida originária dos fluoróforos seja diferente. De todas as excitações somente uma fração leva à luz emitida. Essa fração, φ , é o rendimento quântico de fluorescência. Outras excitações são perdidas via decaimentos não radiativos. Frequentemente, uma diminuição da fluorescência é provocada por outros tipos de decaimentos diferentes da emissão de luz. Uma substância química adicionada ao meio, por exemplo, pode provocar ou auxiliar esse decaimento. Essa substância é denominada supressor de fluorescência. Quanto maior é o tempo de vida da espécie no estado excitado maior é o tempo que a mesma possui para estabelecer o equilíbrio térmico dentro desse estado excitado, ou seja, maior é o tempo para que as relaxações vibracionais ocorram sem a emissão de luz, e quantidades maiores de supressor não terão efeito na distribuição dos comprimentos de onda. Então pode-se estabelecer um modelo quadrilinear

$$\mu[i, j, k, l] = \sum_f c_f[i] \varepsilon_f[j] \varphi_f[k] \pi_f[l] \quad \text{Equação A.II.5}$$

onde $\varphi_f[k]$ é o rendimento quântico de fluorescência do fluoróforo f quando este está sujeito a um tratamento k e onde c , ε e π são como definido previamente. Se a concentração relativa é fixada, a EQ. A.II.5 é reduzida a uma equação trilinear.

Todas as medidas descritas até agora podem ser obtidas usando-se iluminação estacionária, ou seja, a detecção ignora o tempo como um das variáveis. O segundo método para se obter uma variável adicional requer medidas do tempo de vida das espécies excitadas. Na espectroscopia com resolução temporal, as espécies são excitadas a partir de um tempo zero por um breve período de tempo com luz muito intensa. Em seguida, a luz emitida por uma espécie particular de fluoróforos é medida e o decaimento segue alguma função $h(t)$. Em casos simples, $h(t)$ é uma função exponencial negativa. Para um único fluoróforo, a intensidade é o produto de cinco termos

$$\mu[i, j, k, l, m] = \varepsilon[i] \pi[j] c[k] \varphi[l] h(m) \quad \text{Equação A.II.6}$$

onde ε , π , c e φ foram definidos na equação anterior, e h é a população relativa no estado excitado a um tempo m . Se a concentração e o rendimento quântico de fluorescência forem constantes, a EQ. A.II.6 é reduzida a um equação trilinear.

Outras formas de espectroscopia com resolução temporal usam informação originária no domínio de frequência. A luz usada para excitação é modulada a diferentes frequências. Consequentemente, a luz emitida é modulada, mas com um grau menor e com a fase atrasada, devido ao tempo de espera entre a emissão e a excitação.

Deve-se, agora, considerar a possibilidade de qualquer efeito causado pela interação entre os cromóforos. Em meios biológicos é muito comum a seguinte seqüência de eventos ocorrer: a) a luz é absorvida por um cromóforo f_1 com a probabilidade igual a A_{f_1} ; b) parte dessa luz absorvida é transferida radiativamente – ou não – para o cromóforo f_2 com probabilidade $Q_{f_1, f_2}[k]$; c) dada a emissão de f_2 a distribuição de emissão é $\pi_{f_2}[j]$. Portanto,

$$\mu[i, j, k] = \sum_{f_1} \sum_{f_2} A_{f_1}[i] Q_{f_1, f_2}[k] \pi_{f_2}[j] \quad \text{Equação A.II.7}$$

Caso essa seqüência de eventos EQ. A.II.7 ocorra pode haver problemas no tratamento dos dados. Contudo, algumas considerações e alguns cuidados podem ser tomados para que isso seja evitado. Um desses cuidados (que é inerente ao sistema estudado) diz respeito à concentração da substância original, no caso o PRX, que foi mantida pequena e, portanto, os problemas relativos à transferência de energia foram minimizados. Neste caso é muito maior a probabilidade de um fóton emitido por um fluoróforo conseguir atingir o detector do aparelho que ser absorvido por outro cromóforo dentro da solução. Para que isto ocorra duas condições são necessárias: a) que haja sobreposição dos espectros de emissão e absorção das espécies presentes; b) que a concentração de espécies seja tal que propicie a

absorção dos fotons emitidos por outros fluoróforos. Quanto maior a concentração dos cromóforos, maior a probabilidade do fóton ser absorvido e então não ser detectado pelo aparelho.

Antes de introduzir o PARAFAC é preciso que alguns conceitos sejam definidos, tais como aqueles presentes na Análise de Componentes Principais (PCA).

Wold (1987) trata do assunto de modo bem didático mostrando a potencialidade do método PCA, que é a base para a análise de muitos métodos de tratamento de dados multivariado.

O PCA foi introduzido na Química por Malinowski em 1960 sob o nome de "Principal Factor Analysis". Após 1970 tem sido publicada um grande número de aplicações em química. Esse método fornece uma aproximação dos dados originais, que são agrupados numa matriz X , e decompostos em termos de produtos de duas matrizes menores, T e P' . Estas matrizes capturam as informações essenciais contida em X de modo que todas aquelas mais importantes podem ser analisadas num espaço dimensional menor, sem que a estrutura original dos dados seja alterada.

A construção de gráficos tomando como base as colunas da matriz T dará uma visão da estrutura padrão dos objetos em X que essencialmente dominam todos os dados. Analogamente, gráficos das colunas de P' fornecem uma visão quanto ao padrão relativo às variáveis.

Por exemplo, seja uma matriz de dados contendo absorbâncias em $k=100$ comprimentos de onda diferentes, medidos para $N=10$ amostras de dois constituintes químicos. Essa matriz pode ser representada pelo produto de uma matriz (10×2) , a matriz T , e uma matriz (2×100) , a matriz P' , onde T descreve as concentrações dos constituintes e P' descreve seus espectros.

Uma interpretação geométrica do PCA pode ser dada da seguinte forma: seja uma matriz de dados X com N objetos e K variáveis. Ela pode ser representada como um conjunto de N pontos em um espaço de K -dimensões, o qual pode ser denominado como espaço M , espaço multivariado ou, ainda, espaço- K para indicar sua dimensionalidade. Um espaço M com $K > 3$ é difícil de ser visualizado. Entretanto, matematicamente, este espaço é similar a um com somente uma ou três dimensões. Conceitos geométricos como ponto, linhas, planos, distâncias e ângulos, todos eles, têm as mesmas propriedades tanto no espaço M como no espaço de três dimensões. A FIG. A.II.2 mostra um conjunto de pontos num espaço de dimensão três com um ponto próximo de uma reta (que no modelo PCA será denominada de componente principal (CP)). Um modelo constituído por dois CP é na verdade um plano – definido por duas linhas ortogonais – e um modelo de CP constituído por A -componentes é um hiperplano de dimensão A sendo as linhas (ou os CP) também ortogonais entre si. O CP mostrado na FIG. A.II.2 pode ser idealizado como uma reta que passa

pelos pontos no espaço de dimensão três, sendo ajustada pelo método dos mínimos quadrados.

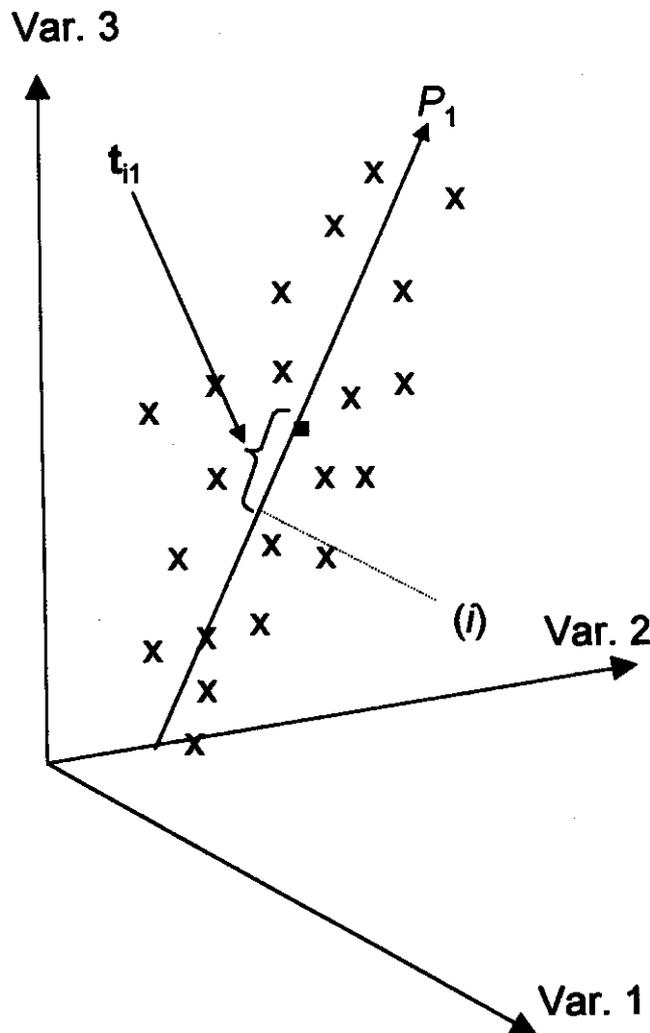


FIGURA A.II.2 – Esta figura mostra um espaço tridimensional com uma reta ajustada aos pontos: um modelo com um CP. O “score” de um objeto (t_{11}) é sua projeção ortogonal na linha que passa pelos pontos, o CP. O coeficiente de direção da referida linha é denominado “loading” (Wold et al (1987)).

Linhas, planos e hiperplanos podem ser vistos como espaços com uma, duas ou mais dimensões. O PCA pode por sua vez, ser visto também, como projeções de um espaço de dimensão M em um espaço de dimensão inferior.

Outra maneira de conceber o modelo PCA é considerar subespaços como uma janela dentro de espaços M de dimensões superiores. Os dados são projetados dentro dessa janela de espaço de dimensão menor, dando uma visão de sua estrutura no espaço real de dimensão M .

A projeção de X num subespaço de dimensão menor, por meio da projeção da matriz P' , dará a coordenada dos objetos nesse plano, em T . As colunas de T , t_i , são chamadas de vetores "scores" e as linhas de P' , p_a , são chamadas de vetores "loadings". Os últimos compreendem o coeficiente de direção do PC no hiperplano ou plano. Os vetores t_i e p_a são ortogonais, isto é, $p'_i p_j = 0$ e $t'_i t_j = 0$, para $i \neq j$. Os desvios entre a projeção e as coordenadas originais são denominadas de resíduos. Esses são armazenados na matriz E . Em notação matricial o PCA toma a seguinte forma:

$$X = 1\bar{x} + TP' + E.$$

O vetor \bar{x} é explicitamente incluído na formulação do modelo mas não é majoritário. Os dados podem ser projetados de um hiperplano passando pela origem. A FIG. A.II.3 mostra uma representação gráfica dessa fórmula.

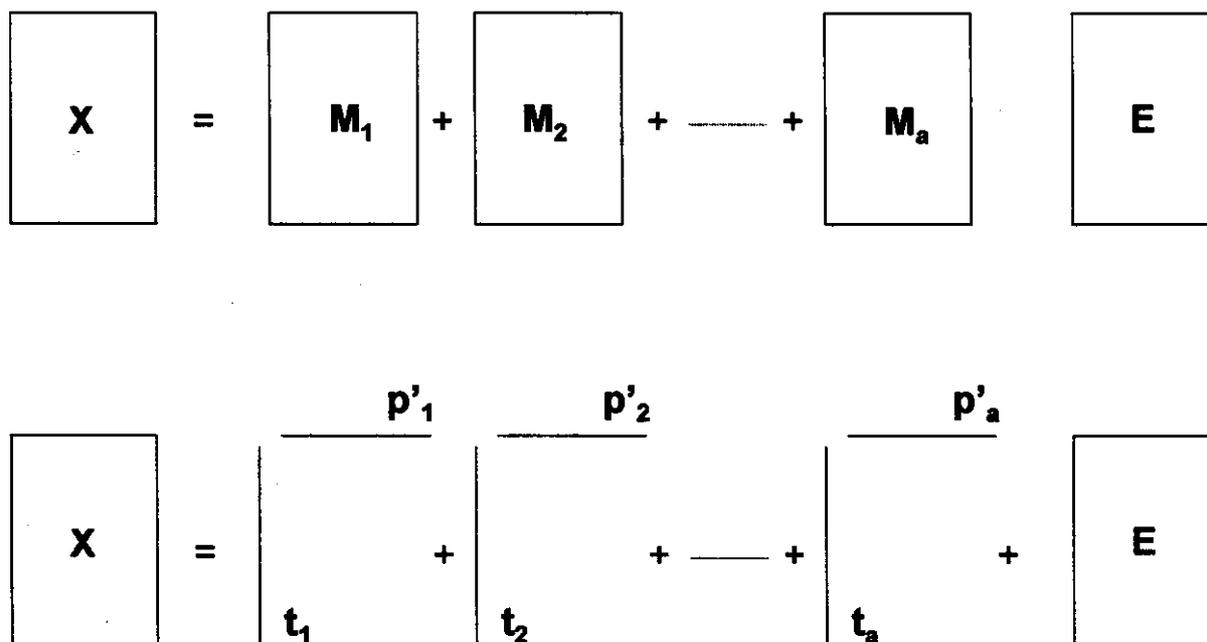


FIGURA A.II.3 – A matriz de dados X pode ser decomposta como a soma das matrizes M_i e os resíduos E . A matriz M_i pode ser vista como o produto dos "scores" t_i e dos "loadings" p'_i . (Wold (1987)).

O tamanho dos vetores t_a e p_a na dimensão de um CP são indefinidos com respeito a uma constante multiplicativa, c , como $tp = (tc)(p/c)$. Assim, é necessário encontrar uma definição de algum modo. É usual normalizar o vetor p_a para o comprimento 1,0 e é comum restringir seu maior elemento para valores positivos. Desse modo, a ambigüidade para $c = -1$ é removida.

Uma definição freqüentemente aceita em análise desse gênero é tomar o comprimento de p_a como a raiz quadrada do correspondente auto valor l_a . Isso faz com que os elementos em p_a correspondam diretamente aos coeficientes de correlação e os "scores" sejam padronizados para o comprimento 1,0.

O PARAFAC é um método de decomposição que pode ser comparado ao PCA, ou melhor, é uma generalização do PCA. O modelo foi independentemente proposto por Harshman e por Carroll & Chang (ANO) e este último o denominou CANDECOMP (decomposição canônica). A decomposição de dados é feita em tríades ou componentes trilineares, mas ao invés de um vetor "score" e outro vetor "loading", como em PCA, cada componente consiste de vetores "loadings" correspondente a cada modo, isto é, a cada arranjo de variáveis. É prática comum em métodos de decomposição trilinear não distinguir o que é "score" do que é "loading", e por conseqüência são tratados numericamente iguais.

O modelo PARAFAC de decomposição é dado por três matrizes, A, B e C com elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} . O modelo trilinear é encontrado pela minimização da soma dos quadrados dos resíduos, e_{ijk} no modelo

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad \text{Equação A.II.8}$$

Essa equação é mostrada graficamente na FIG. A.II.4 para dois componentes (f = 2).

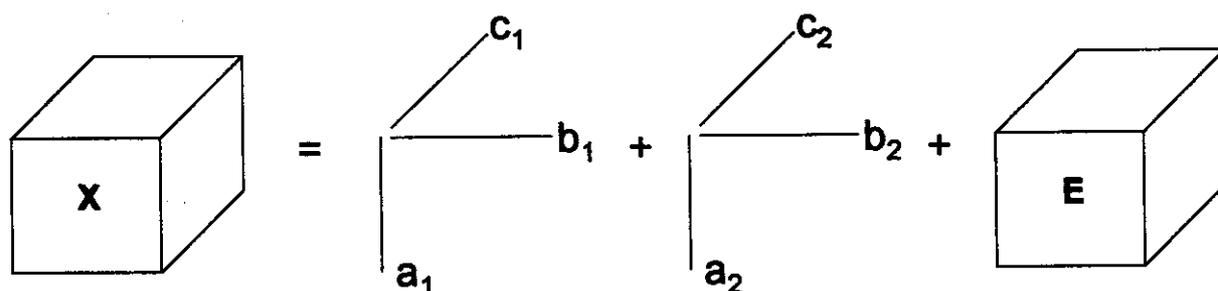


FIGURA A.II.4 – Representação gráfica de um modelo PARAFAC com dois componentes para os dados X (Bro (1997)).

O modelo pode ser escrito, também, como:

$$\underline{X} = \sum_{f=1}^F a_f \otimes b_f \otimes c_f \quad \text{Equação A.II.9}$$

onde a_f , $b_f \in C_f$ são as f -ésimas colunas dos "loadings" das matrizes A, B e C respectivamente.

Uma das vantagens desse método de tratamento de dados é que ele oferece solução única. Em métodos bilineares é bem conhecido o problema de rotação livre. Os "loadings" nas decomposições espectrais bilineares refletem os espectros puros dos analitos medidos, mas é impossível encontrar, de fato, o espectro puro sem informações extras por causa dos problemas das rotações. Esse fato tem levado à proposição de outros métodos para a obtenção de resultados que sejam mais fáceis de ser interpretados que o próprio PCA e modelos semelhantes. Muitos desses métodos, entretanto, são mais ou menos arbitrários ou possuem algumas propriedades não muito bem definidas. Esse não é o caso do PARAFAC. Sendo os dados de fato trilineares será encontrado um verdadeiro constituinte (ou as variáveis) se o número correto de componentes for utilizado e a relação sinal/ruído for apropriada. Esse fato importante é o que originariamente levou Harshman a desenvolver o método.

A solução do modelo PARAFAC pode ser encontrada pelo método dos mínimos quadrados alternados assumindo sucessivamente os "loadings" em dois dos modos conhecidos e estimando o grupo de parâmetros desconhecidos do último modo. Essa foi a forma pela qual o modelo foi inicialmente proposto.

As restrições para as soluções do PARAFAC podem algumas vezes ajudar em termos de interpretação ou estabilidade das soluções. Os modelos construídos com um conjunto de restrições pré-estabelecidas sempre serão mais rígidos do aqueles construídos sem restrições. Entretanto, o primeiro, geralmente, garante maior facilidade no momento da interpretação do que o segundo. Quando se fala em restrições deve-se mencionar que o método oferece condições para que esses modelos sejam construídos com algumas delas. Essas podem ser de dois tipos: a) ortogonalidade e b) não negatividade, pelo menos até o momento. Então, pode-se construir vários modelos com o mesmo conjunto de dados considerando as diferentes restrições que podem ser impostas aos modelos. Assim, pode-se ter um modelo que apresente somente a ortogonalização ou somente a não negatividade como restrição, ou ainda um modelo que apresente tanto uma como a outra. Com a ortogonalidade o modelo construído têm a propriedade de não apresentar informações misturadas, ou seja, os vetores dos "loadings" de cada modo não contém informações dos outros modos, eles são puros. Com a não negatividade os resultados serão todos positivos para os modos em que essa restrição for imposta. A ortogonalização é freqüentemente usada em quimio-metria porque ela assegura uma interpretação limpa dos "loadings". A não negatividade é geralmente usada quando dados oriundos de espectroscopia são tratados, pois os modelos construídos dessa forma são mais interpretáveis no sentido de que não fornecem resultados negativos. Caso contrário seria difícil conceber, por exemplo, emissão ou absorção negativas.

Os pré processamentos em arranjos de três modos são mais complicados de ser feitos e interpretados, em comparação com aqueles efetuados no arranjos de dois modos. Isso porque os dados possuem estruturas mais complexas, e, quando, alguns dos pré-processamentos são utilizados, pode ocorrer que a estrutura inicial presente no arranjo de três modos seja completamente desmanchada. É justamente isso que se quer evitar em tratamentos desse tipo.

Na maioria das vezes é difícil decidir qual o número de componentes é o melhor para a construção de um bom modelo utilizando o PARAFAC. Essa área ainda não está muito bem fundamentada, e a maioria dos pesquisadores nem sempre estão de acordo. Contudo, um requisito sempre é exigido nesses casos, e que auxiliará na escolha do número de componentes. Esse requisito é o conhecimento prévio que se pode ter a respeito do sistema em estudo. Nesse sentido algumas perguntas podem ser formuladas: a) quão complexo é o sistema em análise? b) quantos componentes químicos podem estar presentes e que responderão à técnica utilizada? e c) quais as possíveis variáveis que podem influenciar nesse sistema de tal maneira que se consiga obter informações mais seguras para a interpretação correta dos resultados? Deve-se entender aqui que o número de componentes que o modelo pode apresentar pode ou não estar de acordo com o número de componentes químicos presentes no sistema. Contudo, essa tarefa não é uma das mais fáceis e aqui reside uma questão para a qual nem sempre a resposta será encontrada. O assunto referente ao número de componentes (e/ou espécies) presentes no sistema objeto desta Tese, é abordado no corpo do trabalho onde é discutido com maior profundidade, já que se dispõe de alguns conhecimentos prévios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acerbi, D., *et al*, "Biopharmaceutical optimization of β -cyclodextrin inclusion compounds", *Drugs Invest.* 2 (Suppl. 4), 29 (1990).
2. Alberghina, C. *et al*, "Solvent effects on the rotational barriers of the N,N-dimethylamides of 2- and 3-furoic and 2- 3-thenoic acids", *J. Chem. Reserch (S)*, 108 (1985).
3. Alchemy II, Tripos Associates Inc., St. Louis (1988).
4. Alencastro, R. B. e Neto, J. D. M., "Theoretical studies on nonsteroidal antiinflammatory drugs. Benoxaprofen, chlorpromazine, and piroxicam", *Inter. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp.*, 22, 123 (1995).
5. Allen, L. C., "A Simple Model of Hydrogen Bonding", *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6921, (1975).
6. Alves, O. L. e Fonseca, S. F., "Preparation and characterization of the β -cyclodextrin inclusion complex with phenylpropionic acid", *J. Inclu. Phenom. Mole. Recog. Chem.*, 7, 589 (1989).
7. Amdal, K. *et al*, "Determination of the equilibrium constant for the tautomeric 9-hydroxyanthracene/9-anthrone system in aprotic solvents by a novel application of cyclic voltammetry", *Acta Chem. Scand. B*, 40, 230 (1986).
8. Andersson, C., Royal Veterinary & Agricultural University, Cph. Rolighedsvej 30, III, DK-1958 Frb, C Denmark, claus.andersson@pop.foodsci.kvl.dk (1995).
9. Appellof, C. F. e Davidson, E. R., "Strategies for analyzing data from video fluorimetric monitoring of liquid chromatographic effluents", *Anal. Chem.*, 53, 2053 (1981).
10. Arrabal, M. J., *et al*, "Spectrophotometric determination of mixtures of iron (III) and manganese (II) by complexation with 3-indolyacetohydroxamic acid and principal component regression multivariate calibration", *Analyst*, 119, 1537 (1994).
11. Aviyente, V. *et al*, "Conformational analysis of 2-cyano dihydroxyethane in solution", *J. Phys. Org. Chem.*, 9, 119 (1996).
12. Barbara, P. F. *et al*, "Picosecond kinetic and vibrationally resolved spectroscopic studies of intramolecular excited-state hydrogen atom transfer", *J. Phys. Chem.*, 93, 29 (1989).
13. Bergeron, R. J., "Cycloamyloses", *J. Chem. Ed.*, 54, 204 (1977).
14. Bernhard, E. e Zimmermann, F., "Contribution to the understanding of oxicam ionization constants", *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 34, 647 (1984).
15. Birks, J. B., "Photophysics of aromatic molecules", Cap. 2, Wiley - Interscience, London (1970).
16. Booksh, K. S. e Kowalski, B. R., "Theory of analytical chemistry", *Anal. Chem.*, 66, 782A (1994).
17. Bortolus, P. e Monti, S., "Photochemistry in cyclodextrin cavities", *in* "Advances in Photochemistry", 21, 1 (1996), New York, John Wiley & Sons, Ed. D. C. Neckers *et al*.
18. Box, G. E. P. e Draper, N. R., "Empirical model-building and response surfaces", John Wiley&Sons, Cap. 15, 502, New York (1987).

19. Box, G. E. P., Hunter, W. G. e Hunter, J. S., "Statistics for experimenters", Wiley-Interscience, New York (1978).
20. Bro, R., "PARAFAC. Tutorial & applications", Chemom. Intell. Lab. Syst., 38, 149 (1997).
21. Bro, R., "Multiway calibration. Multilinear PLS", J. Chemom., 10, 47 (1996).
22. Brown, S. D. *et al*, "Chemometrics", Anal. Chem., 68, 21R (1996).
23. Brucker, G. A. *et al*, "Proton-transfer and solvent polarization dynamics in 3-hydroxiflavone", J. Phys. Chem., 95, 3190 (1991).
24. Brucker, G. A. e Kelley, D. F., "Role of phenyl torsion in the excited-state dynamics of 3-hydroxiflavone", J. Phys. Chem., 92, 3805 (1988).
25. Bruns, R. E., Neto, B. B. e Scarmínio, I. S., "Planejamento e otimização de experimentos", Editora UNICAMP, Campinas (1995).
26. Bunker, C. E., "Quantitative application of principal component analysis and self-modeling spectral resolution to products analysis of tetraphenylethylene photochemical reactions", Anal.Chem., 65, 3460 (1993).
27. Burdett, J. L. e Rogers, M. T., "Keto-enol tautomerism in β -dicarbonyls studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy I. Proton chemical shifts and equilibrium constants or pure compounds", J. Am. Chem. Soc., 86, 2105 (1964).
28. Burdick, D. S., "An introduction to tensor products with applications to multiway data analysis", Chem. Int. Lab. Sys., 28, 229 (1995).
29. Casu, B. *et al*, "Conformation of o-methylated Amylose and cyclodextrins", Tetrahedron, 24, 803 (1968). ✖
30. Casu, B. *et al*, "Hydrogen bonding and conformation of glucose and polyglucoses in dimethylsulphoxide solution", Tetrahedron, 22, 3061 (1966). ✖
31. Cho, D. W. *et al*, "Concentration dependences of ground-states and excited-stated intramolecular proton transfer of piroxicam in methanol", J. Photosci., 1, 15 (1994).
32. Cho, D. W. *et al*, "Dynamics of excited-state intramolecular proton transfer reactions in piroxicam. Role of triplet states", Chem. Phys. Lett., 226, 275 (1994).
33. Chou, Pi-Tai *et al*, "Role of triplet states in the reverse proton transfer mechanism of 7-hydroxy-1-indanone", J. Phys. Chem., 95, 10306 (1991).
34. Coitiño, E. L. e Tomasi, J., "Solvent effects on the internal rotation of neutral and protonated glyoxal", Chem. Phys., 204, 391 (1996);
35. Cox, G. S. *et al*, "Intramolecular exciplex emission from aqueous β -cyclodextrin solutions", J. Am. Chem. Soc., 106, 422 (1984).
36. Cramer, F. *et al*, "Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics", J. Am. Chem. Soc., 89, 14 (1967).
37. Deming, S. N. *et al*, "Experimental design in chemometrics", J. Chemom., 5, 181 (1991).
38. Dewar, E. G. *et al*, "AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model", J. Am. Chem. Soc., 107, 3902 (1985).

39. Dicionário de especialidades farmacêuticas, Editora de publicações médicas Ltda., Produção Jornal Brasileiro de Medicina (1997).
40. Dzugan, T. P. *et al*, "On the ground-state tautomerization of 3-hydroxyflavone", *Chem. Phys. Lett.*, **127**, 336 (1986).
41. Earnest, D. L. *et al*, "Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: Potencial for cancer chemoprevention", *J. Cell. Biochem., Supple.* **161**, 156 (1992).
42. Fabian, W. M. F., "AM1 calculations of rotation around essential single bonds and preferred conformations in conjugated molecules", *J. Comp. Chem.*, **9**, 369 (1988).
43. Ferreira, M. M. C., *et al*, "Chemometric study of the fluorescence of dental calculus by trilinear decomposition", *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1317 (1995).
44. Flamigni, L., "Effects of complexation by cyclodextrin on the photoreactivity of rose bengal and erythrosin B", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **90**, 2331 (1994).
45. Flier, J. S. *et al*, "Circular hydrogen bonds", *Nature*, **279** (24), 343 (1979).
46. Fronza, G. *et al*, "Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin", *J. Pharm. Sci.*, **81**, 1162 (1992).
47. Gampp, H. *et al*, "Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data – III", *Talanta*, **32**, 1133 (1985).
48. Gampp, H. *et al*, "Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data – IV", *Talanta*, **33**, 943 (1986).
49. Geckle, J. M., "Zwitterionic piroxicam in polar solution", *Mag. Res. Chem.*, **27**, 150 (1989).
50. Giordano, F. *et al*, "Composti di inclusione farmaco ciclodestrina: approccio sistematico qualitativo e quantitativo per la caratterizzazione dello stato solido", *Boll. Chim. Farmaceutico – Anno 132*, 75 (1993).
51. Grabowska, A. *et al*, "Mechanism and kinetics of proton-transfer reaction in excited intermally hydrogen bonded benzoxazole derivatives as studied by picosecond transient absorption an stimulated emission pumping", *J. Phys. Chem.*, **95**, 10493 (1991).
52. Grellmann, K. H., *et al*, "Intramolecular proton transfer and tunnel effects in the metastable triplet states of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole studied by micro- and nanosecond laser flash photolysis", *Chem. Phys.*, **136**, 201 (1989).
53. Gremlich, H. U. e Berets, S. L. "Use of FT-IR internal reflection spectroscopy in combinatorial chemistry", *Appl. Spectrosc.*, **50**, 532 (1996).
54. Griffiths, D. W. e Bender, M. L., "Cycloamyloses as catalysts", *Advances in Catalysis*, **23**, 209 (1973).
55. Hamai, S., "Association of inclusion compounds of β -cyclodextrin in aqueous solution", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 2721 (1982).
56. Hamai, S., "Pyrene excimer formation in γ -cyclodextrin solutions: association of 1:1 pyrene- γ -cyclodextrin inclusion compounds", *J. Phys. Chem.*, **93**, 6527 (1989).
57. Hansen, J. E. *et al*, "Excited-state proton transfer of protonated 1-aminopyrene complexed with β -cyclodextrin", *J. Phys. Chem.*, **96**, 6904 (1992).

58. Henrion, R., "N-way principal component analysis. Theory, algorithms and applications", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 25, 1 (1994).
59. Hirschfeld, T., "The hy-phen-ated methods", *Anal. Chem.*, 52, 297A (1980).
60. Ho, C.-N., *et al*, "Application of the method of rank annihilation to fluorescent multicomponentes mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons", *Anal. Chem.*, 52, 1071 (1980).
61. Ho, C.-N., *et al*, "Application of the method of rank annihilation to quantitative analyses of multicomponent fluorescence data from the video fluorometer", *Anal. Chem.*, 50, 1108 (1978).
62. Ho, C.-N., *et al*, "Simultaneous multicomponent rank annihilation and applications to multicomponent fluorescent data acquired by the video fluorometer", *Anal. Chem.*, 53, 92 (1981).
63. Hoshino, M. *et al*, "Fluorescence enhancement of benzene derivatives by forming inclusion complexes with β -cyclodextrin in aqueous solutions", *J. Phys. Chem.*, 85, 1820 (1981).
64. Ivanov, P. M. *et al*, "Conformation analysis of diastereoisomeric tetraphenyl-substituted pyrrolidines", *J. Mol. Struc.*, 377, 19 (1996).
65. Kano, K. *et al*, "Fluorescence quenching of pyrene and naphthalene in aqueous cyclodextrin solutions. Evidence of three-component complex formation", *J. Phys. Chem.*, 86, 1833 (1982).
66. Kano, K. *et al*, "Three component complexes of cycloheptaamylose. Fluorescence quenching of pyrenes and naphthalenes in aqueous media", *Chem. Lett.*, 1035 (1980).
67. Kano, K. *et al*, " γ -cyclodextrin-enhanced excimer fluorescence of pyrene and effect of n-butyl alcohol", *Chem. Lett.*, 321 (1982).
68. Keller, H. R. e Massart, D. L., "Peak purity control in liquid chromatography with photodiode-array detection by a fixed size moving window evolving factor analysis", *Anal. Chim. Acta*, 246, 379 (1991).
69. Kim, Y. H. *et al*, "Excited-state intramolecular proton transfer emission of piroxicam in aqueous β -cyclodextrin solutions", *J. Lumin.*, 59, 209 (1994);
70. Kochevar, I. E. *et al*, "Possible mechanism of piroxicam-induced photosensitivity", *Arch. Dermatol.*, 122, 1283 (1986).
71. Kochevar, I. E., "Mechanisms of drug photosensitization", *Photochem. Photobiol.*, 45, 891 (1987).
72. Kurozumi, M., *et al*, "Inclusion compound of non-steroidal antiinflammatory and other slightly water soluble drugs with α - and β -cyclodextrins in powdered form", *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 3062 (1975).
73. Laermer, F. *et al*, "Femtosecond spectroscopy of excited-state proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole", *Chem. Phys. Lett.*, 148, 119 (1988).
74. Lahmani, F. *et al*, "Photophysics of van der Waals complexes: solvation effects on the 1-cyanonaphthalene singlet state", *J. Phys. Chem.*, 94, 8767 (1990).

75. Langgård, M. e Sandström, J., "Conformational analysis of (R,R)- and (R,S)-N,N-bis-(1-phenylethyl)-acetamide and -thioacetamide. A study by NMR spectroscopy and by empirical force-field and AM1 calculations", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **3**, 435 (1996).
76. Lavtchieva, L. *et al*, "Golden rule study of excited-state proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole and 2-(2'-hidroxy-4'-methyphenyl)benzoxazole", *J. Phys. Chem.*, **97**, 306 (1993).
77. Lesyng, B. e Saenger, W., "Theoretical investigations on circular and chain-like hydrogen bonded structures found in two crystal forms of α -cyclodextrin hexahydrate. Model for hydration and water clusters", *Biochim. Biophys. Acta*, **678**, 408 (1981).
78. Leurgans, S. e Ross, R. T., "Multilinear models: applications in spectroscopy", *Statist. Sci.*, **7**, 289 (1992).
79. Leurgans, S. E. *et al*, "A decomposition for three-way arrays", *SIAM J. Matrix Anal. Appl.*, **14**, 1064 (1993).
80. Lin, Shan-Yang e Kao, Yuh-Hong, "Solid particulates of drug- β -cyclodextrin inclusion complexes directly by a spray-drying technique", *Intern. J. Pharm.*, **56**, 249 (1989).
81. Lindberg, W. *et al*, "Partial least-square method for spectrofluorimetric analysis of mixtures of humic acid and ligninsulfonate", *Anal. Chem.*, **55**, 643 (1983).
82. Lister, D. G. *et al*, "Internal rotation and inversion", Ed. Academic Press Inc. Ltd., London (1978).
83. Loftsson, T. e Brewster, M., "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization", *J. Pharm. Sci.*, **85**, 10, 1017 (1996).
84. Maeder, M., "Envolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks", *Anal. Chem.*, **59**, 527 (1987).
85. Mansilla, A. E.- *et al*, "Simultaneous determination of chlorpyrifos and carbaryl by differential degradation using diode-array spectrophotometry optimized by partial least squares", *Analyst*, **119**, 1183 (1994).
86. McKerrow, K. J. e Geig, D. E., "Piroxicam-induced photosensitive dermatitis", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **15**, 1237 (1986).
87. Mihalic, M. *et al*, "Piroxicam" in "Analytical profiles of drug substances", **15**, 511 (1986), New York, Acad., Ed. Klaus Florey.
88. Mills, S. G. e Beak, P., "Solvent Effects on keto-enol equilibria: tests of quantitative models", *J. Org. Chem.*, **50**, 1216 (1985).
89. Miranda, M. A. *et al*, "Photodegradation of piroxicam under aerobic conditions. The photochemical keys of the piroxicam enigma?", *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol*, **8**, 199 (1991).
90. Mitchell, B. C. e Burdick, D. S., "An empirical comparison of resolution methods for three-way arrays", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **20**, 149 (1993).
91. Mobley, P. R., *et al*, "Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95, part 2", *Appl. Spectrosc. Rev.*, **31**, 347 (1996).

92. Monti, S. *et al*, "Photophysics and photochemistry of methylated phenols in β -cyclodextrin inclusion complexes", *J. Phys. Chem.*, 97, 13011 (1993).
93. Moon, R. C. *et al*, "Chemoprevention of OH-BBN induced bladder cancer in mice by piroxicam", *Carcinogenesis*, 14, 1487 (1993).
94. Moore, D. E. e Hemmens, V. J., "Photosensitization by antimalarial drugs", *Photochem. Photobiol.*, 36, 71 (1982).
95. Moore, W. J., "Físico-química", Cap. 17, 4ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo (1976).
96. Mordzinski, A. e Grellmann, K. H., "Excited-state proton-transfer reactions in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole. Role of triplet states", *J. Phys. Chem.*, 90, 5503 (1986).
97. Moses, G. S. *et al*, "Electrochemical evaluation of the equilibrium constant of keto-enol tautomerism in piroxicam", *Asian J. Chem.*, 7, 709 (1995).
98. Motten, A. G. e Chignell, C. F., "Spectroscopic studies of cutaneous photosensitizing. Agents-III. Spin trapping of photolysis products from sulfanilamide analogs", *Photochem. Photobiol.*, 37, 17 (1983).
99. Mueller, P. *et al*, "Protective effects of ranitidine in stomach and duodenum against piroxicam: an endoscopically controlled double-blind study", *Arzneim-Forsch.*, 42, 1492 (1992).
100. Nagaoka, Shin-ichi *et al*, "Electronic-state dependence of intramolecular proton transfer of *o*-hydroxybenzaldehyde", *J. Phys. Chem.*, 92, 166 (1988).
101. Nicolle, E. *et al*, "NMR and computer modeling conformational study of N-benzyl,N-n-propyl (2-methyl-3-nitrophenyl)acetamide", *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 132, 669 (1995).
102. Neckers, D. C. *et al*, "Advances in photochemistry", Vol. 21, Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1996).
103. Nishiya, T. *et al*, "Fluorescence studies of the intramolecular hydrogen-bonded molecules *o*-hydroxyacetophenone and salicylamide and related molecules", *J. Phys. Chem.*, 90, 5730 (1986).
104. Pasquini, C. e Davanzo, C. U., "Program for expanding infrared data files from a Perkin Elmer FT-IR 1600", *Lab. Microcomp.*, 10, 154 (1991).
105. Park, H.-R. *et al*, "Excited-state proton transfer of 2-naphthol inclusion complexes with cyclodextrins", *J. Phys. Chem.*, 98, 6158 (1994).
106. Peña, M. S. *et al*, "Determination of binary mixtures of sulfonamides by photochemically induced fluorescence using partial least squares multivariate calibration", *Analyst*, 119, 1177 (1994).
107. Powling, J e Bernstein, H. J., "The effect of solvents on tautomeric equilibria", *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4353 (1951).
108. Prieto, M. F. R. *et al*, "Dual phosphorescence from 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole due to keto-enol tautomerism in the metastable triplet state", *Chem. Phys. Lett.*, 146, 387 (1988).

109. Ramamurthy, V. e Eaton, D. F., "Photochemistry and photophysics within cyclodextrin cavities", *Acc. Chem. Res.*, 21, 300 (1988).
110. Ramos, L. S. *et al*, "Generalized rank annihilation method II. Analysis of bimodal chromatographic data", *J. Chromatogr.* 385, 165 (1987).
111. Rao, V. P. e Turro, N. J., "Asymmetric induction in benzion by photolysis of benzaldehyde adsorbed in cyclodextrin cavities", *Tetrahedron Lett.*, 30, 4641 (1989).
112. Reichardt, C., "Solvents and Solvent effects in organic chemistry", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Federal Republic of Germany (1990).
113. Ross, R. T., *et al*, "Resolution of the fluorescence spectra of plant pigment-complexes using trilinear models", *Biochim. Biophys. Acta*, 1056, 317 (1991).
114. Saenger, W. e Brown, G. M., "Flip-flop hydrogen bonding in a partially disordered system", *Nature*, 296, 581 (1982).
115. Saenger, W., "Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry", *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 19, 344 (1980).
116. Sanchez, E. *et al*, "Generalized rank annihilation method I. Application to liquid chromatography-diode array ultraviolet detection data", *J. Chromatogr.*, 385, 151 (1987).
117. Sangwan, N. K. e Schneider, Hans-Jörg, "The kinetic effects of water and of cyclodextrins on Diels-Alder reactions. Host-guest Chemistry. Part 18", *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 9, 1223 (1989).
118. Santuci, L. *et al*, "Placebo-controlled comparison of piroxicam- β -cyclodextrin, piroxicam and indomethacin on gastric potential difference and mucosa in humans", *Dig. Dis. Sci.*, 37, 1825, (1992).
119. Sarkar, B. *et al*, "The quenching of lumichrome fluorescence by β -cyclodextrin: evidence for inclusion complex", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 1807 (1995).
120. Savitzky, A. e Golay, M. J. E., "Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures", *Anal. Chem.*, 36, 1627 (1964).
121. Schardinger, F., *Z. Nahrungs-Genussmittel Gebrauchsgegenstände*, 6, 865 (1903), conforme citado em Neckers *et al* (1996).
122. Schardinger, F., *Wien. Klin. Wochenschr.*, 17, 207 (1904), conforme citado em Saenger, W. (1980).
123. Schardinger, F., *Zentr. Bakteriolog., Parasitenk., Infektioskr. Hyg. Abt. 2*, 29, 188 (1911), conforme citado em Saenger, W. (1980).
124. Scypinski, S. e Cline Love, L. J., "Cyclodextrin-enhanced luminescence spectroscopy", *Am. Lab. (Fairfield, Conn.)* 16, 55 (1984).
125. Scypinski, S. e Cline Love, L. J., "Cyclodextrin-induced room-temperature phosphorescence of nitrogen heterocycles and bridged biphenyls", *Anal. Chem.* 56, 331 (1984).
126. Serrano, G. *et al*, "Piroxicam induced photosensitivity and contact sensitivity to thiosalicylic acid", *J. Am. Acad. Dermatol.*, 23, 479 (1990).

127. Silverstein, R. M., Bassier, G. C. e Morrill, T. C., "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos", Ed. Guanabara, 3^a. ed., 299p (1987).
128. Smilde, A. K., "Three-way analyses. Problems and prospects", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **15**, 143 (1992).
129. Spencer, J. N., "Solvent effects on the tautomeric equilibrium of 2,4-pentanedione", *Can. J. Chem.*, **60**, 1178 (1982).
130. Stähle, L. "Aspects of the analysis of three-way data", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **7**, (1989).
131. Stern, R. S., "Phototoxic reactions to piroxicam and other nonsteroidal antiinflammatory agents", *New J. Med.*, **309**, 186 (1983).
132. Stewart, J. J. P. "MOPAC 6.0 manual", Frank J. Seiler Research Laboratory, United State, Air Force Academy (1990).
133. Svoboda, P. *et al*, "Solvent effect – classification of parameters describing influence of solvents", *Collect. Czechoslovak Chem. Commun.*, **48**, 3287 (1983).
134. Takács-Novák, K. *et al*, "Microscopic protonation/deprotonation equilibria of the anti-inflammatory agent piroxicam", *Helv. Chim. Acta*, **78**, 553 (1995).
135. Takuj, T. *et al*, "Inhibitory effect of the non-steroidal anti-inflammatory drugs, indomethacin and piroxicam on 2-acetylaminofluorene induced hepatocarcinogenesis", *Cancer Lett.*, **68**, 111 (1993).
136. Tauler, R. e Barceló, D., "Multivariate curve resolution applied to liquid chromatography-diode array detection", *Trends Anal. Chem.*, **12**, 319 (1993).
137. Tauler, R. e Kowalski, B., "Multivariate curve resolution applied to spectral data from multiple runs of an industrial process", *Anal. Chem.*, **65**, 2040 (1993).
138. Tauler, R., *et al*, "Multicomponent determination of chlorinated hydrocarbons using a reations-based chemical sensor. 2 Chemical speciation using multivariate curve resolution", *Anal. Chem.*, **66**, 3337 (1994).
139. Tsai, R. *et al*, "Physicochemical and structural properties of non-steroidal anti-inflammatory oxicams", *Helv. Chim. Acta*, **76**, 843 (1993).
140. Ueno, A. *et al*, "Fluorescence enhancement of α -naphthoxyacetic acid in the cavity of γ -cyclodextrin, assisted by a space-regulating molecule", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 194 (1981).
141. VanEtten, R. L. *et al*, "Acceleration of phenyl ester cleavage by cycloamyloses. A model for enzymatic specificity", *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3242 (1967).
142. Villiers, A., *C. R. Acad. Sci.*, **112**, 536 (1891), conforme citado em Saenger, W. (1980).
143. Vries, H. *et al*, "Photochemical reactions of quinoxin, olaquinox, carbadox and cyadox with protein, indicating photoallergic properties", *Toxicology*, **63**, 85 (1990).
144. Wagenaar, B. W. e Müller, B. W., "Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres", *Biomaterials*, **15**, 49 (1994).

145. Wemick, D. L. *et al*, "Ternary complexes and Diels-Alder reaction fo cyclopentadiene in crystalline cyclodextrins", *J. Chem. Soc. Chem. Commum.*, 956 (1990).
146. Western, A. *et al*, "Involvement of singlet oxygen in the phototoxicity mechanism for a metabolite of piroxicam", *Photochem. Photobiol.*, 46, 469 (1987).
147. Wold, S., *et al*, "Principal component analysis", *Chem. Intel. Lab. Sys.*, 2, 37 (1987).
148. Workman, J. J. Jr., *et al*, "Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95, part 1", *Appl. Spectrosc. Rev.*, 31, 73 (1996).
149. Yoon, M. e Kim, Y. H., "Proton transfer equilibria in the excited state of piroxicam and its analog in aqueous solution", *Bull. Korean Chem. Soc.*, 10, 434 (1989).
150. Yoon, M. *et al*, "Photophysical behaviors of biphenylcarboxylic acid in various solvents. Excited-state geometry change and intramolecular charge transfer", *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 13, 613 (1992).
151. Yoon, M. *et al*, "Solvent dependence of absorption and fluorescence spectra of piroxicam. A possible intramolecular proton tranfer in the excited state", *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 9, 171 (1988).
152. Yorozu, T. *et al*, " Fluorescence studies of pyrene inclusion complexes with α -, β - and γ -cyclodextrin in aqueous solutions. Evidence for formation of pyrene dimer in γ -cyclodextrin cavity", *J. Phys. Chem.*, 86, 4426 (1982).
153. Zoltewicz, J. A. e Maier, N. M., "Atropisomerism of cofacial pyridine rings. Synthesis, proton NMR spectra and conformations of 1,8-di(3'-pyridyl)naphthalene", *Tetrahedron*, 52, 8707 (1996).
154. Zung, J. B., *et al*, "Investigation of the complexation of pyrene and naphathalene with hydroxypropyl- β -cyclodextrin", *Applied Spectrosc.*, 44, 1491 (1990).