



*Universidade Estadual de Maringá*

*Pós-Graduação em Física*

---

**Ana Claudia Nogueira Mulati**

**AVALIAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE COMPLEXOS DE  
INCLUSÃO DE INSULINA E CURCUMINA EM CICLODEX-  
TRINAS: ESTUDO COM AS ESPECTROSCOPIAS RAMAN,  
FTIR E FOTOACÚSTICA**

Orientador: **Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso**

Co-orientadoras: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graciette Matioli**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francielle Sato**

Maringá, Junho de 2015.

---



*Universidade Estadual de Maringá*

*Pós-Graduação em Física*

---

**Ana Claudia Nogueira Mulati**

**AVALIAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE COMPLEXOS DE  
INCLUSÃO DE INSULINA E CURCUMINA EM CICLO-  
DEXTRINAS: ESTUDO COM AS ESPECTROSCOPIAS  
RAMAN, FTIR E FOTOACÚSTICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Física da Universidade Estadual de Ma-  
ringá para obtenção do título de doutor em Física.

Orientador: **Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso**

Co-orientadoras: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graciette Matioli**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francielle Sato**

Maringá, Junho de 2015.

---

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação  
(CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M954a Mulati, Ana Claudia Nogueira  
Avaliação físico química de complexos de inclusão de insulina e curcumina em ciclodextrinas: estudo com as espectroscopias Raman, FTIR e fotoacústica / Ana Claudia Nogueira Mulati. -- Maringá, 2015.  
134 f.: il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso.  
Coorientador: Prof. Dr. Graciette Matioli  
Coorientador: Profa. Dra. Francielle Sato

Tese (Doutor em Física) - Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física.

1. Espectroscopia vibracional. 2. FTIR. 3. FT-RAMAN.  
4. Ciclodextrina - Complexo de Inclusão. 5. Insulina.  
6. Curcumina. I. Baesso, Mauro Luciano, orient.  
II. Matioli, Graciette, co-orient. II. Sato, Francielle. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física.  
IV. Título.

21.ed. 535.846

*Dedico este trabalho às pessoas  
que são verdadeiramente importan-  
tes em minha vida, e que Deus me  
deu a graça de chamá-los de*  
*FAMÍLIA!*

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece  
 Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir  
 Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos  
 Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar.*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim  
 Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor  
 Do que ficou, vou me lembrar  
 E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou  
 Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar  
 Vou persistir, continuar a esperar e crer  
 E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora  
 Mas na alma, há certeza da vitória.*

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece  
 Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim  
 Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor  
 Do que ficou, vou me lembrar  
 E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou  
 Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar  
 Vou persistir, continuar a esperar e crer ...*

*Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem  
 Vou cantando minha história, profetizando  
 Que eu posso, tudo posso... em Jesus!*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de um verdadeiro esforço em equipe, que não seria possível sem a importante colaboração de várias pessoas, agradeço em especial:

- primeiramente a Deus, por mais esta bênção alcançada, e pelo conforto encontrado nas orações durante os momentos difíceis;
- à toda minha família que sempre me incentivou nos estudos, em especial aos meus irmãos Sirley e Geniel;
- ao meu esposo Alessandro por sua infinita paciência e amor incondicional;
- ao meu orientador, Professor Mauro Luciano Baesso, por quem aprendi a ter imensa admiração. Sou muito grata pela paciência, estímulo, conhecimento adquirido e principalmente pela confiança em meu trabalho;
- à Camila Sampaio e à Sóstenes Valentini, minhas companheiras de pesquisa. Sou grata a vocês meninas pela cooperação e confiança, mas principalmente pela amizade que se tornou tão importante para mim;
- à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Graciette Matioli do Departamento de Farmácia (UEM), por toda ajuda, atenção e paciência. Foi muito gratificante ter trabalhado com você durante toda a minha formação, que com certeza foi mais rica graças a sua colaboração;
- à Francielle Sato, minha co-orientadora e principalmente amiga, não escreverei muito por não ter palavras que descreva minha gratidão a você. Foram tantas coisas que não consigo citar;
- ao Prof. Medina, e também amigo, por me receber em sua sala sempre com toda a paciência, mesmo quando as dúvidas eram ridículas;
- aos meus eternos amigos, Jaciele, Leandro, Gutierrez, Taiana, Giselly, por todo estímulo e compreensão, pelos tão saborosos cafezinhos da cantina, sem vocês tudo teria sido bem mais difícil;
- aos amigos do GEFF pelo companheirismo, apoio e tantas outras coisas que sempre me ajudaram;
- aos Professores do GEFF, pela colaboração, sugestões e importantes discussões;
- a todos os funcionários do DFI-UEM, e em especial à Akiko e à Mônica;
- aos meus companheiros e amigos da Universidade Federal do Paraná por todo o apoio, principalmente na reta final deste trabalho.
- à Capes, CNPq, Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro.

**Muito obrigada a todos!**

# Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>12</b>
<b>2 Considerações gerais .....</b>	<b>16</b>
2.1 Parte I.....	16
2.1.1 Úlceras de pressão .....	16
2.1.2 Insulina, proteínas e peptídeos.....	19
2.1.3 Ciclodextrinas (CDs) .....	27
2.2 Parte II .....	31
2.2.1 Aplicação da ciclodextrina em alimentos .....	31
2.2.2 Curcumina.....	31
<b>3 Fundamentos da Espectroscopia Vibracional.....</b>	<b>35</b>
3.1 Modelo diatômico quântico .....	35
3.1.1 Regras de seleção.....	39
3.1.2 Oscilador anarmônico.....	48
3.2 Vibração de moléculas poliatômicas .....	51
3.3 Raman & Espectroscopia no Infravermelho.....	56
<b>4 Materiais e Métodos.....</b>	<b>59</b>
4.1 Parte I.....	59
4.1.1 Insulina .....	59
4.1.2 Preparação da Mistura Simples e do Complexo HP $\beta$ CD-Insulina(HP $\beta$ CD-I).....	60
4.1.3 Elaboração do GEL (Curativos Não Adesivos) e suas Formulações .....	60
4.1.4 Caracterização dos complexos de inclusão .....	61
4.2 Parte II .....	62
4.2.1 Curcumina .....	62
4.2.2 Métodos para a preparação de complexo .....	62
4.2.3 Caracterização dos complexos de inclusão .....	63
4.3 Arranjo Experimental .....	64
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>72</b>
5.1 Parte I - Complexo de inclusão entre ciclodextrina e insulina .....	72
FT-Raman.....	72
5.1.1 FTIR.....	83

5.1.2	H <sup>1</sup> RMN.....	84
5.1.3	Estudo Clínico .....	86
5.2	Parte II - Complexos de inclusão entre $\beta$ -ciclodextrina e curcumina.....	88
5.2.1	FTIR.....	88
5.2.2	FT-Raman.....	96
5.2.3	Espectroscopia Fotoacústica.....	103
5.2.4	Difração de Raios-X (DRX).....	104
5.2.5	Estudos complementares .....	105
<b>6</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>107</b>
	<b>Apêndices.....</b>	<b>110</b>
<b>A.</b>	<b><i>Espectroscopia vibracional: Modelo diatômico clássico .....</i></b>	<b>111</b>
A.1	Radiação e matéria.....	111
A.2	Modelo vibracional para moléculas diatômicas .....	114
<b>B.</b>	<b><i>Trabalhos publicados durante o desenvolvimento da tese .....</i></b>	<b>123</b>
	<b>Bibliografia.....</b>	<b>128</b>

## Resumo

O objetivo principal deste trabalho foi estudar as propriedades físico químicas de complexos de inclusão entre hidroxipropil-beta-ciclodextrina e insulina (HP $\beta$ CD-I) e de complexos entre beta-ciclodextrina e curcumina ( $\beta$ -CD-C). Foram utilizadas as técnicas FT-Raman, FTIR, FTIR-ATR, Espectroscopia Fotoacústica, além de métodos complementares como a Ressonância Paramagnética Nuclear ( $H^1$ RMN) e a Difração de Raios-X. Os espectros FT-Raman sugeriram que a formação do complexo (HP $\beta$ CD-I) ocorreu por meio da inclusão de aminoácidos aromáticos na cavidade da HP $\beta$ CD, especialmente a tirosina e a fenilalanina. Foram observadas alterações na banda atribuída à vibração de estiramento (C-O-C) das ligações ( $\alpha$  1-4) do agente complexante. Esta ligação é dirigida para dentro da cavidade da HP $\beta$ CD, sugerindo que houve inserção de um hóspede em sua cavidade, confirmando a formação do complexo de inclusão. Como consequência desta interação houve maior estabilidade das ligações dos dissulfetos, além de alteração na estrutura secundária da proteína. Os resultados com a técnica  $H^1$ RMN mostraram que a presença de ciclodextrina induz modificação estrutural na região aromática da insulina, sugerindo haver interação da insulina com HP $\beta$ CD nesta região da proteína, validando os resultados da espectroscopia Raman. No entanto, foi possível concluir que os dados apresentados pela Espectroscopia Raman traz mais informações a respeito do processo de complexação, entre as moléculas, comparado a  $H^1$ RMN. A técnica revelou alterações sofridas pela insulina em diferentes regiões de sua cadeia, devido a complexação com a CD, além de ser não-destrutiva e não haver necessidade do uso de solventes. Os resultados da curcumina obtidos com a técnica FTIR mostraram ausência de bandas da curcumina na região mais significativa da carbonila, indicando que a curcumina estava sob a forma ceto-enol. As técnicas FT-Raman e FTIR apresentaram evidência da formação do complexo entre  $\beta$ -CD e curcumina. Os espectros revelaram alterações nas bandas associadas aos modos de vibração dos anéis aromáticos da curcumina, sugerindo que houve a inserção dos anéis aromáticos da curcumina na cavidade da  $\beta$ -CD. As medidas com a técnica fotoacústica confirmaram esta observação. Os difratogramas de raios-X da curcumina e da  $\beta$ -CD exibiram uma série de linhas finas e intensas, revelando a estrutura cristalina do material. Foram observadas alterações no difratograma do complexo com o desaparecimento de algumas linhas espectrais da curcumina e a formação de novas linhas, características de uma fase sólida cristalina, que corresponde a um complexo de inclusão de mesma natureza. Assim, a difração de raios-X confirmou os resultados que foram obtidos a partir do FTIR, FT-Raman e espectroscopia fotoacústica. Em conclusão, os estudos deste trabalho sugerem que as técnicas empregadas são ferramentas importantes que podem auxiliar no processo de caracterização físico química de complexos formados a partir de ciclodextrinas, uma área de grande importância cien-

tífica e tecnológica, com possibilidades de aplicação nas áreas de novos fármacos e alimentos in natura e processados.

## Abstract

The aim of this work was the study of the physico chemical properties of inclusion complexes between hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and insulin (HP $\beta$ CD-I) and of complexes between beta-cyclodextrin and curcumin ( $\beta$ -CD-C). The techniques were FT-Raman, FTIR, FTIR-ATR, Photoacoustic Spectroscopy, besides complementary methods like Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$ RMN) and X ray diffraction. The FT-Raman spectra suggested that the complex formation occurred through the inclusion of aromatic amino acids in the HP $\beta$ CD cavity, especially tyrosine and phenylalanine. Changes were observed in the band assigned to the (C-O-C) stretching vibration, involving the ( $\alpha$  1-4) bonds of complexing agent. This bond is directed into the HP $\beta$ CD cavity, suggesting that there was insertion of a guest in the CD cavity, confirming the formation of the inclusion complex. As a result of this interaction there was greater stability of the disulfide bonds, in addition to changes in secondary structure of the protein. The results with the  $^1\text{H}$ NMR technique showed that the presence of cyclodextrin induces structural modification in the aromatic region of insulin, suggesting the interaction of insulin with HP $\beta$ CD in this region of the protein, validating the results of the Raman spectroscopy. However, it was concluded that the data presented by Raman spectroscopy provides more information about the complexation process between molecules, compared to  $^1\text{H}$ RMN. The technique showed changes suffered by insulin in different regions of its chain, due to complexation with the CD, in addition to being non-destructive and no need to use solvents. The curcumin results obtained with the FTIR technique showed the absence of the bands in the most significant carbonyl region indicated that curcumin was in the keto-enol form. The FT-Raman and FTIR techniques presented good evidence of the complex formation between  $\beta$ -CD and curcumin. The spectra revealed changes in the bands associated with the vibrational modes of the aromatic rings of curcumin, suggesting that there was insertion of aromatic rings of curcumin into the CD cavity. The measures with the photoacoustic technique confirmed this observation. The X-ray diffractograms of curcumin and  $\beta$ -CD exhibited a series of thin and intense lines revealing the crystalline structure of the material. Changes were observed in the complex diffractogram with the disappearance of some spectral lines of the curcumin and formation of new lines characteristic of a crystalline solid phase, which corresponds to an inclusion complex of the same nature. Thus, the X-ray diffraction confirmed the results which were obtained from FTIR, FT-Raman and photoacoustic spectroscopy. In conclusion, the results of this work suggest that the used techniques are important tools to evaluate the physico chemical properties of inclusion complexes involving cyclodextrin, which is an important scientific and technological area with great possibilities of applications in the development of novel medicines and foodstuffs.

# Capítulo 1

## *Introdução*

Atualmente é reconhecido que novas ferramentas tecnológicas são cada vez mais necessárias para se melhorar a avaliação das propriedades físicas, químicas e funcionais de produtos utilizados para consumo. Os desafios estão sempre voltados para se desenvolver produtos que possam proporcionar melhor qualidade de vida para a população. Neste cenário, a análise físico química é muito importante porque permite avaliar como as propriedades e a composição de um composto pode influenciar sua qualidade. Métodos de caracterização que utilizam técnicas espectroscópicas são ferramentas de grande valor para este fim, permitindo obter informações que podem ser utilizadas no processo de certificação de conformidade do produto desenvolvido. Por exemplo, métodos que utilizam radiação infravermelha como meio de análise podem fornecer informações sobre o comportamento estrutural e a funcionalidade de moléculas e átomos presentes em cada composto.

As ciclodextrinas (CDs) são o objeto de estudo desta tese e têm apresentado uma grande diversidade de aplicações nas mais diferentes áreas porque permitem a formação de complexos de inclusão com inúmeras moléculas. Elas têm sido uma estratégia eficaz para se aumentar a solubilidade e estabilidade de diversas substâncias, ampliando as possibilidades de aplicações que elas podem oferecer. O encapsulamento de moléculas ou átomos em ciclodextrinas tem encontrado aplicações em especial nas áreas farmacêutica e de alimentos.

A insulina e a curcumina são as moléculas de interesse neste trabalho. A insulina no que se refere às suas propriedades cicatrizantes e a curcumina por ser um corante natural de grande interesse na indústria de alimentos. Nos dois casos, o encapsulamento com ciclodextrinas visa melhorar a estabilidade dessas moléculas. No caso da insulina, há ainda a possibilidade dos complexos de inclusão serem utilizados para aplicações que demandam liberação controlada do fármaco, por exemplo, no tratamento de feridas.

A utilização de insulina para efeito de cicatrização é um tema de grande relevância haja vista que as medicações existentes são de baixa eficiência, podem induzir efeitos colaterais nos pacientes e são de alto custo. Além disso, as úlceras que ocorrem em pacientes hospitalizados; com paraplegias; com queimaduras; entre outros fatores adversos, são de difícil tratamento<sup>[11-18]</sup>. Neste cenário, é muito importante que se desenvolva produtos que sejam mais eficientes e seguros e possam auxiliar no processo de cicatrização de feridas. Diversos estudos têm apresentado resultados satisfatórios quando formulações à base de insulina são utilizadas no tratamento de feridas e queimaduras<sup>[9]-[12]</sup>. É sabido que esse hormônio peptídico pode auxiliar a cicatrização<sup>[13][14]</sup>. No entanto, um dos problemas observados é que a insulina pode apresentar foto e termo degradação, e suas moléculas podem se agregar, principalmente por meio da interação entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, o que diminui sua atividade biológica. Como estratégia para superar este problema, a complexação com ciclodextrinas tem sido sugerida<sup>[15]</sup>. As ciclodextrinas apresentam propriedades que permitem o sequestro das partes hidrofóbicas das proteínas, inibindo sua agregação<sup>[15]</sup>. Assim, o complexo de inclusão melhora a ação da proteína e minimiza os processos de desnaturação<sup>[15][16]</sup>.

No caso da curcumina, trata-se de um polifenol hidrofóbico de cor amarelo-alaranjado que é utilizado em alimentos e também em formulações farmacêuticas. Por apresentar baixa solubilidade em água e sensibilidade a diversos agentes externos, seu uso ainda é limitado<sup>[17][18]</sup>. No entanto, a complexação com ciclodextrina pode melhorar a estabilidade e a solubilidade desse corante promovendo sua utilização em escala industrial<sup>[19]</sup>. Sua aplicação em alimentos é de interesse devido à crescente procura por produtos naturais visando substituir os corantes sintéticos<sup>[19]</sup>. Além disso, é uma das especiarias mais populares, contém antioxidantes naturais, possui atividades anti-inflamatórias, anticarcinogênica, antimutagênica, antiartrítica, antibacteriana, antifúngica, entre outras<sup>[17][18][20]</sup>.

As propriedades físicas e químicas das moléculas podem ser alteradas por sua interação com as ciclodextrinas por meio do complexo de inclusão, cuja formação é um ajuste dimensional entre a cavidade lipofílica da ciclodextrina e a molécula hóspede<sup>[21]</sup>. A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula deva se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente dentro da cavidade<sup>[22]</sup>. Avaliar a interação e formação do complexo entre as moléculas é uma importante etapa em estudos envolvendo as ciclodextrinas. Diversas técnicas têm sido empregadas com este propósito, como a Ressonância Magnética Nuclear, considerada padrão nestas análises.

No entanto, técnicas não-destrutivas e menos onerosas, não envolvendo a utilização de solventes e preparações prévias das amostras, otimizando o tempo das análises, têm sido avaliadas para este fim. Baseadas na vibração molecular, a Espectroscopia Raman e a Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) têm se destacado por apresentarem as características mencionadas, além de revelarem importantes informações sobre as ligações químicas existentes no material em estudo. Cada ligação vibra em uma frequência específica e bem determinada, assim modificações geradas pela complexação em regiões específicas da molécula podem ser acompanhadas pelos espectros gerados por ambas as técnicas. Elas podem não somente informar a formação do complexo, mas sugerir em quais regiões da molécula está ocorrendo a interação, e quais as ligações por ela modificadas.

A Espectroscopia Fotoacústica (PAS) é uma técnica que tem como vantagem permitir estudos em praticamente toda faixa de comprimentos de onda do espectro eletromagnético, permitindo que a amostra seja avaliada sem preparação prévia e nas formas de pó, pastosa, sólida, líquida e gasosa. Neste trabalho utilizaremos a técnica nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível visando avaliar as bandas de absorção geradas a partir de processos envolvendo transições eletrônicas.

Finalmente, técnicas complementares como a Ressonância Magnética Nuclear ( $H^1$ NMR) e Difração de Raios-X também serão utilizadas.

Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi utilizar as Espectroscopias Raman, FTIR e Fotoacústica, aliadas aos métodos Ressonância Magnética Nuclear e Difração de Raios- X para:

- Avaliar a complexação da insulina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP $\beta$ CD);
- Obter os espectros vibracionais da insulina e da HP $\beta$ CD e associá-los as ligações químicas existentes nos materiais;
- Investigar quais ligações químicas da insulina são modificadas pela interação com a ciclodextrina, caso ocorra a formação do complexo. Conseqüentemente, sugerir quais são as regiões da molécula que são encapsuladas pela cavidade da HP $\beta$ CD, visto que a interação ocorre localmente no peptídeo;
- Obter os espectros vibracionais da ciclodextrina, curcumina, suas misturas físicas e o possível complexo de inclusão formado entre elas, e associá-los às ligações químicas existentes nos materiais;
- Avaliar a formação do complexo de inclusão, entre a curcumina e a ciclodextrina, para sua aplicação em alimentos;

- 
- Caso ocorra o encapsulamento, investigar quais ligações químicas da curcumina são alteradas pela interação com a ciclodextrina, a fim de sugerir quais regiões da molécula são inseridas na cavidade da CD.

## Capítulo 2

### *Considerações gerais*

Neste capítulo serão apresentadas informações sobre os materiais e conceitos envolvidos que consideramos relevantes para o entendimento e execução do presente trabalho. Primeiro abordaremos sobre as propriedades das proteínas, insulina e sobre a complexação da insulina em ciclodextrina, com a finalidade de se obter os complexos e uma formulação farmacêutica. Como esta formulação foi testada no tratamento de úlcera de pressão, uma breve descrição sobre estas úlceras será apresentada, apenas para justificar a importância do material estudado, uma vez que esses testes fazem parte da tese de doutorado da doutoranda Sóstenes Rosa Valentini. A referida tese também será defendida nos próximos meses. A segunda etapa refere-se ao estudo das propriedades da curcumina e de seu complexo de inclusão com ciclodextrina, além da breve discussão dos resultados das aplicações na área de alimentos. Este estudo também foi em colaboração com a área de Farmácia, tendo sido tema da dissertação de mestrado da aluna Camila Sampaio Mangolim<sup>[23]</sup>.

## **2.1 Parte I**

### **2.1.1 Úlceras de pressão**

A úlcera de pressão é uma lesão localizada da pele e/ou tecido subjacente que em geral ocorre sobre uma proeminência óssea ou superfície de apoio, induzida por pressão, fricção e cisalhamento<sup>[3][4][24]</sup>. As lesões ocorrem quando o tecido mole é comprimido entre uma protuberância óssea e uma superfície externa (cama e cadeira de rodas) por um período prolongado de tempo<sup>[3]</sup>. Podem envolver diversos tecidos: epiderme, derme,

tecido adiposo (subcutâneo), músculos e ossos, como mostrado na Figura 2.1. A pressão continuada pode provocar o bloqueio do fluxo sanguíneo causando isquemia\* e lesão de reperfusão† do tecido. Ambas contribuem para a destruição das células e necrose‡ do tecido<sup>[3]</sup>.

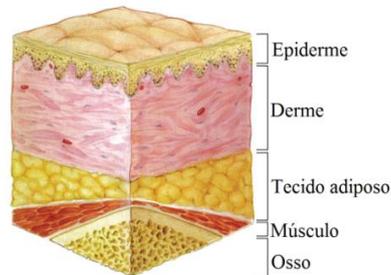


Figura 2.1– Representação estrutural dos tecidos que são afetados pela ulcera de pressão [24].

A distribuição da pressão sobre os tecidos descreve uma forma cônica, com a base maior localizada na profundidade próxima aos ossos, e menor na superfície da pele. Além disso, cada tecido apresenta resistência diferente à isquemia, a pele, por exemplo, suporta-a por períodos maiores quando comparada aos músculos, cuja resistência é menor<sup>[3][26]</sup>. Essas características conferem à lesão tecidual um aspecto que pode ser associado a um “iceberg”, com a área acometida de pele, em geral, menor do que a área muscular atingida<sup>[3]</sup>. Algumas características crônicas da lesão e a presença de escaras§ conduzem a uma avaliação nem sempre precisa promovendo muitas vezes uma dificuldade em classificá-las<sup>[3]</sup>. Os estágios para as úlceras de pressão estão ilustrados na Figura 2.2.

Embora as úlceras sejam geradas pela pressão sobre o tecido, o cisalhamento\*\* e a fricção†† podem contribuir para a formação e progressão da lesão, além de dificultar o seu tratamento<sup>[29]</sup>. Segundo Costa e colaboradores (2010), evitar esses fatores agravantes são de extrema importância nos cuidados ao paciente. Isso porque o processo de surgi-

\* Deficiência na oxigenação tecidual; suprimento sanguíneo insuficiente<sup>[25]</sup>.

† Termo usado para descrever as alterações, funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia<sup>[25][28]</sup>

‡ Morte celular<sup>[25]</sup>.

§ Tecido necrótico que recobre as úlceras<sup>[3]</sup>.

\*\* Tração exercida sobre a pele, fazendo-a deslizar sobre o plano muscular<sup>[3]</sup>.

†† Lesão causada pelo atrito entre duas superfícies (a pele e a superfície de apoio), levando à formação de ferida por lesão direta da pele<sup>[3]</sup>.

mento das úlceras pode acontecer em 24 horas ou levar até 5 dias para sua manifestação. Ainda segundo o autor, alguns estudos indicam que pressões entre 60 e 580 mmHg no período de 1 a 6 horas podem ocasionar uma úlcera. Na Figura 2.3 foram indicados os principais pontos de localização das lesões.

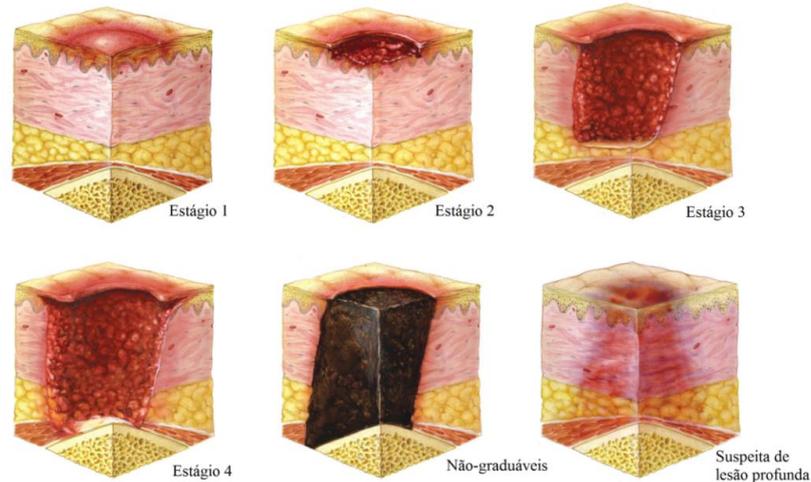


Figura 2.2–Estágios das úlceras por pressão<sup>[24]</sup>.

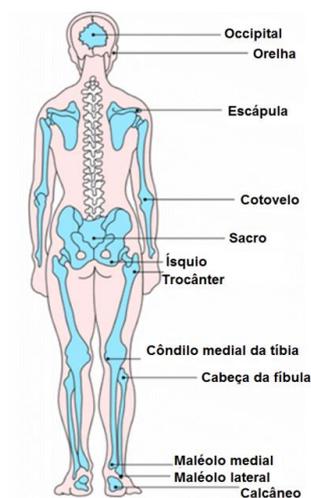


Figura 2.3–Principais pontos de localização das úlceras por pressão<sup>[30]</sup>.

A natureza multifatorial e complexa faz das úlceras de pressão um grande problema de saúde<sup>[1][2]</sup>. Rocha e colaboradores (2006) mencionam que ela pode prolongar a duração do internamento hospitalar em até 5 vezes. E que a taxa de recorrência é de 36% independentemente do tratamento ser cirúrgico ou não.

Conhecido o impacto que é causado pelas úlceras na saúde, novos estudos que venham a contribuir para a prevenção e tratamento são de extrema importância. Desta

forma, o desenvolvimento de produtos com formulações cicatrizantes podem trazer inúmeros benefícios. Isto porque o processo de cicatrização de feridas é complexo e envolve diversos fatores e fases sequenciais que se sobrepõem no espaço e no tempo de forma dinâmica<sup>[13][14]</sup>. A perfeita regeneração do tecido nem sempre ocorre, principalmente quando são consideradas feridas crônicas como é o caso das úlceras por pressão<sup>[14]</sup>.

O processo de cura ocorre por re-epitelização a partir das bordas das lesões, envolvendo a proliferação, migração e diferenciação de queratinócitos\*. Ela requer a restauração da epiderme e a formação da junção entre essa camada e a derme, fato este que representa um grande avanço para um tratamento eficaz. Isto porque a epiderme constitui uma importante barreira natural contra infecções e mantém a tase<sup>†[13][14]</sup>. Formulações contendo insulina têm sido utilizadas no tratamento de feridas porque se trata de um hormônio que mantém o crescimento e o desenvolvimento de diferentes tipos de células<sup>[13][14]</sup>.

### **2.1.2 Insulina, proteínas e peptídeos.**

A insulina é um importante hormônio secretado pelas células de Langerhans no pâncreas, tem como função controlar o nível de glicose no sangue ao regular a sua produção e armazenamento<sup>[25]</sup>. É considerada uma pequena proteína (polipeptídeo) globular com massa molecular de 5808 Da, e foi a primeira proteína a ser sequenciada, em 1955, por Frederick Sanger<sup>[31][32][33]</sup>.

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes, presentes em todas as células e suas partes, desempenhando funções essenciais para os seres vivos. São de grande variedade, milhares de diferentes tipos podem ser encontrados em uma única célula. Exibem elevada diversidade de funções, entre elas as regulatórias, controlando as condições intracelulares e extracelulares e mandando informações às outras células. Na classe das funções dinâmicas incluem o transporte, controle metabólico e a contração. No transporte, destaca-se a hemoglobina e mioglobina que transportam oxigênio no sangue e no músculo, respectivamente<sup>[34]</sup>. O principal componente estrutural do cabelo,

---

\* São as células mais presentes na epiderme.

† Manutenção de um estado de equilíbrio em um organismo. Exemplo: Controle da temperatura corporal ( homeostase térmica).

unhas, chifres, lã, pena e escamas é a queratina, uma proteína produzida por todos os vertebrados<sup>[33]</sup>.

Independente da função ou tamanho, todas as proteínas são constituídas por um conjunto de 20 aminoácidos-padrão, unidos entre si por ligações covalentes em sequências lineares características<sup>[35]</sup>. A ligação entre os aminoácidos é formada pela remoção dos elementos da água de um grupo carboxílico (COOH) de um aminoácido e um grupo amino (NH<sub>2</sub>) de outro aminoácido. Quando duas moléculas de aminoácidos se ligam formam um dipeptídeo, e a ligação amídica entre eles é denominada ligação peptídica<sup>[33][36]</sup>. O processo de formação de um dipeptídeo está representado na Figura 2.4.

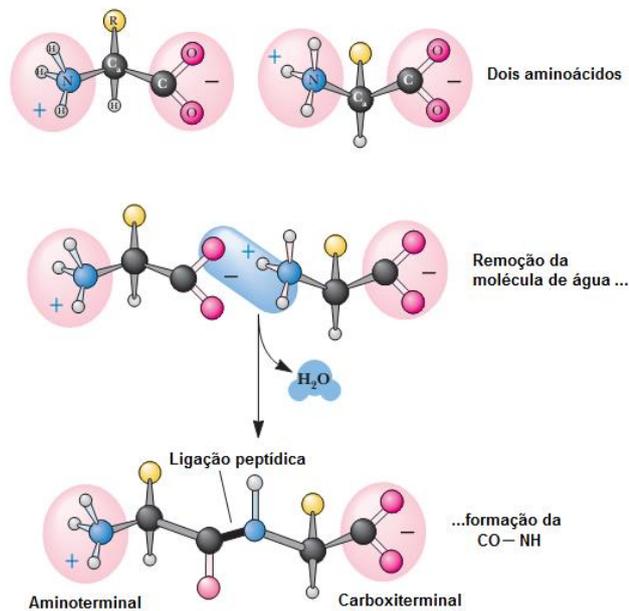


Figura 2.4—Ligação peptídica na formação de um dipeptídeo<sup>[36]</sup>.

Na Figura 2.4 pode-se observar que os aminoácidos apresentam uma base comum e diferem apenas nas estruturas de suas cadeias laterais (grupo R). Cada um dos 20 aminoácidos-padrão apresenta um grupo R específico, responsável por sua propriedade química. Eles podem ser divididos em: apolares, aromáticos, polares carregados positivamente e negativamente e não carregados<sup>[33][35]</sup>.

Quando três aminoácidos se juntam forma-se um tripeptídeo, assim como, a união de quatro aminoácidos forma um tetrapeptídeo, e assim sucessivamente até formar um polipeptídeo. Embora muitas vezes o termo polipeptídeo seja usado como proteína, e vice-versa, moléculas referidas como polipeptídeos em geral possuem massas moleculares abaixo de 10.000, enquanto que as chamadas de proteínas possuem massas moleculares maiores. A Figura 2.5 apresenta a formação de um pequeno peptídeo, com a

direção da cadeia indicada. Em um peptídeo o resíduo \*de aminoácido na extremidade com o grupo amino livre é chamado de resíduo aminoterminal (N-terminal). Já o resíduo na outra extremidade com o grupo carboxil livre é denominado resíduo carboxiterminal (C-terminal).

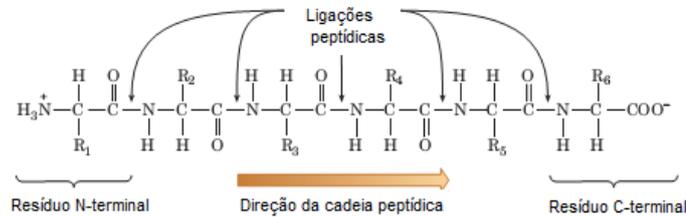


Figura 2.5–Formação de um peptídeo mostrando a direção da cadeia peptídica (N-terminal para C-terminal)<sup>[35]</sup>.

As proteínas se organizam em níveis estruturais, denominados: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária consiste na sequência de aminoácidos, da cadeia ou cadeias polipeptídicas, ligados uns aos outros por uma ligação peptídica. Compreender esse sequenciamento é obter informação essencial sobre as proteínas <sup>[35]</sup>, uma vez que:

1. Este é um pré-requisito para determinar a sua estrutura tridimensional, e a partir desta entender seus mecanismos moleculares de ação.
2. A comparação da sequência entre proteínas revela as relações evolucionárias entre elas e os organismos que a produzem e dispõe elementos para entender a sua função.
3. Pode ajudar no desenvolvimento de testes diagnósticos e de terapia eficazes em muitos casos de doenças geneticamente herdadas. Isso por que elas são causadas por mutações que provocam a troca de um aminoácido na proteína.

Níveis superiores de organização da proteína referem-se às propriedades conformacionais geradas não-covalentemente<sup>[34]</sup>. A conformação<sup>†</sup> de uma cadeia polipeptídica pode ser descrita pelos ângulos de rotação das ligações covalentes. Eles se localizam entre os carbonos dos grupamentos amina e carboxila que participam da cadeia. Como algumas destas ligações possuem liberdade para rotação, a proteína pode assumir algu-

\* O termo resíduo se refere à parte restante do aminoácido após a perda dos elementos de água quando ocorre a ligação peptídica <sup>[33]</sup>.

† Arranjo espacial dos átomos em uma proteína <sup>[33]</sup>.

mas conformações<sup>[33]</sup>. As ligações e ângulos que participam da rotação da cadeia são mostrados na Figura 2.6.

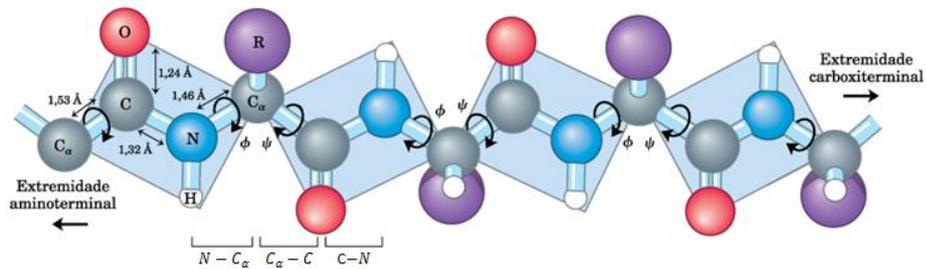


Figura 2.6–Representação de um grupo peptídico formado pelas ligações peptídicas rígidas e planares. Apenas as ligações  $N - C_{\alpha}$  e  $C_{\alpha} - C$  tem liberdade para rotacionar, e são descritas pelos ângulos  $\Phi$  e  $\psi$ . A ligação peptídica  $C - N$  não está livre para a rotação<sup>[33]</sup>.

A estrutura secundária das proteínas é o arranjo dos átomos de um esqueleto peptídico\*, sem considerar a conformação das suas cadeias laterais<sup>[33]</sup>. Quando os ângulos de rotação ( $\Phi$  e  $\psi$ ), também conhecidos como ângulos diedros, permanecem iguais, e se repetem ao longo do segmento da cadeia principal a estrutura secundária é dita regular. Esse tipo de estrutura acontece de forma extensa e estável em proteínas. As mais comuns são as  $\alpha$ -hélices e as conformações  $\beta$ , representadas na Figura 2.7<sup>[33]</sup>.

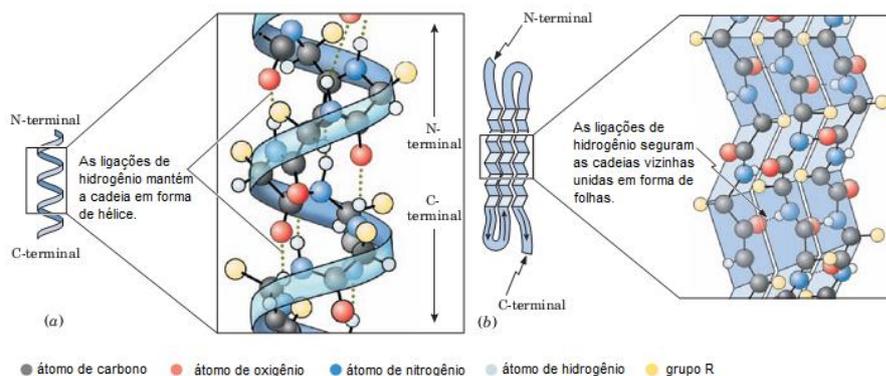


Figura 2.7– Estrutura secundária das proteínas: (a)  $\alpha$ -hélice, (b)  $\beta$ -folhas<sup>[36]</sup>.

Na estrutura  $\alpha$ -hélice, o esqueleto polipeptídico é enrolado em torno de uma linha imaginária traçada longitudinalmente no centro da hélice, como mostra a Figura 2.7-(a). Os grupos R dos resíduos de aminoácidos ficam projetados para fora do esqueleto helicoidal<sup>[33]</sup>. Nessa geometria, são formadas pontes de hidrogênio arranjadas de forma que

\* Também conhecido como cadeia principal refere-se aos átomos que participam das ligações peptídicas, ignorando as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos [33].

a ligação peptídica  $C = O$  do  $n$ -ésimo resíduo aponta, ao longo do eixo da hélice, na direção do grupo peptídico  $N-H$  do resíduo  $(n+4)$ . Isto resulta em uma ligação de hidrogênio forte que tem uma distância  $N \cdots O$  quase ideal de  $2,8 \text{ \AA}$ <sup>[34]</sup>.

Analogamente a  $\alpha$ -hélice, as estruturas  $\beta$  também utilizam ligações de hidrogênio, mas se apresentam com a forma de uma folha pregueada ( $\beta$ -folhas), e ocorrem entre as cadeias polipeptídicas vizinhas Figura 2.7-(b). As cadeias laterais se projetam para cima e para baixo da estrutura em folha pregueada e podem apresentar-se em duas configurações: as paralelas, cujas cadeias se estendem na mesma direção, e as antiparalelas, com as cadeias seguindo direções opostas<sup>[35]</sup>.

Na estrutura  $\beta$  existem ainda duas conformações, as do tipo  $\beta$ -volta, em que os resíduos de aminoácidos estão em forma de voltas ou alças onde a cadeia polipeptídica inverte sua direção. E também as de estrutura randômicas (desordenadas), que não apresentam regularidade<sup>[33]</sup>.

O próximo nível organizacional é a estrutura terciária, que se refere ao arranjo tridimensional total dos átomos de uma proteína. Ela descreve o dobramento dos elementos estruturais secundários e especifica as posições de cada átomo incluindo as cadeias laterais<sup>[35]</sup>. Inclui ainda aspectos de longo alcance na estrutura primária, em que aminoácidos que estão distantes na sequência polipeptídica podem interagir, mesmo que estejam em estruturas diferentes, na estrutura dobrada da proteína<sup>[33]</sup>. Em geral são estabilizadas por ligações covalentes (como as pontes dissulfeto), ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes salinas (atração eletrostática) e compostos metálicos, representados na Figura 2.8<sup>[37]</sup>.

A maioria das proteínas é constituída por duas ou mais cadeias polipeptídicas distintas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou não e associam-se com uma geometria específica. O arranjo dessas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária, o último nível organizacional das proteínas.<sup>[33][35]</sup>. Estas subunidades se mantêm unidas por forças covalentes, como pontes de dissulfetos, e ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc<sup>[37]</sup>. A primeira proteína oligomérica\* que teve a sua estrutura tridimensional determinada foi a hemoglobina. Ela contém quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos hemes, nos quais os átomos de ferro se apresentam no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ )<sup>[33]</sup>. As quatro estruturas, desde a primária até a quaternária, para a molécula de hemoglobina está representada na Figura 2.9.

---

\* Proteínas com mais de uma subunidade<sup>[35]</sup>.

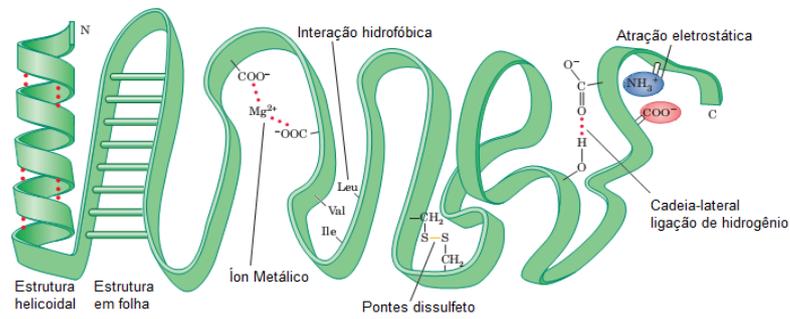


Figura 2.8–Forças que estabilizam a estrutura terciária das proteínas. Na interação hidrofóbica as siglas, Leu, Val, e Ile correspondem aos aminoácidos, leucina, valina, e isoleucina, respectivamente<sup>[33]</sup>.

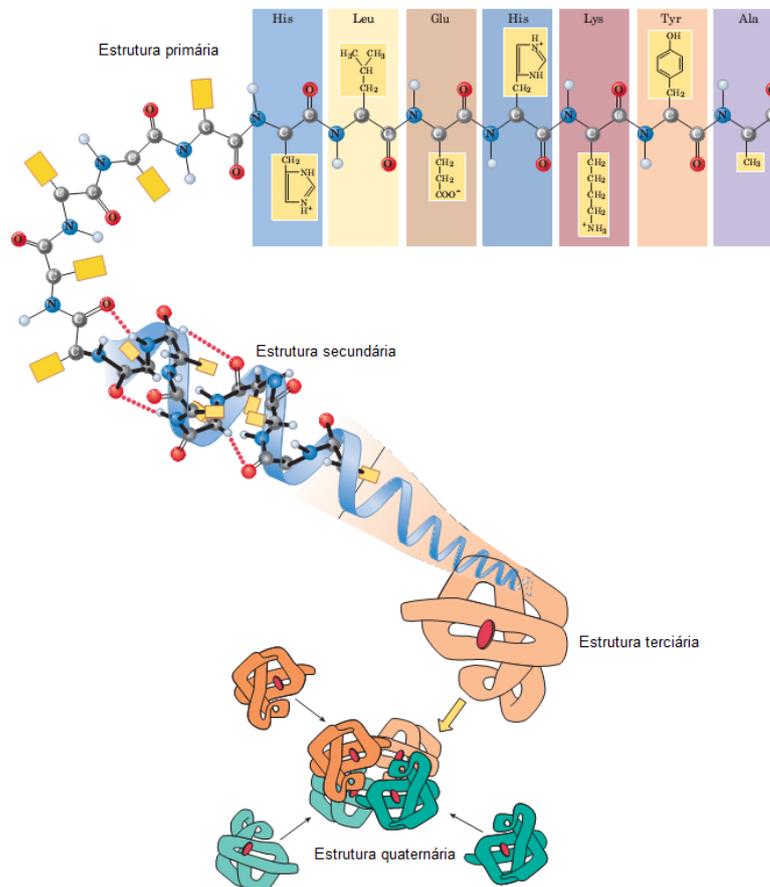


Figura 2.9– Estruturas, primária, secundária, terciária e quaternária para a proteína hemoglobina<sup>[36]</sup>.

Algumas proteínas são sintetizadas em polipeptídeos simples, que posteriormente são clivados\* em duas ou mais cadeias que permanecem associadas. A insulina é um

\* Quebrados, divididos.

exemplo deste tipo de proteína<sup>[35]</sup>. Ela é produzida no pâncreas como um precursor inativo de uma só cadeia, a pré-pró-insulina. Esta é composta por uma sequência sinalizadora aminoterminal, que direciona sua passagem para as vesículas de secreção. Em seguida, um seguimento de 23 aminoácidos (a sequência sinalizadora) é removido e a formação de três ligações dissulfeto gera a pró-insulina, que é armazenada nas células  $\beta$  pancreáticas<sup>[33]</sup>. A pró-insulina é convertida em insulina ativa por proteases\* específicas, que hidrolisam duas ligações peptídicas e formam a molécula de insulina madura. Nesse processo o peptídeo C é removido e posteriormente processado nas células das ilhotas pancreáticas e secretado no sangue com insulina<sup>[34]</sup>. As etapas descritas acima estão representadas na Figura 2.10.

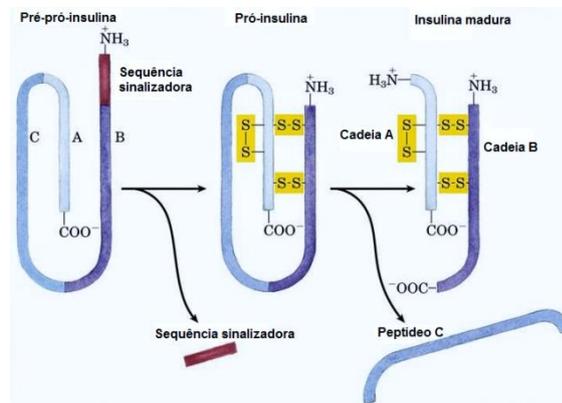


Figura 2.10 – Clivagem da pré-pró-insulina em insulina madura, biologicamente ativa<sup>[33]</sup>.

A insulina madura é formada por duas cadeias polipeptídicas, a A com 21 resíduos de aminoácidos e a B com 30 resíduos. Elas são ligadas por duas pontes dissulfeto conectando os resíduos de cisteína A7 e B7 e os resíduos A20 e B19. A cadeia A tem uma ponte dissulfeto interna entre os resíduos A6 e A11<sup>[31][38]</sup>. A estrutura primária da insulina está representada na Figura 2.11. Pode-se verificar que três aminoácidos estão destacados na cadeia polipeptídica, nas posições A8, A10 e B30. Esses aminoácidos dessas posições variam para diferentes animais e aparentemente não influenciam suas propriedades biológicas. Essas trocas não variam significativamente a estrutura tridimensional das insulinas, em relação à insulina humana. Por apresentar esta propriedade as insulinas, bovina e porcina, são comumente usadas no tratamento do diabetes humano. Geralmente a insulina de porco é mais aceita que a bovina por ter a sequência de aminoácidos mais parecida com a humana, como mostrado na Tabela 2.1.

\* Enzima que hidrolisa ligações peptídicas.

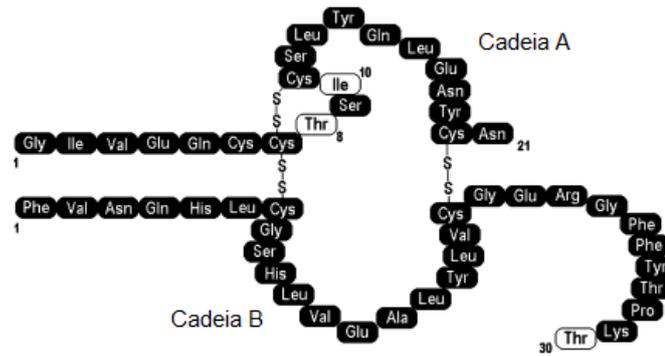


Figura 2.11–Estrutura primária da insulina humana. Os aminoácidos representados em branco são os únicos lugares em que a insulina humana, bovina e porcina diferem em suas cadeias<sup>[38]</sup>.

Tabela 2.1-As diferenças de sequência entre as insulinas bovina, humana e porcina<sup>[38]</sup>.

<i>Resíduo</i>	<i>Bovina</i>	<i>Humana</i>	<i>Porcina</i>
A8	Ala	Thr	Thr
A10	Val	Ile	Ile
B30	Ala	Thr	Ala

Ala- Alanina; Thr- Treonina; Val- Valina; Ile- Isoleucina.

Sabe-se que a insulina pode sofrer agregação devido à interação envolvendo resíduos hidrofóbicos. Isto resulta em redução da atividade biológica, causando dificuldades para se obter formulações farmacêuticas<sup>[15]</sup>. A complexação com ciclodextrina tem minimizado este problema porque o complexo de inclusão melhora a ação da proteína, por estabilizá-la contra a agregação, desnaturação térmica e degradação<sup>[15]</sup>.

A interação da ciclodextrina com as proteínas pode acontecer em locais específicos da cadeia proteica<sup>[39]-[42]</sup>, isto é, nas regiões hidrofóbicas acessíveis. Assim, resíduos de aminoácidos como a fenilalanina e tirosina podem ser incluídos na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Aachmann e colaboradores (2003) mostraram que esse efeito pode explicar porque os complexos de ciclodextrinas com proteínas podem minimizar a agregação e aumentar a proteção contra a degradação e alteração da função. Isto seria possível uma vez que os resíduos causadores destes problemas na molécula estariam envolvidos e conseqüentemente protegidos pela ciclodextrina.

### 2.1.3 Ciclodextrinas (CDs)

Ciclodextrinas, também conhecidas como dextrinas de Schardinger, são oligossacarídeos cíclicos, contendo de seis a doze unidades de glucose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (Figura 2.12-(a))<sup>[43][44][45]</sup>. As CDs mais conhecidas possuem 6, 7 ou 8 unidades, denominadas respectivamente de  $\alpha$ -CD (ciclohexaamilose),  $\beta$ -CD (cicloheptaamilose) ou  $\gamma$ -CD (ciclooctaamilose)<sup>[44]</sup>. Elas são substâncias cristalinas, homogêneas e não-tóxicas, que são formadas durante a decomposição de um componente de amido, amilose, o que é feito com o uso de enzimas<sup>[44]</sup>.

As CDs apresentam geometria de um cone truncado com um lado mais largo formado pelos grupos de hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e um mais estreito composto por um grupo de hidroxilas primárias, ligadas em C-6, como mostra a Figura 2.12-(b)<sup>[43][44]</sup>.

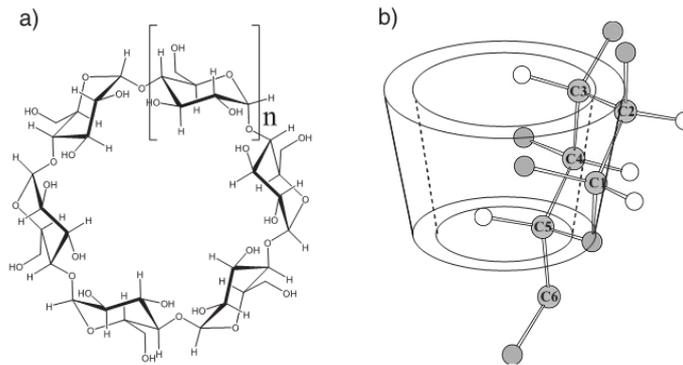


Figura 2.12–(a) A estrutura geral das ciclodextrina. (b) na forma de cone truncado<sup>[43]</sup>.

A cavidade interior é hidrofóbica revestida por grupos C-H (em C-3 e C-5) e oxigênios glicosídicos (em C-1 e C-4), proporcionando um ambiente menos polar do que o da água. Esta cavidade confere às CDs a capacidade de formar complexos de inclusão, atuando como encapsuladoras ao nível molecular, causando alterações nas propriedades físicas e químicas das moléculas hóspedes<sup>[21][46][47]</sup>. Nas CDs tem-se um anel de ligações intramoleculares entre os grupos de hidroxilas e unidades de glucose adjacentes, o que resulta em uma estrutura rígida mostrada na Figura 2.13. Em que estão representadas em destaque as ligações (C-O-C), que une as unidades de glucose uma à outra, e são de extremo interesse nas análises de complexação, visto que tal ligação se encontra voltada para o interior da cavidade.

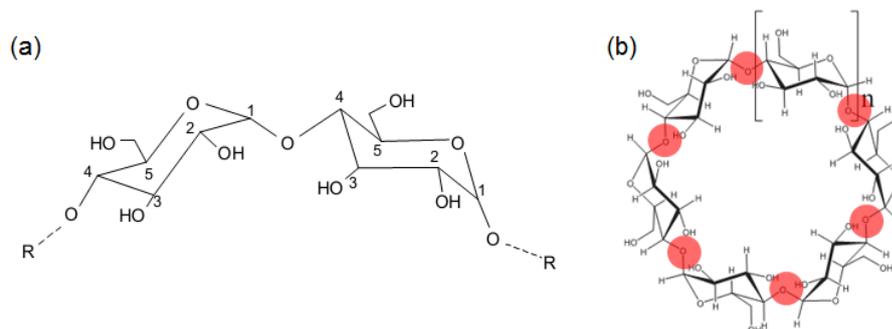


Figura 2.13– (a)-O enlace glicosídico entre duas unidades de glicose, (b)- as ligações (C-O-C) em destaque, que une as unidades de glicose<sup>[48]</sup>.

A dimensão da cavidade da CD aumenta proporcionalmente ao número de unidades de glicose: 0,57, 0,78, 0,95 nm para  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente. No entanto, a profundidade permanece igual a 7,9Å, para todas, como ilustra a Figura 2.14. O volume da cavidade das ciclodextrinas é de 174 Å<sup>3</sup> ( $\alpha$ -CD), 262 Å<sup>3</sup> ( $\beta$ -CD), e 472 Å<sup>3</sup> ( $\gamma$ -CD)<sup>[44]</sup>.

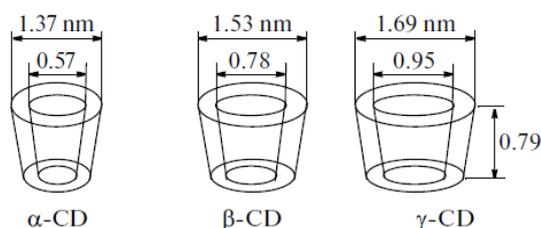


Figura 2.14 – Dimensões da cavidade das ciclodextrinas:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD<sup>[44]</sup>.

As ciclodextrinas são facilmente solúveis em água porque todos os grupos livres de hidroxilas estão localizados na superfície exterior do anel, proporcionando a dissolução de compostos hóspedes que apresentam baixa solubilidade<sup>[21][44]</sup>. Sua produção global é estimada em dezenas de milhares de toneladas o que a torna facilmente disponível<sup>[22][44]</sup>.

As hidroxilas podem ser modificadas quimicamente a fim de expandir as propriedades físico-químicas das ciclodextrinas melhorando a sua capacidade de formação de complexo de inclusão. A  $\beta$ -CD, por exemplo, possui 21 grupos de hidroxilas que podem ser alterados, substituindo átomos de hidrogênio ou um grupo de hidroxila por uma variedade de grupos substituintes<sup>[21][49]</sup>. Um exemplo dessa metodologia é a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). Essa molécula modificada apresenta uma maior solubilidade em água e a não formação de precipitado de complexos cristalinos a altas concentrações, quando comparada a CD que lhe deu origem<sup>[21][46]</sup>. A Figura 2.15 mostra a estrutura molecular da HP- $\beta$ -CD.

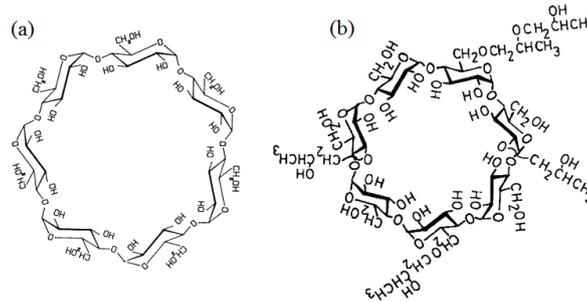


Figura 2.15– Estruturas: a)  $\beta$ -CD e b) HP- $\beta$ -CD<sup>[49]</sup>.

Devido a essas características, as CDs podem formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos<sup>[22][46]</sup>. Nestes complexos, a molécula hóspede se ajusta dentro da cavidade lipofílica da molécula de CD, desde que seu tamanho seja compatível com a cavidade<sup>[44]</sup>. A condição mínima para sua formação é que a molécula hóspede deve se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente dentro da cavidade da CD<sup>[22]</sup>. Ela pode ser inserida pelos dois lados da cavidade haja vista que ambas as partes das cavidades isoladas das moléculas de CD são abertas<sup>[44]</sup>. Esse arranjo geométrico da molécula hóspede com a cavidade da CD é ainda mais importante do que fatores químicos. Ligações covalentes não são quebradas ou formadas durante a formação do complexo<sup>[22]</sup>

Os complexos podem ser formados no estado cristalino bem como em solução, e o solvente mais utilizado é a água<sup>[22]</sup>. Para complexos em solução, a principal força motriz atuante em sua formação é a liberação de moléculas de água de alta entalpia da cavidade. Nesse processo a molécula mais hidrofóbica presente na solução desloca as moléculas de água expulsando-as da cavidade<sup>[22][44]</sup>. A Figura 2.16 ilustra o processo de formação do complexo de inclusão.

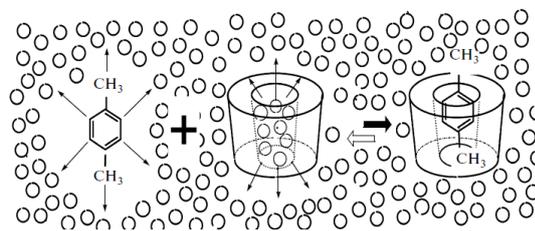


Figura 2.16– A formação de um complexo de inclusão com uma molécula hóspede hidrofóbica<sup>[44]</sup>.

Os complexos de inclusão são formados com maior frequência na proporção 1:1(CD-hóspede), mas podem também ser obtidos com estequiometria 1:2, 2:1e 2:2, que dependerá do tamanho e característica estrutural das moléculas hóspedes em relação à cavidade hospedeira da CD<sup>[44]</sup>. Para exemplificar diferentes estequiometrias em comple-

xos, a Figura 2.17 ilustra dois complexos de inclusão entre a ciclodextrina e a molécula de paraciclofano.

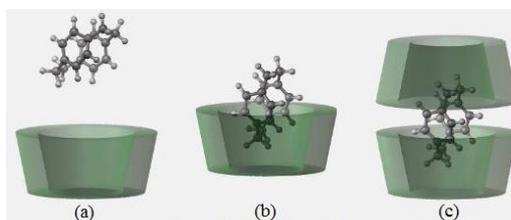


Figura 2.17—Representação esquemática: (a) paraciclofano e ciclodextrina livres, (b) complexo entre as duas moléculas na proporção 1:1, (c) complexo na proporção 2:1<sup>[50]</sup>.

Complexos podem ainda ser obtidos entre CDs e macromoléculas, como peptídeos e proteínas<sup>[39][42][51][52]</sup>. Isto acontece porque a ciclodextrina tem a capacidade de encapsular determinados domínios hidrofóbicos presentes na cadeia peptídica. Embora a interação aconteça localmente, cada uma delas pode alterar a estrutura tridimensional global da molécula, provocando assim, mudanças em suas propriedades químicas e biológicas<sup>[39]</sup>. Isto faz da ciclodextrina uma valiosa ferramenta na indústria farmacêutica. Ela pode não somente melhorar a solubilidade e a entrega de drogas, mas também aumentar a durabilidade do produto, estabilizando a proteína contra a agregação, desnaturação térmica e degradação<sup>[42]</sup>. É o que acontece, por exemplo, com os hormônios de crescimento e a insulina<sup>[32][40][53]</sup>. A Figura 2.18 ilustra um complexo de inclusão entre uma proteína e ciclodextrina.

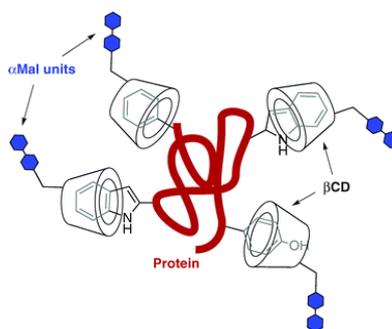


Figura 2.18—A formação de um complexo de inclusão entre ciclodextrina e uma molécula de proteína<sup>[51]</sup>.

A aplicabilidade das ciclodextrinas na indústria é bem ampla. Elas são usadas em alimentos, fármacos, cosméticos, produtos domésticos, agroquímicos, indústria têxtil, indústria de papel, tecnologia química, química analítica, etc.<sup>[54]</sup>.

## 2.2 Parte II

### 2.2.1 Aplicação da ciclodextrina em alimentos

Na indústria alimentícia, a complexação com ciclodextrinas, tem sido recomendada por uma variedade de benefícios: protege o componente lipofílico contido no alimento que são sensíveis a degradação frente ao oxigênio, luz e calor; para solubilizar os corantes alimentares e vitaminas; estabilizar perfumes, sabores, vitaminas e óleos essenciais contra alterações indesejadas; para suprimir os odores desagradáveis ou gostos; entre outras<sup>[48][55]</sup>. Produtos bactericidas, enzimas de plantas, vitaminas, óleos, gorduras e antioxidantes, são exemplos de substâncias aromáticas que podem ser complexadas antes de serem incorporadas à composição de alimentos industriais<sup>[54]</sup>.

A estabilização, considerada como uma das principais vantagens do uso das CDs no processamento de alimentos promove uma melhoria na qualidade final do produto, no que se refere ao sabor, aroma, forma e cor. Tem sido usada em sopas de peixe, queijos, sucos de frutas, manteiga, chás, etc. Pode ser usada para proteger matérias quimicamente instáveis<sup>[54]</sup>.

Entre as características que um produto alimentício deve possuir para uma boa aceitação pelos consumidores está sua cor. Isto faz dos corantes produtos indispensáveis na indústria alimentícia. Atualmente, muitos esforços têm sido feito para se substituir corantes sintéticos, devido sua toxicidade nociva à saúde humana, por produtos naturais<sup>[19]</sup>. Contudo, a baixa solubilidade em água e sensibilidade a condições alcalinas, tratamento térmico, luz, íons metálicos, entre outras, limita o uso desses compostos naturais pela indústria. Uma alternativa que vem sendo estudada para superar esse problema é a complexação de corantes naturais com ciclodextrinas<sup>[17][19]</sup>. Como já mencionado, seu uso pode melhorar a estabilidade e a solubilidade de muitos compostos, e neste caso, promover a utilização do produto em escala industrial.

### 2.2.2 Curcumina

A curcumina é um polifenol hidrofóbico amarelo-alaranjado. É derivada da cúrcuma, um pó extraído do rizoma da planta *Curcuma longa L.*, considerada uma das especiarias mais populares. Ela contém antioxidantes naturais<sup>[17][18][20]</sup>. A cúrcuma é amplamente utilizada na culinária indiana e por sua cor e sabor é conhecida como “açafraão

da Índia<sup>[56]</sup>. Quando misturada com outras especiarias e nomeada de “pó curry”, como é conhecida no ocidente<sup>[57]</sup>.

Produtos a base de curcumina já foram classificados como seguros por diferentes órgãos governamentais como a FDA, Food and Drug Administration, dos Estados Unidos, e pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>[57][58]</sup>. Segundo Basnet (2011, p.4569), o primeiro artigo científico registrado referindo-se a curcuma foi publicado em 1748, e a primeira avaliação sobre seu potencial farmacológico foi realizada 67 anos depois.

O preparo da cúrcuma é realizado a partir da moagem de rizomas secos, principalmente da *Curcuma longa* L.(Figura 2.19). É uma planta considerada abundante de haste curta, que cresce até cerca de 1 m de altura. Possui flores brancas com forma curva e rizomas cilíndricos. Desenvolve-se naturalmente em todo subcontinente indiano e em climas tropicais. Em 1999, havia 76 sinônimos para seus rizomas secos<sup>[58]</sup>.

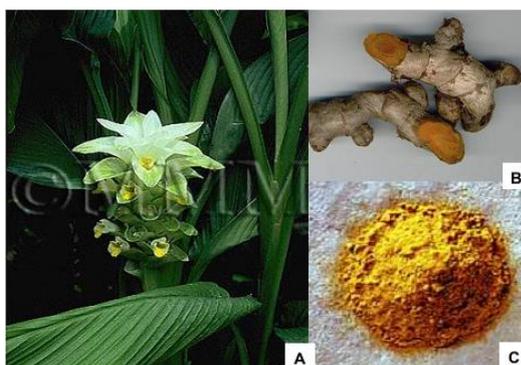


Figura 2.19– (A)- Planta *Curcuma longa* L., (B) rizoma cortado recentemente, (C) cúrcuma em pó obtida a partir do pó do rizoma<sup>[58]</sup>.

A Índia é o maior produtor mundial de cúrcuma. Sua produção é estimada em 250 a 300 toneladas/ano de rizomas<sup>[18][58]</sup>. A maior parte é consumida na forma de tempero e apenas uma pequena fração (1-1,5 toneladas) é convertida em extrato<sup>[18]</sup>. Ela contém óleos essenciais, polifenóis, proteína, gordura, minerais, carboidratos, etc<sup>[58]</sup>. É utilizada em forma de aditivo, aromatizante, conservante e corante em produtos como mostarda, margarina, refrigerantes, bebidas, entre outros. Os cosméticos também se enquadram no leque de aplicações da cúrcuma, e são empregados principalmente em rituais e cerimônias Hindu<sup>[57][58]</sup>.

Entre os diferentes fitoquímicos derivados da cúrcuma, estima-se que 2-5% seja curcumina(1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dien 3,5-diona), cuja estrutura é mostrada na Figura 2.20. Foi isolada pela primeira vez em 1815, e em 1910 sua estrutura foi determinada como diferuloilmetano<sup>[56][57]</sup>. Seu peso molecular é de 368,38, ponto de

fusão de 183 °C, e fórmula química  $C_{21}H_{20}O_6$ <sup>[59]</sup>. Sob condições fisiológicas, a curcumina pode existir tanto na forma enol quanto dicetona, que coexistem em equilíbrio<sup>[57]</sup>.

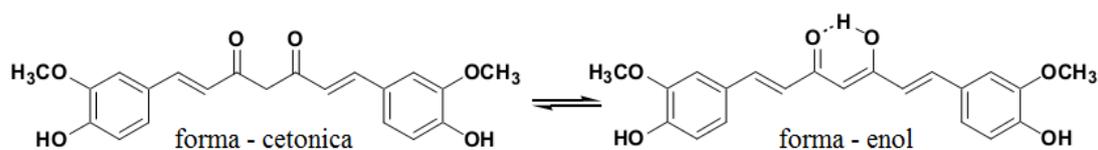


Figura 2.20– Estrutura química da curcumina<sup>[57]</sup>.

A curcumina é de natureza hidrofóbica e facilmente solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, acetona, e óleos, mas é pouco solúvel em água<sup>[57]</sup>. Em estado sólido ou soluções ácidas e neutras, a forma cetônica predomina, e a curcumina age como um potente doador de átomos de hidrogênio. Ao contrário, sob condições alcalinas ( $pH \geq 8$ ), a forma predominante é a enólica, e a parte fenólica da molécula age como doadora de elétrons<sup>[58]</sup>.

Na literatura é possível encontrar relatos sobre suas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênica, antimutagênica, antiartrítica, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoários, antivirais, nefroprotetora, contraceptiva, anti-Alzheimer, antipsoriática<sup>[56][57][58][59]</sup>. É também amplamente utilizada como corante alimentar. Apesar destas vantagens, a utilização de curcumina em formulações farmacêuticas é limitada pela sua pobre biodisponibilidade oral e vascular causada por diferentes razões: baixa solubilidade, degradação na água, fotodegradação, alta taxa do metabolismo e eliminação rápida do organismo<sup>[56][17]</sup>. Portanto, métodos que possam melhorar a estabilidade e solubilidade da curcumina podem proporcionar novas aplicações para este corante natural, por exemplo, a partir do uso de microencapsulação<sup>[18]</sup>.

Diversos estudos têm mostrado que a microencapsulação com ciclodextrina é um método útil e eficaz para a proteção da curcumina contra diversos agentes degradantes, além de aumentar a sua solubilidade em água, biodisponibilidade e atividade biológica<sup>[17][18][20][59]</sup>. Tobar e colaboradores (2012) mostraram que o encapsulamento com ciclodextrina provoca a isomerização da curcumina a partir da forma enol ou cetônica para dicetônica. Nesta configuração o isômero é menos reativo promovendo um aumento na biodisponibilidade da curcumina. Além disso, o isômero dicetônico é a forma biologicamente ativa da curcumina e assim a complexação acaba por aumentar a atividade biológica do polifenol. Marcolino e colaboradores (2011) mostraram que o melhor mé-

---

todo de complexação entre a CD e a curcumina foi o de co-precipitação com proporção estequiométrica de 2:1. Segundo a autora foi possível observar visualmente a melhora na solubilidade e capacidade de coloração, que foi testada em alimentos (queijo e iogurte), sugerindo seu uso na indústria. A análise sensorial mostrou boa aceitação dos produtos.

# Capítulo 3

## *Fundamentos da Espectroscopia Vibracional*

Apresentaremos nesta seção o modelo quântico do oscilador harmônico obtendo as expressões dos níveis de energia, seguida de uma discussão a respeito da origem dos espectros Raman e FTIR. O modelo para as moléculas poliatômicas é bastante complexo, uma vez que são possíveis diversos modos vibracionais para uma mesma molécula. Assim discutiremos apenas alguns conceitos sobre essa configuração, reportando as diferenças que existe em relação ao caso diatômico. O tratamento matemático do oscilador harmônico clássico está descrito no Apêndice A.

### **3.1 Modelo diatômico quântico**

Para obter as soluções para o oscilador harmônico foi considerada a função Hamiltoniana ( $H$ ), que contempla informações a respeito da posição e do momento linear da partícula em movimento<sup>[60][61]</sup>. Ela representa a energia total do sistema e pode ser escrita como a seguir:

$$H = T + V \quad (3.1)$$

O termo correspondente à energia cinética pode ser escrito em termos do momento linear  $p$ , ( $p = m\dot{x}$ ),<sup>[60]</sup>:

$$T = \frac{1}{2m} p^2 \quad (3.2)$$

Como se trata do caso quântico é necessário obter os operadores associados ao momento linear e as energias envolvidas na Hamiltoniana. O operador correspondente ao momento linear em uma dimensão é dado por:

$$\mathbf{p} = -i\hbar \frac{d}{dx} \quad (3.3)$$

Em que ( $i = \sqrt{-1}$ ) e  $\hbar = h/2\pi$ , sendo  $h$  a constante de Planck<sup>[60]</sup>. Para molécula diatômica considera-se a massa reduzida  $\mu$ , e que os pequenos deslocamentos dos núcleos sejam descritos pela coordenada interna  $q$  ( $q = \Delta r = \Delta x_2 - \Delta x_1$ ), Figura A.7<sup>[61]</sup>. As coordenadas internas caracterizam as variações da forma de uma molécula, quando esta se distingue da forma de equilíbrio, independentemente da posição e da orientação da molécula no espaço. As mais comuns definem mudanças de comprimento das ligações e dos seus ângulos de ligação com relação à posição de equilíbrio<sup>[62]</sup>. No caso da molécula diatômica a coordenada interna se relaciona apenas ao estiramento da ligação, correspondente aquele em que a ligação alonga e contrai<sup>[63]</sup>. Considerando as informações acima, o operador de energia cinética,  $\mathbf{T}$ , pode ser obtido efetuando duas operações sucessivas com o operador  $\mathbf{p}$ :

$$\mathbf{T} = -\frac{\hbar^2}{2\bar{\mu}} \cdot \frac{d^2}{dq^2} \quad (3.4)$$

Sendo,  $\bar{\mu} = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$  a massa reduzida. O operador de energia potencial para o oscilador harmônico é:

$$\mathbf{V} = \frac{1}{2} k q^2 \quad (3.5)$$

Com este operador e os acima descritos podemos escrever a equação de Schrödinger, independente do tempo:

$$\mathbf{H}\Psi = \mathbf{T}\Psi + \mathbf{V}\Psi = \mathbf{E}\Psi \quad (3.6)$$

$$-\frac{\hbar^2}{2\bar{\mu}} \cdot \frac{d^2\Psi}{dq^2} + \frac{kq^2}{2} \cdot \Psi = \mathbf{E}\Psi \quad (3.7)$$

$$\frac{d^2\Psi}{dq^2} + \frac{2\bar{\mu}}{\hbar^2} \cdot \left( \mathbf{E} - \frac{kq^2}{2} \right) \Psi = 0 \quad (3.8)$$

Para que a equação diferencial tenha solução aceitável, é necessário que  $\Psi(x)$  e sua derivada sejam finitas, unívocas e contínuas<sup>[60][64]</sup>. Para resolvê-la, vamos considerar uma função de onda particular de forma simples e verificar se ela satisfaz a Equação (3.8).

$$\Psi(q) = A \cdot \exp\left(-\frac{\alpha q^2}{2}\right) \quad (3.9)$$

Derivando  $\Psi(q)$  duas vezes, e em seguida substituindo na Equação(3.8), obtemos:

$$\frac{d^2\Psi(q)}{dq^2} = -\alpha\Psi + \alpha^2 q^2\Psi \quad (3.10)$$

$$-\alpha + \alpha^2 q^2 = -\frac{2\bar{\mu}}{\hbar^2} \cdot E + \frac{\bar{\mu}kq^2}{\hbar^2} \quad (3.11)$$

Igualando os termos conforme as potências de q:

$$\alpha = \frac{2\bar{\mu}}{\hbar^2} \cdot E \quad (3.12)$$

$$\alpha^2 = \frac{\bar{\mu}k}{\hbar^2}$$

Que resulta no seguinte autovalor:

$$E = \frac{\hbar^2}{2\bar{\mu}k} \cdot \frac{\sqrt{\bar{\mu}k}}{\hbar} = \frac{\hbar}{2} \cdot \sqrt{\frac{k}{\bar{\mu}}} \quad (3.13)$$

Podemos reescrever a equação acima em termos da frequência para o oscilador harmônico clássico, Equação (A.39), determinada no Apêndice A.

$$E = \frac{1}{2} \cdot h \cdot \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\bar{\mu}}} = \frac{1}{2} h\nu \quad (3.14)$$

Podemos constatar que a Equação (3.14) satisfaz a Equação (3.8), e que o valor da energia obtida através da função de onda considerada é metade do valor obtido para o caso clássico. Este valor para a energia é conhecido como energia do ponto zero, correspondendo à energia do estado fundamental do oscilador<sup>[61]</sup>. Os estados excitados podem ser obtidos multiplicando a função de onda, considerada anteriormente, por um polinômio em q, resultando em:

$$\psi_n(q) = N_n \cdot H_n(\sqrt{\alpha}q) \cdot \exp\left(-\frac{\alpha q^2}{2}\right) \quad (3.15)$$

Em que  $N_n$  é um fator de normalização e  $H_n(\sqrt{\alpha}q)$  são polinômios de Hermite<sup>[61]</sup>. Fazendo  $x = (\sqrt{\alpha}q)$ , estes polinômios têm os seguintes valores em função de  $n$  (número quântico vibracional), para  $n$  de 0 a 3:

$$H_0(x)=1$$

$$H_1(x)=2x$$

$$H_2(x)=4x^2-2$$

$$H_3(x)=8x^3-12x$$

Podemos perceber que a função de onda anteriormente proposta corresponde a  $H_0(x)=1$ .

Os autovalores correspondentes serão dados por:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) \hbar \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \left(n + \frac{1}{2}\right) \cdot h\nu \quad (3.16)$$

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) \cdot h\nu \quad (3.17)$$

Sabemos que:

$$\nu = \frac{c}{\lambda(cm)} \quad (3.18)$$

Vamos definir  $\bar{\nu}$  como:

$$\bar{\nu} = 1/\lambda \quad (3.19)$$

Assim a expressão para a energia  $E$  pode ser reescrita como:

$$E = h\nu = hc\bar{\nu} \quad (3.20)$$

Substituindo a Equação (3.20) na (3.17) e isolando a nova variável  $\bar{\nu}$ :

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} \left(n + \frac{1}{2}\right) = \omega_e \left(n + \frac{1}{2}\right) \quad (3.21)$$

$$\bar{\nu} = G_n(cm^{-1}) = \omega_e \left(n + \frac{1}{2}\right)$$

Em que  $\omega_e = \nu/c$  representa o valor clássico do número de onda do oscilador em  $cm^{-1}$ . As energias para os primeiros níveis, nesta unidade, ficam:

$$\begin{aligned} n = 0 &\rightarrow G_0 = \frac{1}{2} \omega_e \\ n = 1 &\rightarrow G_1 = \frac{3}{2} \omega_e \\ n = 2 &\rightarrow G_2 = \frac{5}{2} \omega_e \end{aligned} \quad (3.22)$$

Se ocorrer transição entre estados consecutivos (regra de seleção  $\Delta n = \pm 1$ ), portanto absorção ou emissão de radiação, as diferenças de energia serão sempre iguais a  $\omega_e$  [61]<sup>[61]</sup>. Na Figura 3.1 estão representados os autovalores anteriormente determinados, bem como as funções de onda do oscilador harmônico já normalizadas, segundo a equação:

$$\psi_n = \left[\frac{\alpha}{\pi}\right]^{1/4} \left[\frac{1}{2^n n!}\right]^{1/2} H_n(\sqrt{\alpha}q) \exp\left(-\frac{\alpha q^2}{2}\right) \quad (3.23)$$

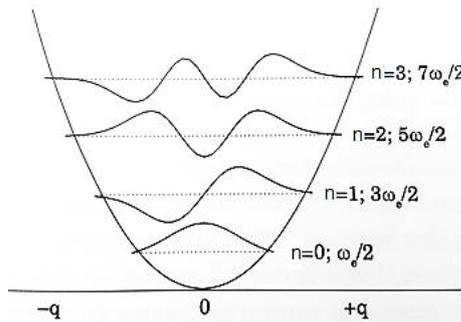


Figura 3.1 – Funções de onda do oscilador harmônico e os correspondentes autovalores (linha tracejada)<sup>[61]</sup>.

O ponto em que as linhas representando os autovalores cortam a curva do poço é o valor máximo de energia potencial para o estado vibracional considerado. Podemos observar ainda, que as funções com número quântico vibracional  $n$  par são funções pares e as funções com  $n$  ímpar são funções ímpares<sup>[61]</sup>.

Determinamos até o momento a frequência e a energia de cada nível do oscilador harmônico e o próximo passo é avaliar as possíveis transições entre os estados, verificando em que condições elas ocorrem. Vamos determinar, portanto as regras de seleção do oscilador harmônico, enfatizaremos os casos do espectro no infravermelho e o espectro Raman.

### 3.1.1 Regras de seleção

#### Espectro no infravermelho

Espectros de infravermelho são geralmente registrados pela medida da transmissão de luz através de uma amostra. As frequências das bandas de absorção são proporcionais às diferenças de energia entre os estados vibracionais fundamental e excitados<sup>[65]</sup>. As bandas de absorção devido às transições vibracionais ocorrem na região do comprimento de onda entre aproximadamente  $\lambda = 2.5 - 1000 \mu\text{m}$ .

Para uma molécula apresentar absorções nesta região espectral, tem de possuir uma característica específica, isto é, o momento de dipolo elétrico da molécula deve mudar durante a vibração (Figura 3.2). Esta é a regra de seleção geral para a espectroscopia no infravermelho <sup>[63]</sup>. Classicamente a ideia é que para que a molécula seja capaz de interagir com o campo eletromagnético da radiação incidente e absorver ou criar um fóton de frequência  $\nu$ , ela deve possuir, pelo menos transitoriamente, um dipolo oscilante com esta frequência característica. Assim, as vibrações que ocorrem devido à alteração do momento de dipolo, quando os átomos são deslocados uns em relação aos outros, são ditas **ativas no infravermelho** <sup>[61][63][66][67]</sup>. Algumas vibrações não modificam o momento de dipolo da molécula, de modo que não absorvem. Estas vibrações são chamadas **inativas no infravermelho**. As moléculas diatômicas homonucleares são exemplos de moléculas inativas no infravermelho. O contrário acontece para as moléculas heteronucleares, caracterizando-se como ativas no infravermelho <sup>[63][67]</sup>.

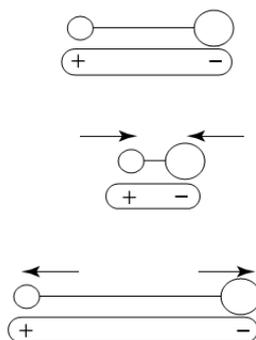


Figura 3.2 – Mudança no momento de dipolo de uma molécula diatômica heteronuclear <sup>[67]</sup>.

O momento de dipolo depende da configuração nuclear e como vimos anteriormente pode variar quando a separação internuclear varia. Assim, para moléculas diatômicas a única coordenada normal do sistema é associada à coordenada interna de ligação  $q$  <sup>[61][62]</sup>. Logo, pode-se expandir o momento de dipolo em série de Taylor da coordenada  $q$ :

$$\mu = \mu_0 + \left( \frac{d\mu}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (3.24)$$

Em que  $\mu_0$  é o vetor do momento de dipolo permanente e a derivada é considerada na posição de equilíbrio. Termos de ordem mais alta podem ser desconsiderados em casos que ocorram pequenos deslocamentos em relação a esta posição (Figura 3.3). É

importante ressaltar que o momento dipolar possui três componentes ( $\mu = \mu_x, \mu_y, \mu_z$ ). Pelo menos para uma dessas componentes o termo da derivada deve ser não nulo, para haver absorção no infravermelho. Em outras palavras, para que haja variação no momento de dipolo com a vibração  $(d\mu/dq)_0 \neq 0$ <sup>[60][63][68][69]</sup>.

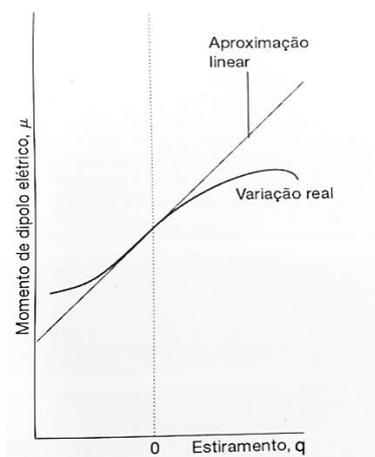


Figura 3.3 – O momento de dipolo elétrico de uma molécula diatômica heteronuclear em função do deslocamento. A variação pode ser considerada linear para pequenos deslocamentos<sup>[63]</sup>.

É de suma importância observar que a regra acima não impõe a existência de um dipolo permanente, mas somente a variação do dipolo, inclusive em relação ao momento nulo. Logo, mesmo moléculas apolares podem provocar o aparecimento de um dipolo oscilante capaz de interagir com o campo eletromagnético<sup>[63]</sup>.

Podemos descrever a transição entre dois estados genéricos (m e n), caracterizados por suas respectivas funções de onda  $\psi_m$  e  $\psi_n$ , pelo momento de transição de dipolo:

$$\mu_{mn} = \int \psi_m \mu \psi_n d\tau \tag{3.25}$$

Essa integral pode ser dividida em outras três, correspondentes a cada componente de  $\mu$ . Assim, para que a transição seja permitida é necessário que pelo menos uma delas seja diferente de zero<sup>[61][66][69]</sup>.

O momento de transição pode ser interpretado como a medida do dipolo associado com o movimento dos elétrons durante a transição entre os estados envolvidos. Assim, os valores dessas integrais determinam a intensidade no infravermelho, que é proporcional à probabilidade de transição  $|\mu_{mn}|^2$ <sup>[61][66][61]</sup>.

Vamos substituir o momento de dipolo expandido em série de Taylor na expressão do momento de dipolo de transição.

$$\mu_{mn} = \mu_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left( \frac{d\mu}{dq} \right)_0 \cdot \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad (3.26)$$

Relembrando o conceito de ortogonalidade das funções de onda podemos verificar que a primeira integral se anula exceto para  $m=n$ , caso em que não ocorre transição. Neste caso estaríamos avaliando o dipolo permanente e não mais o momento de transição. O segundo termo não se anula mediante as seguintes restrições<sup>[61][63][65][66]</sup>:

- (1) Que novamente a derivada do momento com relação à coordenada  $q$  seja diferente de zero,  $(d\mu/dq)_0 \neq 0$ . Ou seja, que haja variação do momento de dipolo com a pequena vibração na posição de equilíbrio.
- (2)  $\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0$ , precisamos neste caso investigar a paridade das funções de onda. Como  $q$  é uma função ímpar é necessário que o produto  $\psi_m \psi_n$  seja uma função ímpar. Isto implica que as funções de onda devem ter paridade diferente para garantir que a integral não se anule. A regra de seleção do oscilador harmônico é  $\Delta n \pm 1$ , o sinal positivo representa a absorção e o negativo a emissão. Embora esta regra de seleção permita, por exemplo,  $\Delta n \pm 3$  a regra de seleção relacionada ao momento angular proíbe transições para esses valores de  $n$ .

Para as moléculas ativas no infravermelho, caso de moléculas diatômicas heteronucleares, a energia observada, em  $\text{cm}^{-1}$ , durante uma transição entre os níveis do oscilador harmônico, será:

$$\begin{aligned} G_{n+1} - G_n &= \omega_e \left( n + \frac{1}{2} + 1 \right) - \omega_e \left( n + \frac{1}{2} \right) \\ G_{n+1} - G_n &= \omega_e \left( n + \frac{3}{2} \right) - \omega_e \left( n + \frac{1}{2} \right) = \omega_e \end{aligned} \quad (3.27)$$

O resultado acima implica que independente dos níveis que estejam envolvidos na transição eles sempre terão uma diferença de energia constante  $\omega_e$ . Ou seja, os níveis são igualmente espaçados por uma separação que corresponde à frequência vibracional<sup>[61]</sup>. A Figura 3.4 ilustra essa afirmação.

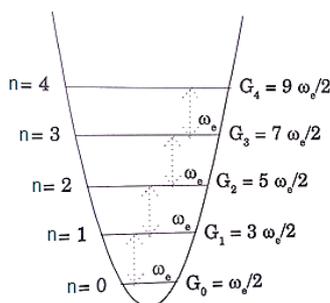


Figura 3.4 – Níveis de energia e transições do oscilador harmônico<sup>[61]</sup>.

Espectro Raman

A espectroscopia Raman é baseada no processo de espalhamento inelástico da radiação incidente em uma molécula<sup>[70]</sup>. Trata-se portanto de um fenômeno fisicamente diferente daquele das técnicas de FTIR, cuja fundamentação é baseada na absorção da radiação. Logo, é esperado que as regras de seleção que satisfaziam as condições exigidas pelo infravermelho não satisfaçam as requeridas pelos espectros Raman. A atividade agora está ligada à vibração de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente. Quando uma molécula é colocada num campo elétrico sofre distorção, uma vez que os núcleos carregados positivamente são atraídos para o pólo negativo, e os elétrons em direção ao pólo positivo (Figura 3.5)<sup>[66][69]</sup>. Esta separação de carga produz um momento de dipolo induzido (**P**) dado por:

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E} \tag{3.28}$$

**E** corresponde ao vetor do campo elétrico da radiação incidente e  $\alpha$  a polarizabilidade da molécula.

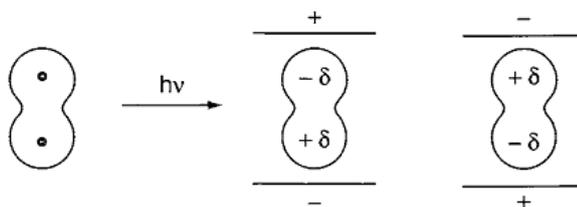


Figura 3.5 – Polarização de uma molécula diatômica num campo elétrico<sup>[66]</sup>.

Assim a regra geral para as transições Raman vibracionais é que a polarizabilidade da molécula deve se alterar com a vibração<sup>[63]</sup>. Esta condição implica que tanto moléculas homonucleares quanto heteronucleares possam ser ativas no espectro Raman vibracional. Isso porque ambas expandem e contraem durante a

vibração, o controle dos núcleos sobre os elétrons é variável, com isso a polarizabilidade da molécula também se altera<sup>[63]</sup>.

Para obter as regras de seleção específicas pode-se adotar o mesmo procedimento aplicado no caso da absorção. Assim vamos agora expandir em série de Taylor, em função da coordenada  $q$ , a polarizabilidade  $\alpha$ .

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \dots \quad (3.29)$$

Os termos de ordem superiores foram desprezados devido à pequena variação da coordenada  $q$ . Como mencionado antes, a componente do campo elétrico e a coordenada  $q$  são funções oscilatórias. Assim pode-se considerar:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_n t) \quad \text{e} \quad E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.30)$$

Sendo  $\nu_n$  e  $\nu_0$ , respectivamente, as frequências vibracional da molécula e da radiação incidente. Substituindo  $q$ ,  $E$  e  $\alpha$ , já expandido, na Equação (3.28), obtem-se:

$$\mathbf{P} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_n t) \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.31)$$

Usando a seguinte relação entre cossenos,  $\cos(a) \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a+b) + \cos(a-b)]$ , tem-se:

$$\begin{aligned} \mathbf{P} = & \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_n)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_n)t] \} \end{aligned} \quad (3.32)$$

O primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente. Trata-se portanto, de um espalhamento elástico (sem alteração na energia). Este processo é conhecido como espalhamento Rayleigh<sup>[61][70]</sup>. O segundo termo corresponde ao espalhamento inelástico, em que as frequências das radiações espalhadas aparecem como  $(\nu_0 \pm \nu_n)$ . Quando a frequência da radiação incidente ( $\nu_0$ ) é diminuída de  $\nu_n$  tem-se o que se chama de espalhamento Stokes. Neste caso a molécula no estado fundamental ganhou energia do fóton incidente e transitou para o estado excitado. Por

outro lado se ocorre adição entre as frequências ( $\nu_0 + \nu_n$ ), significa que o fóton espalhado ganhou energia da molécula, que já se encontrava num estado vibracional excitado. Este processo é chamado espalhamento anti- Stokes ( Figura 3.6). No entanto, verifica-se que esses termos só podem contribuir se houver variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada  $q$  em torno da posição de equilíbrio. Assim temos que  $(d\alpha/dq)_0 \neq 0$  <sup>[60][69][70]</sup>.

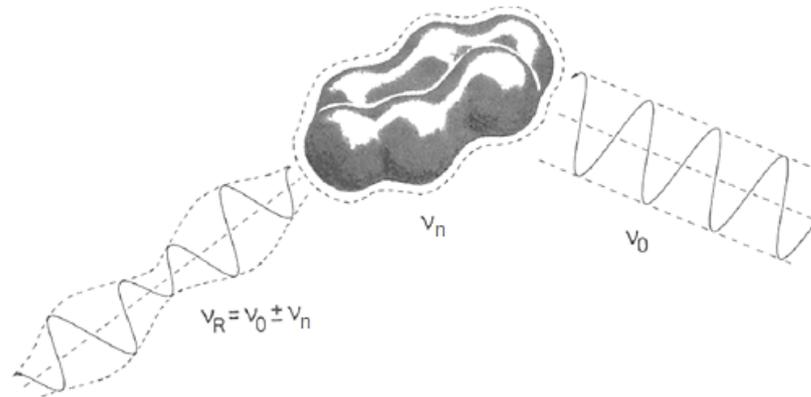


Figura 3.6 - Modulação da radiação espalhada pela vibração molecular<sup>[65]</sup>.

Nos espectros Raman aparecem simetricamente em relação a linha Rayleigh, uma banda do lado das frequência mais baixas, a Stokes, em uma do lado de frequências mais altas, a anti-Stokes. Classicamente elas deveriam ter a mesma intensidade, no entanto, observa-se que a Stokes é mais intensa <sup>[61][69]</sup>. A Figura 3.7 mostra o exemplo do espectro Raman do CCl<sub>4</sub>.

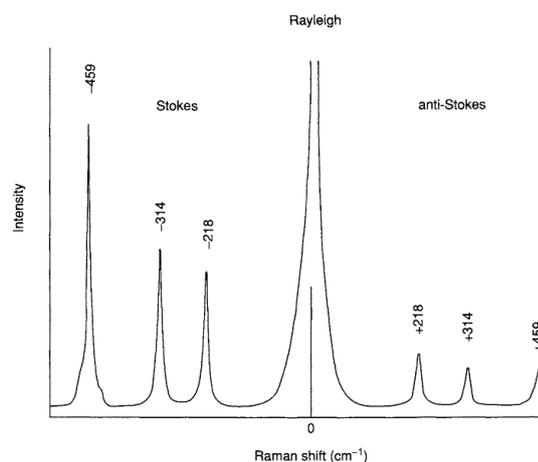


Figura 3.7 – Espectro Raman do CCl<sub>4</sub> com excitação em 488 nm<sup>[66]</sup>.

A relação entre **P** e **E** mostrada na Equação(3.28) pode ser reescrita considerando todas as componentes do campo elétrico, como:

$$\begin{aligned}
 P_x &= \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \\
 P_y &= \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \\
 P_z &= \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z
 \end{aligned}
 \tag{3.33}$$

Estas equações são válidas para o espalhamento Rayleigh, onde é considerada a polarizabilidade intrínseca. No espalhamento Raman, como visto anteriormente, deve-se considerar a derivada da polarizabilidade em relação a  $q$ . Assim na Equação (3.33) deve-se considerar  $\alpha'_{ij} = (d\alpha_{ij}/dq)_0$  que formam um tensor simétrico, isto é,  $\alpha'_{ij} = \alpha'_{ji}$ , conhecido como tensor Raman. Em que  $i$  e  $j$  representam  $x$ ,  $y$  ou  $z$ .

De forma análoga ao realizado para a absorção, a transição entre os estados vibracionais  $m$  e  $n$  também ocorre para o efeito Raman. Neste caso devem ser considerados os componentes  $(\alpha_{ij})_{mn}$  que resultarão em 6 integrais do momento de transição, em que pelo menos um dos componentes destas integrais precisa ser diferente de zero para que haja atividade no Raman <sup>[61][63][66][69]</sup>.

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau
 \tag{3.34}$$

Considerando na expressão acima o desenvolvimento em série de Taylor em (3.29), obtém-se:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left( \frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau
 \tag{3.35}$$

Como estados  $m$  e  $n$  são diferentes, constata-se que o primeiro termo se anula pela condição de ortogonalidade entre as funções de onda. Para  $m=n$  o primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh. Para o segundo termo ser diferente de zero, é necessário que sejam satisfeitas as seguintes condições, <sup>[61][66][70][69][71]</sup>:

- (1)  $(d\alpha_{ij}/dq)_0 \neq 0$ , ou seja, que haja variação de ao menos um dos componentes do tensor de polarizabilidade com a pequena vibração próxima da posição de equilíbrio.
- (2)  $\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0$ . Esta condição já foi discutida para a atividade no infravermelho. A regra de seleção para o oscilador harmônico é  $\Delta n = \pm 1$ , em que o sinal “+” corresponde ao espalhamento Stoke e o sinal “-” ao anti-Stokes.

Os mecanismos de espalhamento Raman podem ser representados pelos esquemas da Figura 3.8:

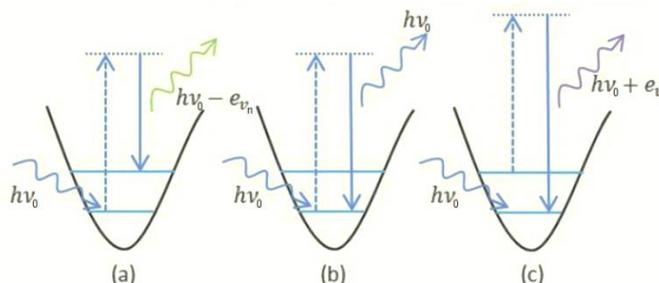


Figura 3.8 – Esquema dos mecanismos de espalhamento: (a) Stokes, (b) Rayleigh, (c) Anti-Stokes<sup>[61]</sup>.

No espalhamento Rayleigh (b), um fóton de energia  $h\nu_0$  colide com a molécula no estado fundamental. Após a colisão ela passa para um estado intermediário, conhecido como virtual, que não precisa ser um estado estacionário da molécula. Em seguida, ela decai ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é espalhado sem modificação na frequência (espalhamento elástico). Sobre o estado intermediário deve-se pensar que após a colisão com a molécula este é aniquilado e a molécula sofre uma perturbação em todos os seus níveis de energia. Para os outros dois espalhamentos, (a) e (c), o espalhamento acontece de forma inelástica, isto significa que após a colisão com o fóton a molécula ao decair do estado intermediário volta para um nível diferente do inicial. No Stokes, ela volta para um estado vibracional excitado, de energia  $e_{v_n}$ , e o fóton espalhado,  $h\nu_0 - e_{v_n}$ , terá energia menor do que o incidente. Agora para o anti-Stokes, no processo de colisão a molécula já se encontra num estado excitado e após a interação a molécula decai para o estado fundamental. Esta diferença de energia é cedida ao fóton, que por sua vez é espalhado com energia  $h\nu_0 + e_{v_n}$ <sup>[61][66]</sup>.

A intensidade Raman é determinada pela probabilidade de transição, ou seja, depende do quadrado do tensor de polarizabilidade e da quarta potência da frequência da radiação espalhada:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4}\right) I_0 v^4 \sum_i \sum_j |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (3.36)$$

Sendo  $I_0$  a intensidade da radiação incidente e  $v$  a frequência da radiação espalhada<sup>[61][69]</sup>. Verifica-se experimentalmente que as bandas anti-Stokes são menos intensas que a Stokes, mostrado na Figura 3.7 para o  $\text{CCl}_4$ . De acordo com a função de

distribuição de Boltzmann, a relação entre o número de moléculas que se encontra no estado vibracional  $n=1$  e o número de moléculas( $n$ ) no nível  $n=0$  para uma dada vibração é dada por <sup>[62]</sup>:

$$\frac{n_1}{n_0} = e^{(-hv/kT)} \quad (3.37)$$

Em temperaturas medianas, a maioria das moléculas encontra-se no estado fundamental, o que explica as linhas Stokes apresentarem maiores intensidades do que as anti-Stokes, as quais se originam do estado excitado com menor população <sup>[62]</sup>. Quanto maior a frequência vibracional maior é a diferença entre ambos. Assim, a relação entre as intensidades anti-Stokes/Stokes pode ser dada por:

$$\frac{I_A}{I_S} = \left( \frac{\nu_0 + \nu_n}{\nu_0 - \nu_n} \right)^4 \exp\left(-\frac{e\nu_n}{kT}\right) \quad (3.38)$$

Para frequências baixas, as intensidades Stokes e anti-Stokes são comparáveis, mas para frequências vibracionais muito altas a Stokes predomina e anti-Stokes dificilmente são observadas<sup>[61][69]</sup>.

### 3.1.2 Oscilador anarmônico

Para determinarmos o número de onda correspondente às transições vibracionais permitidas (Figura 3.4), a curva da energia potencial foi aproximada para uma parábola. No entanto, a aproximação parabólica não é a mais correta para retratar estiramentos, pois não leva ao rompimento da ligação <sup>[63]</sup>. Além disso, vimos que a regra de seleção para o oscilador harmônico é  $\Delta n = \pm 1$ , como consequência, seria esperado que para uma molécula diatômica heteronuclear aparecesse apenas uma banda vibracional no espectro de absorção no infravermelho. Contudo, como no caso do HCl, são observadas mais de uma banda. Elas possuem o dobro, o triplo da frequência da banda fundamental em  $2886 \text{ cm}^{-1}$ . Isto pode ser explicado considerando a anarmonicidade mecânica e elétrica do oscilador <sup>[61]</sup>. A anarmonicidade mecânica aparece quando consideramos na expansão de Taylor para  $V$  outros termos de ordem superior. O movimento é então anarmônico e a força restauradora deixa de ser proporcional ao deslocamento. Assim temos:

$$V(q) = V(0) + \left(\frac{dV}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2V}{dq^2}\right)_0 q^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3V}{dq^3}\right)_0 q^3 + \dots \quad (3.39)$$

A curva potencial não será mais descrita por uma parábola e a deformação na curva gera perda de simetria nas funções de onda. Temos, portanto, que a anarmonicidade mecânica modifica as funções de onda da equação de Schrödinger e conseqüentemente altera as regras de seleção. As transições permitidas agora são determinadas por  $\Delta n = \pm 1, \pm 2, \pm 3$ , etc. No entanto, o valor das frequências harmônicas poderá ser determinado de forma exata. Os novos termos obtidos da expansão devem ser inseridos no operador de energia potencial, que faz parte do Hamiltoniano na equação Schrödinger <sup>[61]</sup>.

A anarmonicidade elétrica determina a intensidade das bandas e ela aparece quando consideramos termos de maior ordem no desenvolvimento em série do momento de dipolo, para os espectros no infravermelho, e da polarizabilidade nos espectros Raman <sup>[61]</sup>.

$$\begin{aligned} \mu &= \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\mu}{dq^2}\right)_0 q^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3\mu}{dq^3}\right)_0 q^3 + \dots \\ \alpha &= \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\alpha}{dq^2}\right)_0 q^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3\alpha}{dq^3}\right)_0 q^3 + \dots \end{aligned} \quad (3.40)$$

Para a intensidade da primeira harmônica o termo quadrático é suficiente. Para harmônicas de ordem superiores será necessário considerar derivadas de ordem maior no desenvolvimento em série.

Como o operador potencial foi modificado é esperado que os autovalores obtidos pela solução da equação de Schrödinger também mudem <sup>[63]</sup>. Considerada a aproximação do potencial parabólico os autovalores eram dados por:

$$G_n(cm^{-1}) = \omega_e \left(n + \frac{1}{2}\right) \quad (3.41)$$

Onde  $\omega_e = (1/2\pi c) \sqrt{k/\bar{\mu}}$ .

Essa expressão agora deverá conter um termo correspondente à anarmonicidade do oscilador. Assim os autovalores para a molécula diatômica com potencial real serão dados por:

$$G_n = \omega_e \left(n + \frac{1}{2}\right) - \omega_e x_e \left(n + \frac{1}{2}\right)^2 \quad (3.42)$$

Neste caso, o termo  $\omega_e x_e$  corresponde a constante de anarmonicidade e  $\omega_e$  continua sendo o valor clássico da frequência do oscilador harmônico. É possível perceber que os níveis de energia que eram igualmente espaçados, agora ficarão cada vez mais próximos à medida que  $n$  aumenta<sup>[61][66]</sup>. A energia no ponto zero vale:

$$G_0 = \omega_e \frac{1}{2} - \omega_e x_e \frac{1}{4} \quad (3.43)$$

As transições entre os estados vibracionais  $n$  em relação ao fundamental ficam:

$$G_n - G_0 = \omega_e \left( n + \frac{1}{2} \right) - \omega_e x_e \left( n + \frac{1}{2} \right)^2 - \omega_e \frac{1}{2} + \omega_e x_e \frac{1}{4} \quad (3.44)$$

$$G_n - G_0 = \omega_e n - \omega_e x_e (n^2 + n) \quad (3.45)$$

A Figura 3.9 ilustra as curvas de potencial e os níveis de energia para o oscilador harmônico e anarmônico.

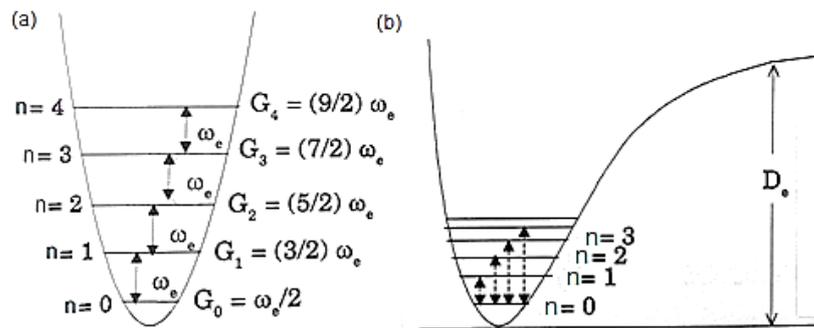


Figura 3.9 - Níveis de energia e curva de potencial para: (a) o oscilador harmônico e (b) oscilador anarmônico<sup>[61]</sup>.

Pode-se perceber que na região próxima a posição de equilíbrio as curvas são semelhantes, logo a aproximação do potencial real, anarmônico para o harmônico (potencial parabólico) é válida. No entanto, com o aumento do número quântico  $n$  os níveis do oscilador anarmônico tornam-se cada vez menos espaçados e a frequência, então observada experimentalmente, será sempre menor do que a  $\omega_e$ , facilmente calculada pelo modelo do oscilador harmônico<sup>[61][63][66]</sup>.

A curva de energia potencial para o oscilador anarmônico pode ser descrita pela expressão conhecida como potencial de Morse<sup>[61][63][66]</sup>:

$$V(q) = D_e [1 - \exp(-\beta q)]^2 \quad (3.46)$$

Em que  $D_e$  é energia de dissociação medida em relação ao mínimo da curva de potencial. E o termo  $\beta$  é dado por  $\beta = \omega_e \sqrt{2\pi^2 c \bar{\mu} / D_e h}$ , onde  $\omega_e$  e  $D_e$  estão em  $\text{cm}^{-1}$ . A Figura 3.10 foi incluída com o propósito de facilitar a comparação entre o potencial de Morse (linha contínua) e o potencial parabólico do oscilador harmônico (linha tracejada). Nota-se que se trata de uma boa aproximação entre as curvas próxima à vizinhança da posição de equilíbrio <sup>[61][63][66]</sup>.

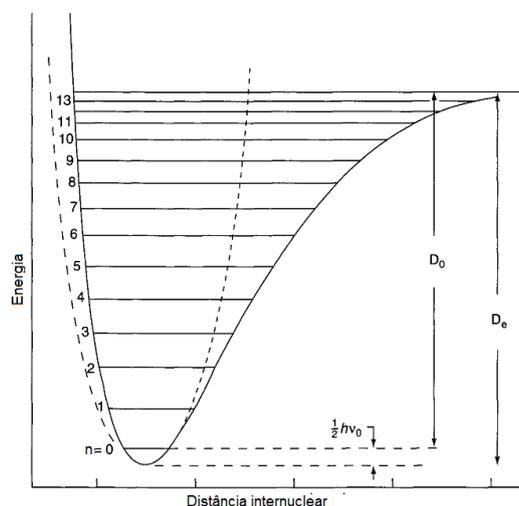


Figura 3.10 - Curva de energia potencial para uma molécula diatômica. Linha sólida indica um potencial de Morse que se aproxima do potencial real. Linha tracejada é o potencial parabólico para um oscilador harmônico.  $D_e$  e  $D_0$  são as energias de dissociação, teóricas e espectroscópicas, respectivamente <sup>[66]</sup>.

### 3.2 Vibração de moléculas poliatômicas

Conseguimos tratar de maneira relativamente simples o movimento vibracional de moléculas diatômicas, encontramos a frequência de vibração correspondente ao único movimento possível entre os átomos, o de estiramento da ligação. Para moléculas poliatômicas, no entanto, todos os comprimentos de ligação e todos os ângulos podem se alterar e como consequência surgem outras frequências, características desses novos movimentos, ou seja, ela possui diferentes modos de vibração. Os espectros e os modelos capazes de descrever de forma conjunta todos esses movimentos são muito mais complexos <sup>[63][66]</sup>.

Entre as várias técnicas empregadas a mais simples é a análise de coordenadas normais. Cada modo normal de vibração pode ser caracterizado por uma *coordenada normal* individual  $Q$ , que varia periodicamente. Ela é uma medida da amplitude de um modo de vibração específico. Cada um desses modos normais pode ser excitado independentemente uns dos outros, isso favorece com que as coordenadas normais também

sejam independentes. Neste sentido, cada coordenada normal contribui de forma individual e independentemente para com o potencial vibracional total e a energia<sup>[62]</sup>.

De forma concreta pode-se considerar que uma molécula seja um conjunto de osciladores acoplados. O que se faz na análise de coordenadas normais é desacoplar esses osciladores em “modos normais”, tratados como osciladores harmônicos simples, descritos pelas coordenadas normais<sup>[61]</sup>.

Pode-se calcular o número total de modos de vibração de uma molécula poliatómica e posteriormente realizar certas combinações desses deslocamentos atômicos que permitiram obter a descrição das vibrações<sup>[63]</sup>.

A localização de  $N$  átomos pode ser especificada pelas três coordenadas possíveis ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ), em que cada átomo pode modificar a sua localização em função destas coordenadas. Segue, portanto, que o número total de deslocamentos acessíveis para os  $N$  átomos é de  $3N$ <sup>[72]</sup>.

São necessárias três coordenadas para determinar a localização do centro de massa da molécula de modo que 3 dos  $3N$  deslocamentos correspondem ao movimento de translação da molécula como um todo. Restam  $3N-3$  deslocamentos relacionados aos movimentos não-translacionais<sup>[67][72]</sup>.

Para uma molécula linear bastam dois ângulos para determinar sua orientação. É suficiente fornecera longitude e a latitude da direção que suporta o eixo da molécula. Entretanto, uma molécula não-linear precisa, além dos dois já mencionados para a linear, de um terceiro ângulo que determina a orientação da molécula em relação à reta suporte da direção, como ilustrado na (Figura 3.11). Estes deslocamentos correspondem ao movimento de rotação, sendo dois para a molécula linear e três para a não-linear. Restando  $3N-5$  (molécula linear) ou  $3n-6$  (molécula não-linear) deslocamentos dos átomos uns em relação aos outros. Estes são os modos de vibração<sup>[63][67][72]</sup>.

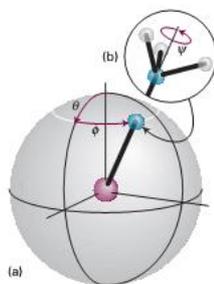


Figura 3.11 – (a) A orientação de uma molécula linear se faz com apenas dois ângulos. (b) Molécula não linear precisa de três ângulos para ter sua orientação perfeitamente especificada<sup>[63]</sup>.

A molécula de água (N=3) é não-linear e apresenta desta forma  $(3 \cdot 3) - 6 = 3$  modos de vibração, que estão ilustrados na Figura 3.12 . Já a molécula de CO<sub>2</sub> também triatômica apresenta  $(3 \cdot 3) - 5 = 4$  modos vibracionais por ser linear.

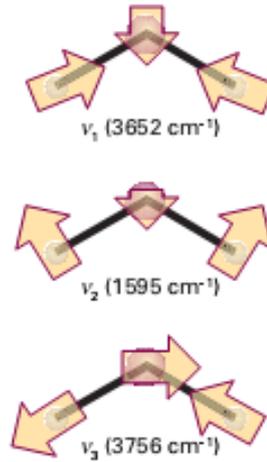


Figura 3.12 – Os modos vibracionais da molécula de água<sup>[63]</sup>.

Considerando a função potencial  $V(q_1, q_2, \dots, q_n)$  nas proximidades da posição de equilíbrio ( $q_i=0$ ) pode-se expandi-la em função das coordenadas normais  $q_i$ , de forma análoga ao realizado no caso diatômico:

$$V = V_0 + \sum_i \left( \frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2!} \sum_i \sum_j \left( \frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j + \frac{1}{3!} \sum_i \sum_j \sum_k \left( \frac{\partial^3 V}{\partial q_i \partial q_j \partial q_k} \right)_0 q_i q_j q_k + \dots \quad (3.47)$$

Análogo ao caso diatômico, o termo  $V_0$  é independente das coordenadas e não contribui para o problema vibracional, ele define apenas o zero da escala de potencial e por simplicidade escolhemos  $V_0 = 0$ . A derivada primeira na posição de equilíbrio também se anula. Desprezando os termos a partir do cúbico, ou seja, considerando a aproximação do oscilador harmônico, teremos:

$$V \approx \frac{1}{2!} \sum_i \sum_j \left( \frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j \quad (3.48)$$

Este é a função potencial para as moléculas poliatômicas a ser considerada no caso de uma aproximação harmônica<sup>[61]</sup>.

Como mencionado anteriormente, podem ser feitas combinações lineares entre os deslocamentos para facilitar a descrição das vibrações. Assim, pode-se escrever cada coordenada interna  $q_i$  como combinação linear de cada coordenada normal  $Q$ , que por sua vez está associada a cada modo normal de vibração da molécula. A combinação pode ser escrita como:

$$q_i = \sum_b L_{ib} Q_b \quad (i = 1, 2, \dots, 3n - 6) \quad (3.49)$$

Em que  $L_{ib}$  são as amplitudes já normalizadas. O índice  $i$  indica a coordenada interna e  $b$  indica o modo vibracional. Cada coordenada normal oscila independentemente das demais, é como se tivesse um conjunto de osciladores harmônicos independentes<sup>[61]</sup>.

A regra de seleção geral para atividade no infravermelho é a do movimento correspondente a um modo normal provocar a alteração no momento de dipolo. Elementos de simetria podem ajudar a verificar essa alteração facilitando em muito os cálculos existentes. Neste trabalho enunciaremos apenas a regra geral e como exemplo utilizaremos a molécula de água (Figura 3.13). Pode-se verificar a alteração do momento dipolar com cada modo vibracional, logo todos são ativos no infravermelho.

A regra geral de atividade no Raman para moléculas diatômicas também se aplica às moléculas poliatômicas. Os modos normais de vibração são ativos no Raman se forem acompanhados por modificação da polarizabilidade<sup>[61][63][66]</sup>. No caso de moléculas pequenas, as modificações da polarizabilidade durante a vibração são fáceis de serem observadas. As nuvens eletrônicas de moléculas diatômicas tais como  $H_2$  ou moléculas lineares como  $CO_2$  têm formas alongadas com seções transversais circulares. Nestas moléculas, os elétrons são mais polarizáveis ( $\alpha$  maior) ao longo da ligação química do que na direção perpendicular a ela. Convencionalmente, faz-se a razão  $1/\sqrt{\alpha_i}$ , com  $\alpha_i$  referente ao centro de gravidade em todas as direções, o resultado é uma superfície tridimensional chamada de elipsoide de polarizabilidade. Assim, a regra em relação ao elipsoide a fim de ter atividade no Raman é que a forma, o tamanho, ou a orientação variem com a vibração normal<sup>[66]</sup>. A Figura 3.14 mostra essas mudanças durante as vibrações do  $CO_2$ .

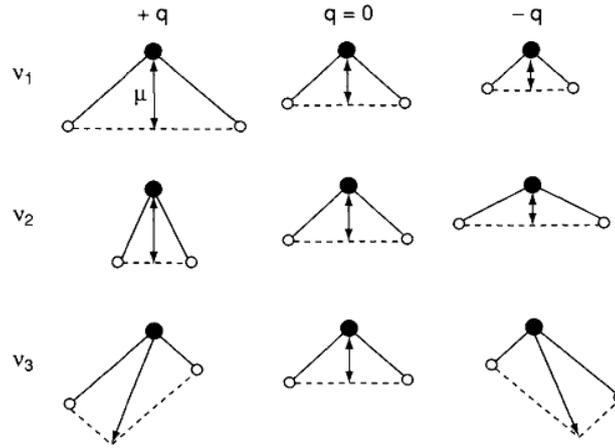


Figura 3.13 - Alteração no momento de dipolo para a molécula de água durante cada vibração normal<sup>[66]</sup>.

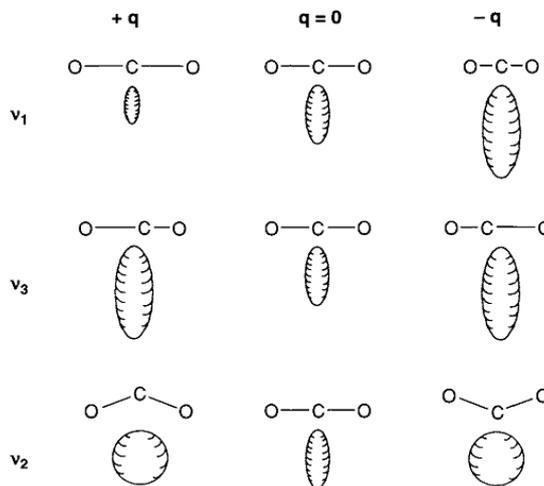


Figura 3.14 - Alteração no elipsoide de polarizabilidade durante cada vibração normal do CO<sub>2</sub><sup>[66]</sup>.

Na vibração  $\nu_1$ , o tamanho do elipsoide está variando, assim logo este modo de vibração é ativo no Raman. Embora isto também aconteça durante a vibração  $\nu_3$ , os elipsoides nos dois extremos do deslocamento ( $+q$  e  $-q$ ) são exatamente os mesmos nos dois casos, o que impossibilita a atividade no Raman. Para um pequeno deslocamento a diferença entre o  $\nu_1$  (ativa no Raman) e  $\nu_3$  (inativa no Raman) é mostrada na Figura 3.15.<sup>[66]</sup> É importante ressaltar neste caso, o que já havíamos comentado no caso diatômico, a respeito da atividade no Raman ser atribuída à variação da polarizabilidade com a coordenada  $q$ , ou seja,  $(d\alpha/dq)_0 \neq 0$ <sup>[60][63][66]</sup>. A vibração  $\nu_2$  é inativa pelo mesmo motivo de  $\nu_3$ .

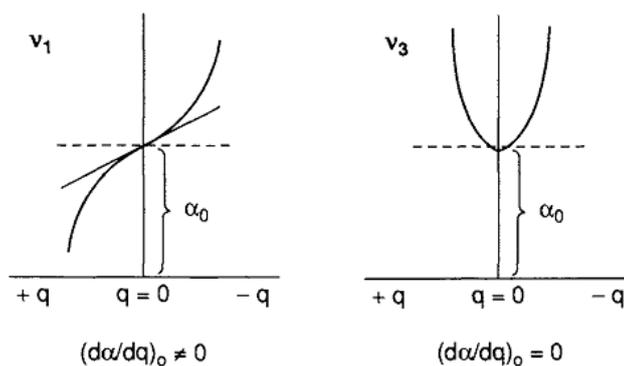


Figura 3.15 – Diferença entre as vibrações  $\nu_1$  e  $\nu_3$  para a molécula de  $\text{CO}_2$ <sup>[66]</sup>.

Considerando-se um tratamento mais exato da atividade no Raman e no infravermelho, obtém-se uma regra de exclusão bem pertinente<sup>[63]</sup>:

***Se a molécula tiver um centro de simetria, nenhum modo de vibração pode ser simultaneamente ativo no infravermelho e na espectroscopia Raman.***

A regra se aplica, por exemplo, ao  $\text{CO}_2$ , mas não às moléculas  $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{CH}_4$ , por não possuírem centro de simetria. Como é possível em algumas circunstâncias verificar se a vibração é capaz de alterar ou não o momento de dipolo da molécula, esta regra permite identificar os modos que não são ativos no Raman<sup>[66]</sup>. De forma geral para determinar se um modo é ativo no FTIR ou no Raman deve-se usar teoria de grupos, cujo rigor matemático é maior. No entanto, não entraremos nesta discussão, para moléculas poliatômicas nos restringiremos ao que foi descrito acima.

### 3.3 Raman & Espectroscopia no Infravermelho

Embora a espectroscopia Raman e a FTIR forneçam informações sobre as frequências de vibração das moléculas, elas possuem características específicas que resultam em vantagens ou desvantagens, dependendo da situação abordada. A seguir citaremos algumas delas<sup>[66]</sup>:

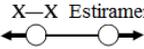
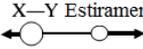
- 1-Uma vez que o diâmetro do feixe de laser pode ser reduzido até aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , apenas uma pequena área da amostra é necessária para se obter os espectros Raman.
- 2-A água é um fraco dispersor Raman, o que permite a obtenção de espectros Raman em solução aquosa sem grande interferência de suas vibrações. O que não acontece com a técnica FTIR porque a água tem alta absorção. Por esta

característica a espectroscopia Raman é considerada uma técnica ideal para estudos de compostos biológicos por estarem em geral em solução aquosa.

- 3-Na espectroscopia Raman, a região de 4000 a 50  $\text{cm}^{-1}$  pode ser varrida por uma medida. Na técnica FTIR para cobrir esta mesma região espectral é necessário trocar grades, divisores de feixe, filtros e detectores.
- 4-Algumas vibrações são inerentemente fracas no infravermelho e fortes no espectro Raman. Exemplos são as vibrações de estiramento das ligações  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{P}=\text{S}$ ,  $\text{S}-\text{S}$  e  $\text{C}-\text{S}$ . De forma geral, na espectroscopia Raman, as ligações covalentes apresentam espectros com intensidades maiores, enquanto que as iônicas apresentam intensidades maiores nas medidas FTIR. Como exemplo da ligação covalente tem-se que a razão das intensidades relativas referentes às vibrações de estiramento das ligações entre  $\text{C}-\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}\equiv\text{C}$  é de cerca de 3: 2: 1. Além disso, nos espectros Raman as vibrações de flexão são geralmente mais fracas do que as atribuídas aos estiramentos das ligações.
- 5-O fraco espalhamento Raman para ser observado exige como fonte de radiação um laser. Contudo, isto pode provocar o aquecimento e/ou fotodecomposições locais, especialmente em estudos envolvendo Raman ressonante, onde a frequência do laser é deliberadamente sintonizada na banda de absorção da molécula.
- 6-Os lasers geralmente operam na região visível do espectro eletromagnético e alguns compostos podem fluorescer ao serem irradiados, o que pode mascarar o espectro Raman.
- 7-O sistema Raman é de custo maior do que um espectrofotômetro FTIR convencional, embora versões menos caras, como as portáteis, já estejam disponíveis.

Como mencionado antes, as regras de seleção marcam as diferenças entre as espectroscopias Raman e infravermelho. Assim, algumas vibrações são ativas no Raman e não apresentam atividade na técnica FTIR. Em geral, a vibração é ativa na técnica FTIR, Raman-ativa, ou ativa em ambos. No entanto, vibrações totalmente simétricas são sempre Raman-ativa. A Tabela 3.1 mostra as regras gerais para as moléculas diatômicas, comparando as peculiaridades de cada uma das técnicas.

Tabela 3.1 – Fatores determinantes para atividade no infravermelho e no Raman de vibrações referentes a moléculas homonucleares e heteronucleares<sup>[73]</sup>.

Parâmetros	Tipo da molécula	
	$X_2$	X-Y
Modo normal de vibração		
Momento de dipolo	0	
Varição do momento de dipolo com a coordenada q		
Derivada do momento de dipolo (no equilíbrio)	$\left[\frac{\partial \mu}{\partial q}\right]_0 = 0$	$\left[\frac{\partial \mu}{\partial q}\right]_0 \neq 0$
Atividade no infravermelho	Não	Sim
Forma do elipsóide de polarizabilidade		
Varição da polarizabilidade com a coordenada q		
Derivada da polarizabilidade	$\left[\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right]_0 \neq 0$	$\left[\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right]_0 \neq 0$
Atividade no Raman	Sim	Sim

# Capítulo 4

## *Materiais e Métodos*

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Enzimática da Universidade Estadual de Maringá, sob a coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graciette Matioli. As amostras envolvendo os complexos com insulina foram preparadas pela doutoranda em Ciências Farmacêuticas, Sóstenes Rosa Valentini (Parte I)<sup>[74]</sup>. Os complexos com curcumina foram preparados pela doutoranda em Ciência de Alimentos, Camila Mangolim (Parte II)<sup>[23]</sup>. Apresentaremos nesta seção a preparação das amostras, que será de forma resumida porque não é o objeto principal deste trabalho. Maiores informações podem ser obtidas nos trabalhos das referidas doutorandas<sup>[17][23][74]</sup>.

### **4.1 Parte I**

#### **4.1.1 Insulina**

A insulina humana regular, derivada de DNA recombinante, foi adquirida da Eli Lilly do Brasil (São Paulo, Brazil), contendo 100UI/mL. A HP $\beta$ CD, com peso molecular de 1300 Da, foi cedida pela Wacker Química do Brasil (Jandira, Brazil). O polímero de carbopol 940<sup>®</sup> foi adquirido da EMFAL-Especialidades Químicas (Betim, Brazil). Todos os demais reagentes e produtos utilizados para os ensaios são de grau analítico e farmacêutico.

### 4.1.2 Preparação da Mistura Simples e do Complexo HP $\beta$ CD-Insulina(HP $\beta$ CD-I)

Nos primeiros testes realizados para a preparação da amostra do complexo a proporção, de HP $\beta$ CD e insulina humana recombinante liofilizada, escolhida foi 1:10 (w/w). No entanto, as técnicas espectroscópicas não indicavam a interação entre as moléculas e novas amostras em diferentes proporções precisaram ser preparadas. Assim, o FT-Raman e FTIR-ATR indicaram que a amostra preparada na proporção 1:5 (w/w) mostrava indícios de complexação. Portanto, as amostras do complexo e mistura simples preparadas nesta proporção que foram analisadas no presente trabalho. E a seguir descrevemos brevemente a metodologia utilizada na preparação de ambas.

A mistura simples foi preparada utilizando HP $\beta$ CD e insulina humana recombinante liofilizada na proporção 1:5 (w/w). As substâncias foram manualmente misturadas por período de 20 minutos utilizando gral e pistilo.

A metodologia de co-precipitação foi utilizada na elaboração do complexo HP $\beta$ CD-I, por meio da mistura da insulina com a HP $\beta$ CD na proporção de 1:5 (w/w), com adição de 10 mL de água purificada para cada 100 mg de complexo. Após a dissolução completa do material, a mistura foi agitada por 30 min à temperatura ambiente (25 °C), posteriormente mantida em repouso por 60 min e, então, liofilizada.

### 4.1.3 Elaboração do GEL (Curativos Não Adesivos) e suas Formulações

Para a elaboração do gel o polímero utilizado foi o carbopol 940<sup>®</sup> na concentração de 0,5% (w/w), devido ser reconhecidamente seguro e apresentar boa consistência (20).

A formulação contendo apenas gel (curativo controle) foi preparada pela dispersão do polímero carbopol 940<sup>®</sup> em uma quantidade conhecida de água purificada. Sob aquecimento brando o metilparabeno (0,02%, w/v), o propilparabeno (0,01%, w/v) e a glicerina bidestilada foram dissolvidos e incorporados à dispersão do carbopol 940<sup>®</sup>, e permaneceram em repouso por um período de 12 h. Após este tempo, o gel formado foi agitado e pH corrigido para faixa de 5,0 - 7,0 com trietanolamina (20). Quantidade definida de insulina e, também, do complexo HP $\beta$ CD-I foi incorporada ao curativo não adesivo controle para elaboração das demais formulações, conforme Tabela I.

**Tabela I** Composição das Formulações do gel (Curativos Não Adesivos)

	<b>Formulação A Gelcom complexo HP<math>\beta</math>CD-I (g)</b>	<b>Formulação B Gelcom Insulina (g)</b>	<b>Formulação C Gel controle (g)</b>
Carbopol 940 <sup>®</sup>	0.500	0.500	0.500
Glicerina Bidestilada	3.00	3.00	3.00
Metilparabeno	0.200	0.200	0.200
Propilparabeno	0.100	0.100	0.100
Trietanolamina	1.758	1.758	1.758
Complexo HP $\beta$ CD-I (1:5)	8.75 (10 <sup>-3</sup> )*	-	-
Insulina humana	-	1.75 (10 <sup>-3</sup> )*	-
Água purificada q.s.	100	100	100

\* 1.75(10<sup>-3</sup>) g de insulina correspondente a 50 UI

#### 4.1.4 Caracterização dos complexos de inclusão

##### *FT-Raman*

Os espectros Raman da insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples e complexo foram obtidos utilizando um Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (modelo Vertex 70v com módulo Ram II, Bruker, Alemanha) equipado com um detector de germânio refrigerado com nitrogênio líquido. Um laser Nd:YAG foi utilizado para uma excitação em 1064 nm com potência de 200 mW. A varredura espectral foi entre 4000-400 cm<sup>-1</sup> com 4 cm<sup>-1</sup> de resolução espectral. O espectro final para cada amostra é resultado de uma média de 500 varreduras. Todos os espectros foram corrigidos em relação à linha de base. As medidas foram realizadas em duplicatas.

##### *FTIR-ATR*

Espectros de absorção, na região do infravermelho, da insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples e complexos foram obtidos utilizando um Espectrômetro FTIR da Varian (modelo 7000) equipado com acessório horizontal de refletância total atenuada. A faixa espectral foi 6000-650 cm<sup>-1</sup> com 4 cm<sup>-1</sup> de resolução espacial. O ângulo de incidência foi de 45° com respeito à superfície do cristal ZnSe, onde a amostra foi posicionada. O espectro para cada amostra é uma média de 128 espectros individuais. Todos os espectros foram corrigidos utilizando como referência o ar e com a amostra na temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em duplicatas.

##### *Espectroscopia H<sup>1</sup>RMN*

Os espectros de insulina ( $0,7 \times 10^{-2}$  g/mL), HP $\beta$ CD ( $2,8 \times 10^{-2}$  g/mL), e complexo HP $\beta$ CD-I ( $3,5 \times 10^{-2}$  g/mL) foram obtidos usando um espectrômetro RMN Varian, (modelo Mercury plus 300, Califórnia, EUA), de 300,06 MHz ( $H^1$ ) e 75,45 MHz ( $C^{13}$ ). Ácido acético deuterado ( $CD_3COOD$ ) a 30% (v/v) em água deuterada ( $D_2O$ ) foi usado como solvente, em tubos de RMN de diâmetro de 5 mm, e foram apresentados em partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do solvente ( $CD_3COOD$ : 2,04 ppm), com uma resolução de  $\pm 0,01$ . Os parâmetros de aquisição principais foram: o tempo de espera de (d1) 2s, pulso (pw) de 45 °, com 256 repetições.

## 4.2 Parte II

### 4.2.1 Curcumina

A curcumina e  $\beta$ -CD foram adquiridas da empresa Sigma Chemical Company, (St. Louis, MO, EUA). Todos os solventes eram de grau analítico.

### 4.2.2 Métodos para a preparação de complexo

Os complexos de inclusão de curcumina e  $\beta$ -CD foram preparados na razão molar de 1:2, respectivamente, utilizando as técnicas de co-precipitação, liofilização e evaporação do solvente.

#### *Co-precipitação*

O método descrito por Marcolino e colaboradores (2011)<sup>[18]</sup> foi utilizado com algumas modificações. Preparou-se uma solução aquosa de  $\beta$ -CD 0,06 mol/L, a qual foi mantida a 60°C. A esta solução adicionou-se uma solução de 1,9 g de curcumina diluída em etanol a 60°C. A mistura foi agitada vigorosamente a 70 °C durante 4 h, com refluxo. O etanol foi removido utilizando um rota-evaporador. A solução foi resfriada a 25 °C, agitada durante 8 h e em seguida armazenada durante 12h a 4 °C. Posteriormente, foi filtrada, e o produto cristalino obtido foi seco em estufa a 50-55 °C e armazenado para a caracterização.

### ***Liofilização***

O método descrito por Mohan e colaboradores (2012)<sup>[75]</sup> foi utilizado com algumas adaptações.  $\beta$ -CD foi dissolvida em 30 ml de água, em um erlenmeyer de 250 mL, e agitada até que uma solução límpida fosse obtida. A esta solução adicionou-se 210 mg de curcumina previamente diluída em etanol. Outra solução foi preparada de um modo semelhante sem o uso de etanol. As misturas foram agitadas em uma incubadora a 180 rpm durante 7 dias a 37 °C. Em seguida, as misturas reacionais foram filtradas através de um filtro 0,45  $\mu$ m, e as soluções transparentes foram liofilizadas para se obter complexos sólidos, que foram estocados para a caracterização.

### ***A evaporação do solvente***

O método descrito por Yallapu e colaboradores (2010)<sup>[76]</sup> foi utilizado para evaporação do solvente. A  $\beta$ -CD foi dissolvida em 8 ml de água em um béquer com uma barra de agitação magnética. Enquanto a solução foi agitada, 16,9 mg de curcumina dissolvida em 500  $\mu$ L de acetona foi adicionada. A solução foi agitada durante 12h e centrifugada a 134 $\times$ g durante 5 min. O sobrenadante que continha o complexo foi recuperado por liofilização e armazenado para a caracterização.

## **4.2.3 Caracterização dos complexos de inclusão**

### ***FTIR***

Os espectros FTIR da curcumina,  $\beta$ -CD, misturas simples e complexos foram obtidos utilizando um Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (modelo Vertex 70v, Bruker, Alemanha). A faixa espectral foi 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  com 128 varreduras e uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram misturadas em pó de KBr e então prensadas em forma de pastilhas para realizar as medições. A mistura foi realizada com 200 mg de KBr e cerca de 1% desse valor foi completado com a amostra a ser analisada. Todos os espectros foram corrigidos em relação à linha de base. As medidas foram realizadas em duplicatas.

### ***FT-Raman***

Os espectros Raman da curcumina,  $\beta$ -CD, misturas simples e complexos foram obtidos utilizando Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (modelo

Vertex 70v com módulo Ram II, Bruker, Alemanha) equipado com um detector de Germânio refrigerado com nitrogênio líquido. Um laser Nd: YAG foi usado para a excitação em 1064 nm com potência na faixa de 5 até 200 mV. Todos os espectros foram uma média de 500 varreduras com  $4 \text{ cm}^{-1}$  de resolução espectral. Todos os espectros foram corrigidos em relação à linha de base. As medidas foram realizadas em duplicatas.

#### ***Espectroscopia Fotoacústica (PAS)***

Os espectros da curcumina,  $\beta$ -CD, mistura simples e complexos, foram realizadas utilizando uma montagem experimental desenvolvida no Grupo de Estudos de Fenômenos Fototérmicos e Fotoacústicos na Universidade Estadual de Maringá. Todos os espectros foram obtidos a uma frequência de modulação de 21 Hz, e registrados entre 200 e 800 nm, com a potência da lâmpada de 700 W. Os espectros foram analisados por deconvolução Gaussiana.

#### ***Difração de raio-X***

Os difratogramas de raios-X da curcumina,  $\beta$ -CD, misturas simples e complexo de curcumina-  $\beta$ -CD, preparados pelo método de co-precipitação, foram obtidos usando um difratômetro de raios-X (modelo LabX XRD-6000, da Shimadzu, Japão), e as amostras foram investigadas no intervalo de  $2\theta$  entre  $2^\circ$ - $60^\circ$ .

### **4.3 Arranjo Experimental**

#### ***Espectroscopia no Infravermelho***

Os espectros na faixa do infravermelho do espectro eletromagnético foram obtidos utilizando um espectrômetro infravermelho por Transformada de Fourier. A utilização deste sistema apresenta diversas vantagens quando comparado com sistemas à base de componentes dispersivos, melhorando a aquisição dos espectros<sup>[67]</sup>.

O espectrômetro infravermelho por Transformada de Fourier é baseado no fenômeno de interferência da radiação entre dois feixes, devido a uma mudança de comprimento em suas trajetórias. Como resultado é produzido um sinal conhecido como interferograma que posteriormente será convertido, pelo método matemático Transformada de Fourier, no espectro da amostra<sup>[67]</sup>. Os componentes básicos do espectrômetro

estão esquematizados na Figura 4. 1. A radiação oriunda da fonte passa através de um interferômetro para a amostra, antes de atingir um detector. Em seguida o sinal é amplificado e convertido para a forma digital por um conversor analógico-digital e transferido para o computador para efetuar-se a transformada de Fourier<sup>[67]</sup>.



Figura 4. 1- Os componentes básicos de um espectrômetro FTIR<sup>[67]</sup>.

O interferômetro é a parte mais importante do espectrômetro, é nele que os feixes de radiação têm sua trajetória alterada e, conseqüentemente, sofrem interferência gerando o interferograma. O interferômetro de Michelson é o mais comumente utilizado em espectrômetros FTIR<sup>[67]</sup>. Ele consiste em dois espelhos planos, perpendiculares entre si, em que um é capaz de se deslocar numa direção perpendicular ao plano (Figura 4. 2). O feixe de excitação, de radiação policromática, atinge o divisor de feixe no qual parte é transmitida e parte é refletida. O feixe refletido incide em um espelho fixo, enquanto que o feixe transmitido incide em um espelho móvel. Ambos os feixes refletidos pelos espelhos incidem novamente no divisor de feixe, e o novo feixe transmitido atinge a amostra que após atravessá-la incide no detector de DTGS (deuterated triglycine sulfato)<sup>[67]</sup>. O espelho em movimento é quem produz a diferença de caminho óptico entre os dois braços do interferômetro, gerando a interferência entre os dois feixes de radiação. Se a posição do espelho móvel é tal que os dois feixes percorrem a mesma distância antes de chegar ao detector ( $\delta=n\lambda$ , onde  $n=0,1,2,\dots$ ), significa que os dois feixes estão em fase, reforçando um ao outro. Sofreram, portanto, interferência construtiva e, neste caso, a energia que chega ao detector será máxima<sup>[67]</sup>. Por outro lado, se a posição do espelho móvel produz diferenças nos caminhos percorridos pelos dois feixes de  $(n+1)\lambda/2$ , então os dois feixes estarão fora de fase, cancelando um ao outro. A energia que chega ao detector, nesse caso, será mínima e eles terão sofrido interferência destrutiva<sup>[67]</sup>. Assim, à medida que o espelho móvel se desloca alterando sua posição um interferograma é formado, Figura 4. 3.

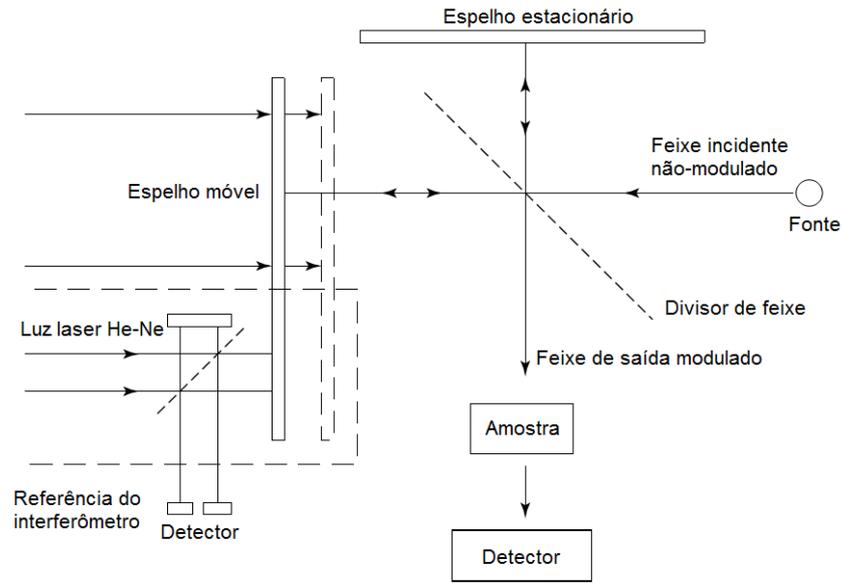


Figura 4. 2 – Arranjo esquemático de um Intefeerômetro Michelson<sup>[67]</sup>.

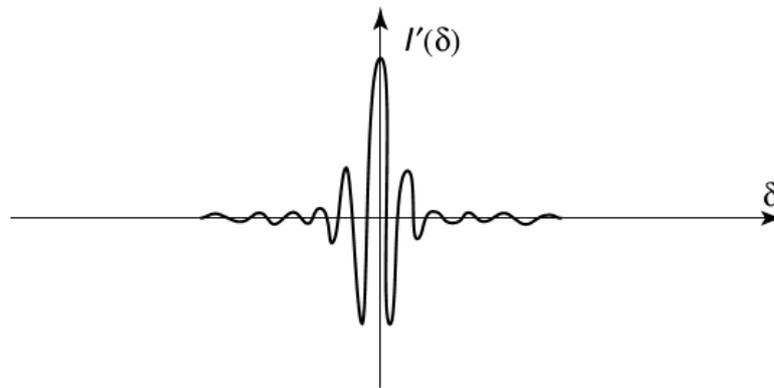


Figura 4. 3-Interferograma obtido de radiação policromática<sup>[67]</sup>.

A intensidade da radiação que chega ao detector,  $I(\delta)$ , varia como uma função cosseno do atraso entre os caminhos dos dois feixes,  $\delta$ <sup>[67]</sup>.

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\bar{\nu} \tag{4.1}$$

Em que  $B(\bar{\nu})$  é a densidade de potência espectral de um determinado número de onda  $\bar{\nu}$ . O interferograma traz todas as informações sobre o material, uma vez que ele é formado por todas as ondas de diferentes frequências que passam pelo interferômetro<sup>[67]</sup>. Embora ele forneça todos estes dados, a forma como ele é apresentado não é útil ou de fácil interpretação para o experimentador. Assim, um algoritmo com base na transformada de Fourier é aplicado ao interferograma obtido da amostra convertendo-o no espectro:

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\delta \quad (4.2)$$

As equações (4.1) e (4.2) podem ser convertidas uma na outra pelo método matemático da Transformada de Fourier<sup>[67]</sup>.

O divisor de feixe é composto de diferentes materiais, e tem de ser escolhido de acordo com a região a ser examinada. No presente trabalho, o divisor era composto de brometo de potássio (KBr) para as medidas de FTIR e de fluoreto de cálcio (CaF<sub>2</sub>) para as medidas dos espectros Raman. Ambos foram escolhidos para serem transparentes no intervalo desejado para a obtenção dos espectros.

A precisão da posição da banda de infravermelho é a precisão com que a posição do espelho é conhecida. Assim, utilizando um laser de He-Ne como referência, a posição do espelho é conhecida com precisão elevada o que acarreta em alta resolução das bandas nos espectros.

Com base no funcionamento do espectrômetro diversos métodos são utilizados para obter os espectros dos materiais na região do infravermelho. O mais antigo e amplamente utilizado é o de transmissão. Esta técnica baseia-se na absorção de radiação infravermelha em comprimentos de onda específicos à medida que passa através de uma amostra<sup>[67]</sup>. Possibilita análises em amostras líquidas, sólidas ou gasosas. Em nosso caso, para as medidas de FTIR por transmissão, as amostras (de curcumina ou a base desta) foram misturadas ao pó de KBr e pastilhadas em prensa mecânica até adquirirem qualidade óptica apropriada para as medidas. Medindo-se a radiação transmitida ao longo do material, a fração por ela absorvida é conhecida. E desta informação caracteriza-se o material em estudo, visto que cada material absorve a radiação em comprimentos de ondas diferentes e com amplitudes variadas.

Outro método que pode ser usado é baseado na reflexão da radiação. Podem ser utilizados para as amostras que são difíceis de analisar pelo método convencional de transmitância. Esta técnica foi aplicada na análise das amostras de insulina, uma vez que não era adequado prensá-las para formar as pastilhas. Métodos de refletância podem ser divididos em duas categorias: a de refletância interna, usando uma célula de refletância total atenuada em contato com a amostra. E também medidas de refletância externa que envolve um feixe de infravermelho refletido diretamente a partir da superfície da amostra<sup>[67]</sup>.

O método de refletância total atenuada é baseado no fenômeno da reflexão interna total. Neste, um feixe de radiação entrando em um cristal sofrerá este fenômeno se o

ângulo de incidência na interface amostra-cristal for maior que o ângulo crítico. Este ângulo é uma função que depende dos índices de refração das duas superfícies (ar/cristal ou amostra/cristal), mostrado na Figura 4. 4. Neste arranjo o feixe de radiação penetra uma fração de um comprimento de onda além da superfície do cristal (meio mais denso). Em contato com este está o material (meio menos denso) que absorve a radiação seletivamente. Assim, o feixe perde energia no comprimento de onda em que o material absorve, esta radiação atenuada é medida e representada graficamente como uma função do comprimento de onda, gerando o espectro de absorção do material<sup>[67]</sup>. A profundidade de penetração é dada pela seguinte equação:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 [\sin \theta - (n_1/n_2)^2]^{1/2}} \quad (4.3)$$

Em que  $n_1$  e  $n_2$  são os índices de refração da amostra e do cristal respectivamente,  $\lambda$  o comprimento de onda e  $\theta$  o ângulo de incidência do feixe de radiação.

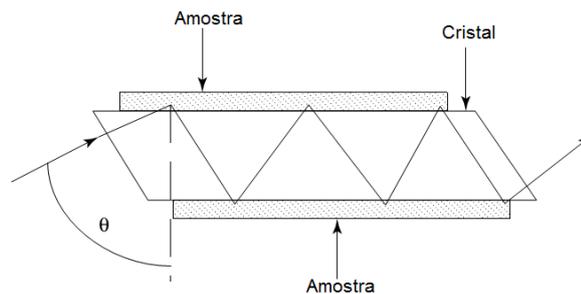


Figura 4. 4–Arranjo esquemático de uma célula de Refletância Total Atenuada (ATR)<sup>[67]</sup>.

Os cristais utilizados em células ATR são feitos a partir de materiais que têm baixa solubilidade em água e possuem alto índice de refração. O cristal utilizado no presente trabalho era composto de seleneto de zinco (ZnSe), de reflexão única<sup>[67]</sup>.

### ***Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman)***

A espectroscopia Raman por Transformada de Fourier é uma técnica que envolve a medida do efeito Raman utilizando um laser Nd: YAG, emitindo em 1064 nm, acoplado ao espectrômetro de FTIR. Este método foi primeiramente sugerido em 1964 por Chantryand Gebbie<sup>[66]</sup>. No entanto, levou mais de 20 anos para que fosse viável sua utilização devido à falta de tecnologia e desenvolvimento da época. Atualmente, a maio-

ria dos equipamentos de FTIR pode ser acoplada a um acessório Raman para obter seus respectivos espectros, além da possibilidade de utilizar os recursos tecnológicos desenvolvidos para o FTIR, como softwares de espectroscopia<sup>[66]</sup>.

A Figura 4. 5 mostra o diagrama óptico de um espectrômetro de FT-Raman. A radiação monocromática (laser) incide sobre a amostra com a ajuda de uma lente e um espelho parabólico. A luz espalhada pela amostra é coletada e direcionada para o interferômetro Michelson onde passa pelo divisor de feixe atingindo o espelho móvel e fixo. Em seguida, a radiação atravessa uma série de filtros dielétricos e é, então, focada em um detector de Germânio (Ge) refrigerado com nitrogênio líquido. Os dados coletados são processados computacionalmente e então graficados para se obter os espectros Raman dos materiais<sup>[66]</sup>.

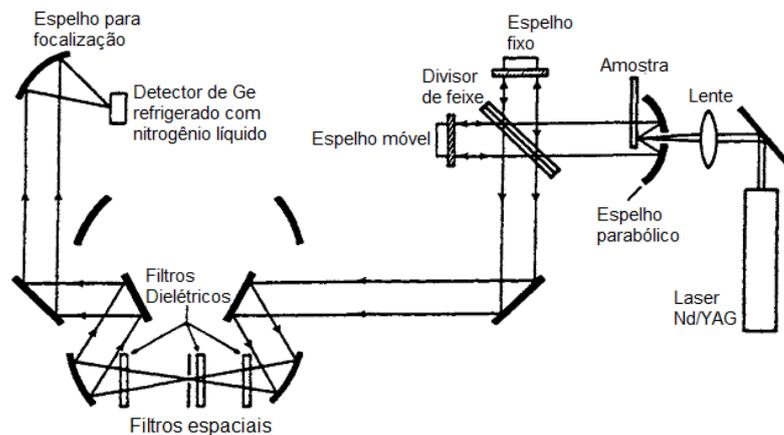


Figura 4. 5–Arranjo esquemático de espectrômetro FT-Raman. O principal componente continua sendo o interferômetro<sup>[66]</sup>.

As técnicas que envolvem o sistema por Transformada de Fourier (FT) apresentam importantes vantagens quando comparadas aos sistemas que utilizam equipamentos dispersivos, mais antigos. Uma delas é a melhoria na razão Sinal/Ruído. Isto é consequência do espectrômetro por FT não requerer o uso de uma fenda ou outro dispositivo de restrição, a fonte de saída pode passar total e continuamente através da amostra. Isto resulta num ganho substancial em energia no detector. Outra vantagem de suma importância, e a velocidade do espelho. Ele pode se deslocar a pequenas distâncias rapidamente e sua posição é determinada de forma extremamente precisa. Isto em conjunto com a melhoria do Sinal/Ruído permite obter espectros em uma pequena escala de tempo, incluindo milissegundo. Além de uma alta resolução nos mesmos. Em particular para FT-Raman, pode eliminar ou reduzir o efeito da fluorescência, que mascara o efeito Raman. Possibilita também obter ambos os efeitos Raman, Stokes e Anti-Stokes. É im-

portante ainda frisar que em um mesmo equipamento, espectrômetro, com o simples acoplamento de acessórios é possível obter tanto espectros Raman quanto infravermelho<sup>[66]</sup>.

### *Espectroscopia Fotoacústica(PAS)*

O arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para a realização dos experimentos está esquematizado na Figura 4. 6.

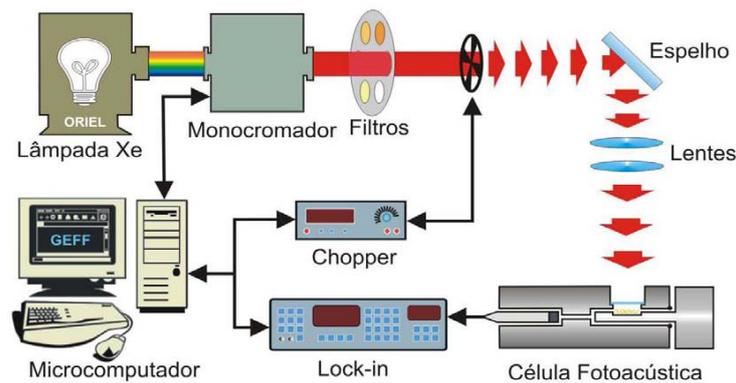


Figura 4. 6 – Representação esquemática do arranjo experimental da PAS.

Nesta montagem a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio da marca Oriël, modelo 68820, com potência de até 1000 Watts [W], e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. O monocromador, modelo 77250 (1/8 m) da Oriël, foi utilizado com fendas de entrada e saída, ajustadas em 3,16 mm. A grade de difração é da marca Oriël em que foi utilizado o modelo 77296. Para eliminar ordens superiores de difração filtros foram usados. A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico, modelo SR 540 da Stanford Research Systems que, com um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador Lock-in. As lentes da montagem devem fazer com que a amostra seja excitada na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica após ser transmitida através de uma janela de quartzo, já que este material é transparente na região espectral de emissão da lâmpada.

A célula fotoacústica utilizada tem formato cilíndrico e está representada na Figura 4. 7. O microfone acoplado à célula fotoacústica é da marca Brüel & Kjaer, modelo BK 2669, e está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o Lock-in (amplificador sincronizado) modelo 5110 da

marca EG & G Instruments. O Lock-in fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB.

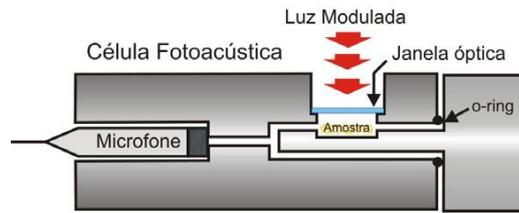


Figura 4. 7 – Célula fotoacústica fechada vista lateralmente.

Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, o sinal é então normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

## *Resultados e Discussão*

### **5.1 Parte I - Complexo de inclusão entre ciclodextrina e insulina**

#### **FT-Raman**

Os espectros Raman da insulina e do complexo HP $\beta$ CD estão mostrados na Figura 5.1. Os números de onda do centro de cada banda estão indicados para facilitar a identificação. As posições espectrais são concordantes com as obtidas em trabalhos anteriores<sup>[31][38][79][80]</sup>. O espectro da insulina mostra as bandas associadas aos resíduos de aminoácidos. Os picos em 1003, 1587 e 1605  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos aos modos vibracionais do anel da Fenilalanina. Os resíduos de tirosina apresentam espalhamento Raman em 644, 853, 1618  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 519  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído a vibrações de estiramento (S-S) das ligações dissulfeto nos resíduos de cisteína. Outra banda associada a esse aminoácido acontece em 673  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento (C-S). A região em torno de 1110  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração do estiramento (C-N). O pico em 1345  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à deformação do CH, e o pico em 1465  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído à deformação do CH<sub>2</sub>. Outras bandas características da insulina são as das amidas, elas ligam os aminoácidos da cadeia e são sensíveis às mudanças na estrutura secundária da proteína. Pode ser observada a amida III, apresentando bandas aproximadamente de 1240 a 1288  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 1265  $\text{cm}^{-1}$  é um exemplo da amida III na estrutura  $\alpha$ -hélice. Os picos em 1658 e 1676  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a amida I nas estruturas  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, respectivamente.

No espectro Raman da HP $\beta$ CD nota-se a ocorrência de picos referentes às vibrações de deformação no plano do anel de glicose em 480, 709, 758  $\text{cm}^{-1}$ . Os picos em 852

e  $928\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos ao modo “breath” do anel de glicose. O estiramento do (C-O-C) envolvendo as ligações  $\alpha,1-4$  aparecem em  $951\text{ cm}^{-1}$ . A vibração estiramento do (C-C) ocorrem em  $1127\text{ cm}^{-1}$ . Os picos em  $1046$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos à vibração do estiramento (C-O). As vibrações do modo “tesoura” do (C-H) aparecem em  $1256$ ,  $1333$ ,  $1386\text{ cm}^{-1}$ .

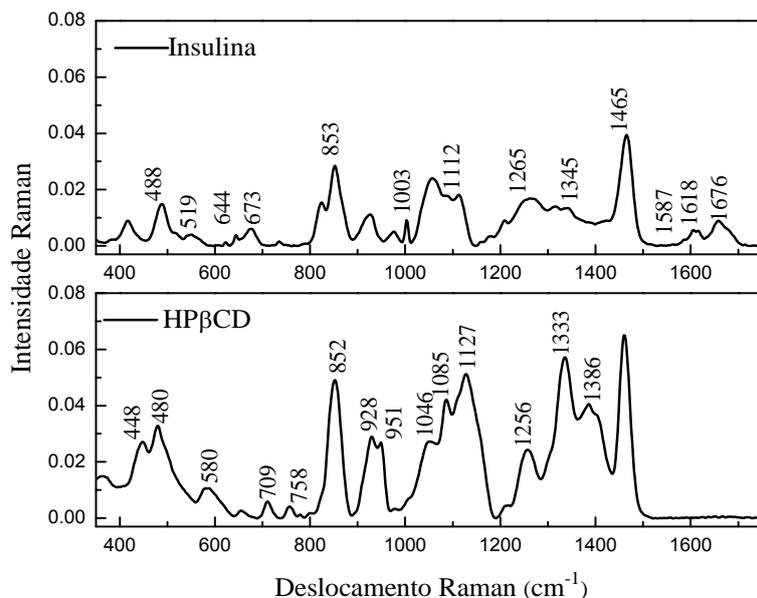


Figura 5.1– Espectros Raman da insulina e da HP $\beta$ CD.

Embora as CDs tenham sido empregadas com êxito na estabilização e auto agregação de proteínas e peptídeos <sup>[32][40][42]</sup>, essas moléculas são também hidrofílicas e volumosas para serem totalmente incluídas na cavidade da CD. Esses fatores podem reduzir a formação do complexo de inclusão, assim a interação pode ocorrer apenas localmente no hospedeiro, indicando que o lado hidrofóbico acessível da cadeia possa formar complexo de inclusão com a CD <sup>[39]</sup>. Desta forma a espectroscopia Raman foi empregada com a perspectiva de avaliar a interação entre a insulina e a HP $\beta$ CD, e que partes da proteína estariam sendo modificadas pela presença do agente complexante. Conhecido o espectro Raman dos compostos puros pode-se avaliar essa interação uma vez que, como visto na Figura 5.1, cada vibração referente aos modos vibracionais de diferentes partes da molécula ocorrem em frequências distintas. Isto possibilita que modificações no espectro Raman de ambos compostos após a complexação possam ser identificados e correlacionados com alterações ocorridas em diferentes partes do esqueleto peptídico. Na Figura 5.2 são apresentados os espectros Raman para as amostras de insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples e complexo (HP $\beta$ CD-I).

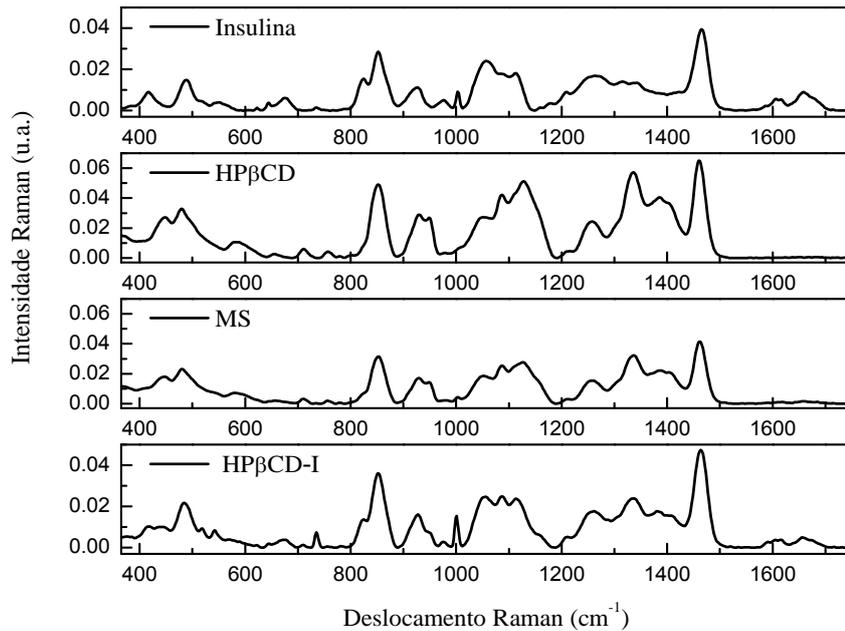


Figura 5.2 –Espectro Raman da insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples entre a insulina e a HP $\beta$ CD, e complexo (HP $\beta$ CD).

Para uma análise mais precisa os dados foram tratados com funções gaussianas a fim de separarmos a contribuição de cada vibração associada à insulina e à ciclodextrina. Além disso, verificar modificações em suas intensidades e posições, consideradas sinais indicativos da interação entre as moléculas.

A Figura 5.3 mostra os espectros Raman ajustados para os compostos puros (a) e (b), o suposto complexo de inclusão (c) e a mistura simples (MS) (d), na região espectral entre 400 a 640  $\text{cm}^{-1}$ . Neste intervalo espectral há a vibração em 519  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento (S-S) das pontes dissulfeto. A insulina apresenta três destas pontes, sendo que duas mantêm as cadeias da molécula unidas<sup>[32][33]</sup>. Assim, a estabilidade dessas pontes é extremamente importante na conformação da insulina e elas são determinantes para a atividade biológica da proteína<sup>[32]</sup>. Portanto, deslocamentos na posição associada à ligação S-S podem indicar que haja alguma instabilidade na insulina.

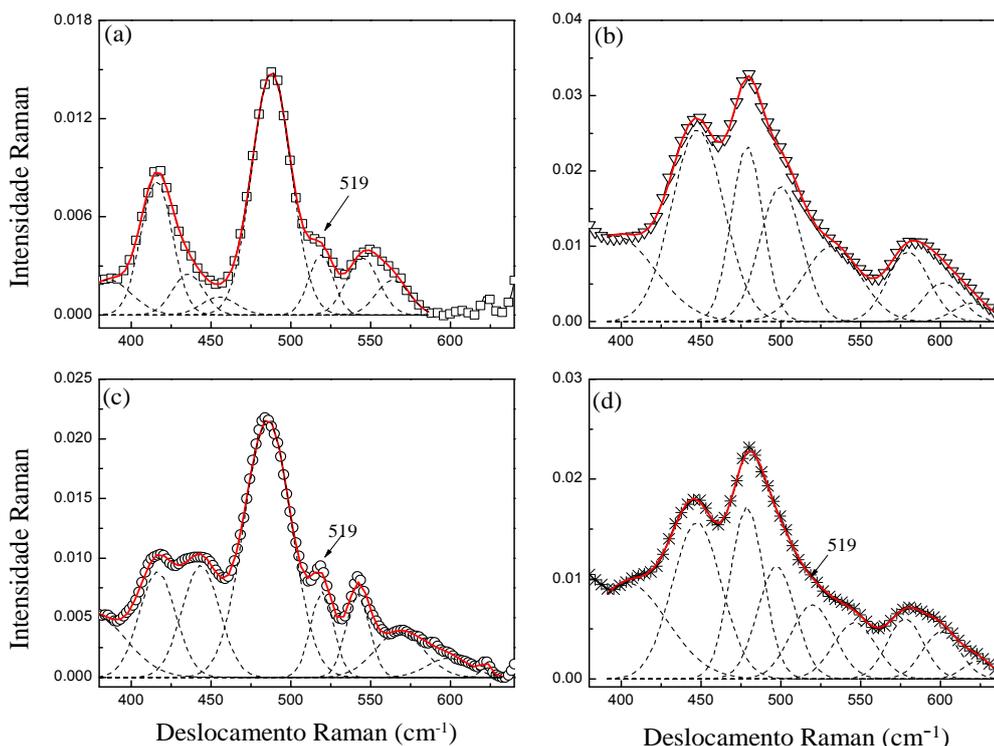


Figura 5.3–Espectro Raman das amostras (símbolo) e curvas gaussianas ajustadas (linha): (a) insulina, (b) HPβCD, (c) complexo HPβCD-insulina e (d) mistura simples. A legenda para as linhas e símbolos seguirá o mesmo padrão para as próximas figuras.

Analisando os espectros é possível observar que não há deslocamentos na posição em  $519\text{ cm}^{-1}$  tanto para o complexo quanto para a mistura simples. No entanto, um estreitamento do pico é observado para o complexo. Este efeito pode ter ocorrido devido a não associação das moléculas de insulina na presença da HPβCD, já que esta inibe sua auto agregação. Para a mistura física, em que as duas moléculas estão simplesmente misturadas, observa-se que seu espectro é simplesmente a soma dos espectros das matérias primas. No trabalho de Zhang e colaboradores (2009) há o relato de que o uso da HPβCD pode aumentar a estabilidade das pontes de dissulfeto. Eles mostraram que a CD apresenta efeitos positivos na estabilidade da insulina em meio ácido e básico e sob altas temperaturas. Eles reforçam ainda que a Espectroscopia Raman pode ser uma ferramenta útil e inovadora no estudo da estabilidade desse hormônio.

A análise das demais regiões dos espectros Raman foi análoga ao realizado para o intervalo apresentado na Figura 5.3. Neste sentido, a Figura 5.4 mostra os espectros deconvoluídos e a Figura 5.5 mostra as áreas das gaussianas obtidas para o espectro da insulina, HPβCD e complexo de inclusão, mistura física no intervalo entre  $630$  a  $730\text{ cm}^{-1}$ , em função da posição central dos picos.

Comparando a Figura 5.5 (a) e (b) nota-se que a MS é composta pela soma das contribuições dos compostos puros, enquanto que o complexo de inclusão apresenta algumas alterações. A banda em  $673\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento C-S da insulina, exibe um deslocamento no espectro do complexo em relação à posição dessa mesma banda para a insulina pura. Antes da complexação essa banda apresenta-se mais alargada, no entanto, após a adição da HP $\beta$ CD o espectro nessa região fica mais definido e é possível observar um ombro em  $666\text{ cm}^{-1}$ , atribuído também ao grupo C-S. Isso justifica o aumento significativo dessa banda no espectro do complexo. Esses resultados com relação ao estiramento C-S provavelmente ocorreram em razão da não agregação entre as moléculas de insulina proporcionada pela interação com a CD.

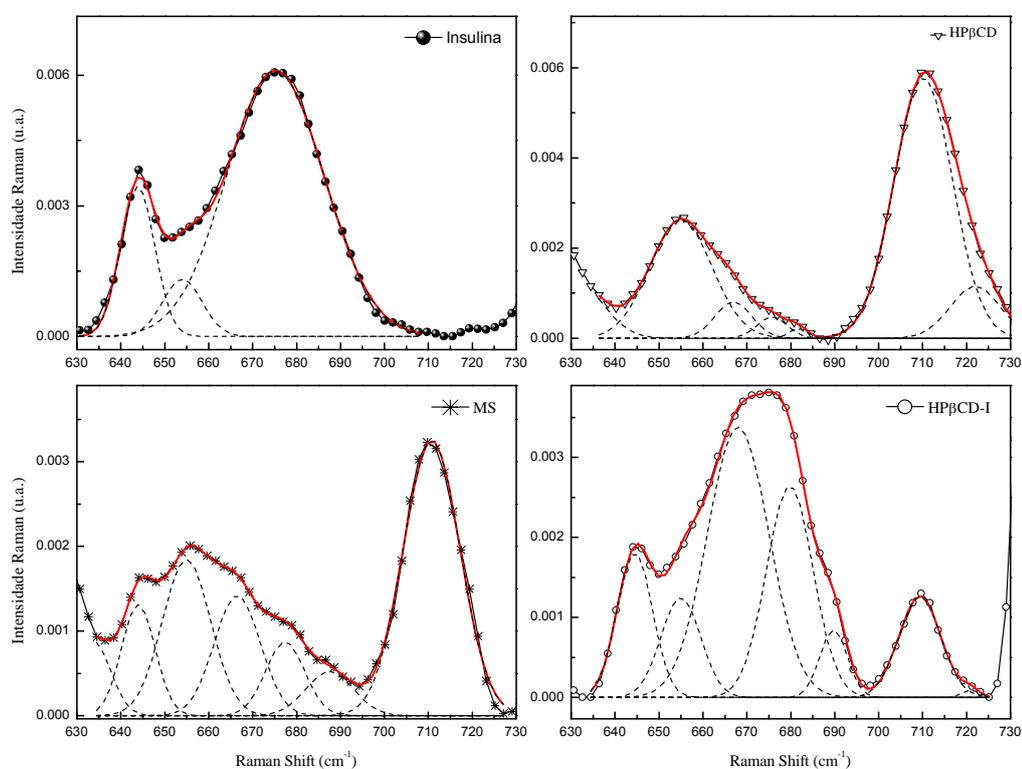


Figura 5.4 –Espectro Raman das amostras de insulina, HP $\beta$ CD, complexo HP $\beta$ CD-insulina e mistura simples para o intervalo entre  $630$  e  $730\text{ cm}^{-1}$ .

É preciso ressaltar que, assim como a insulina, as bandas da HP $\beta$ CD também podem ser modificadas nesse processo de interação, principalmente onde há a contribuição exclusiva da molécula para o espectro total. Na Figura 5.5 (a) uma diminuição considerável na banda em  $709\text{ cm}^{-1}$ , referente à vibração do anel de glicose da HP $\beta$ CD, pode ser observada para o espectro do complexo. Fato este que não acontece quando as amostras foram simplesmente misturadas, Figura 5.5(b). Esse desfavorecimento na vibração do anel pode ser resultado da presença de um hóspede na cavidade da CD, dificultando as-

sim esse movimento de estiramento de todos os átomos do anel simultaneamente, conhecido como “breath” do anel.

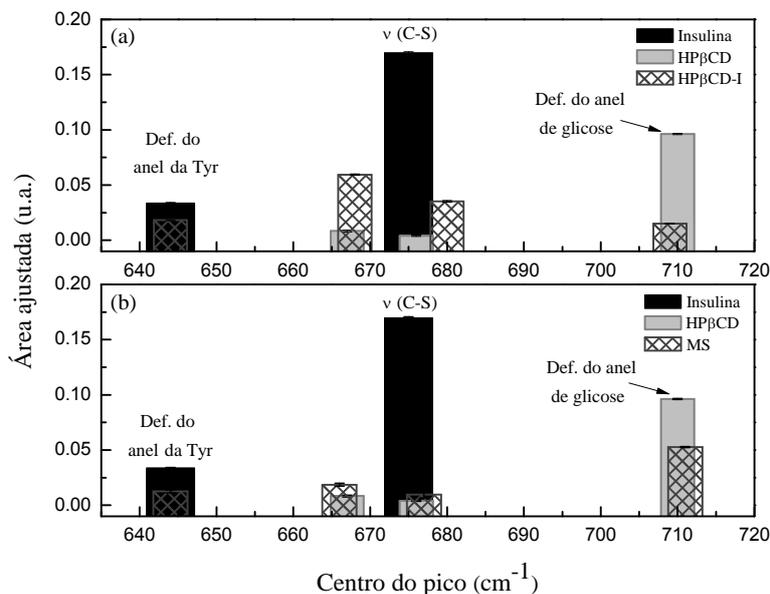


Figura 5.5 – Comparação das áreas ajustadas por deconvolução gaussiana para insulina, HPβCD, complexo e mistura física para a região espectral entre 630 e 720  $\text{cm}^{-1}$ . O símbolo v representa o modo estiramento entre os átomos.

A Figura 5.6 mostra os espectros para a região entre 910 e 1020  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 951  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração do estiramento (C-O-C) envolvendo as ligações  $\alpha,1-4$ , mostradas na Figura 2.13. Essa ligação é de extremo interesse uma vez que está voltada para dentro da cavidade da CD. Deste modo, alterações nas bandas atribuídas a essa vibração podem significar a inserção de um hóspede na cavidade da CD, indicando a formação do complexo de inclusão.

Comparando as áreas na Figura 5.7 (a) e (b) pode-se observar que a banda em 951  $\text{cm}^{-1}$ , com relação a 929  $\text{cm}^{-1}$  é reduzida consideravelmente para o espectro do complexo, Figura 5.7(a), o que não é observado para a mistura simples, em que a proporção entre as duas bandas permanece inalterada. Este resultado nos permite sugerir que a introdução de alguma parte da cadeia da insulina na cavidade da CD tenha dificultado a vibração referente à ligação envolvendo o enlace glicosídico, caracterizando assim a diminuição na intensidade da banda observada.

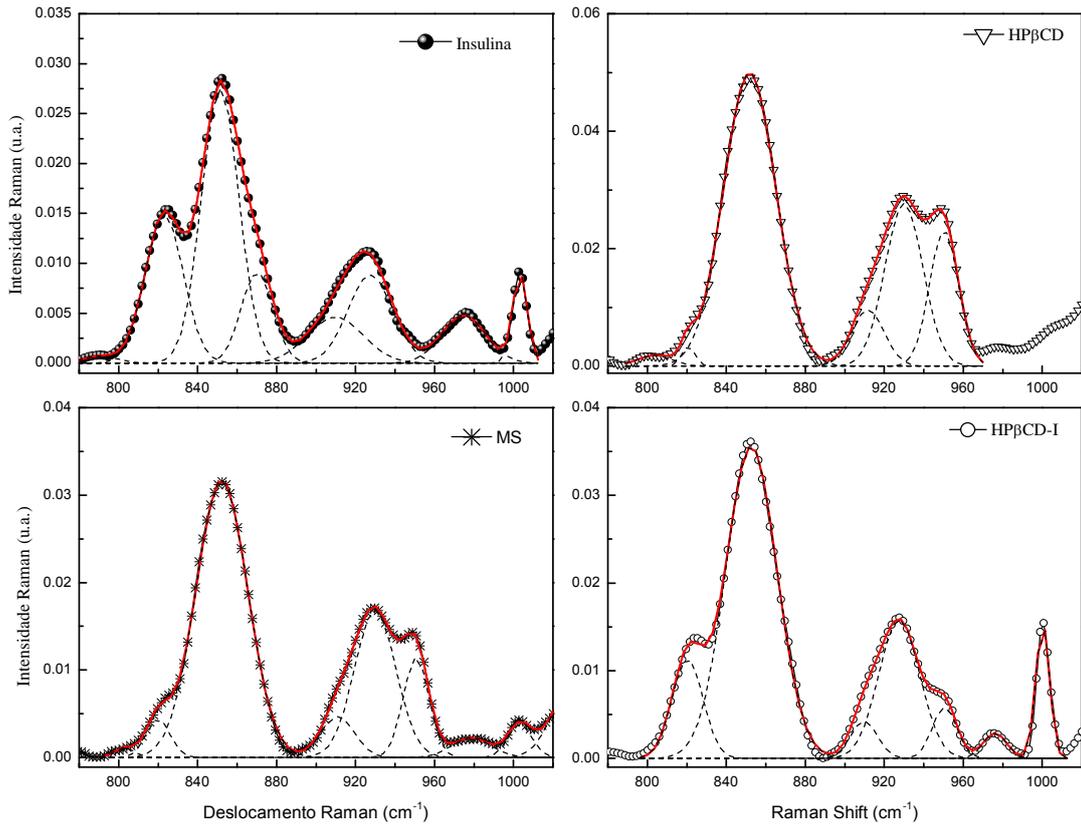


Figura 5.6 –Espectro Raman das amostras de insulina, HPβCD, complexo HPβCD-insulina e mistura simples para o intervalo entre 800 e 1020  $\text{cm}^{-1}$ .

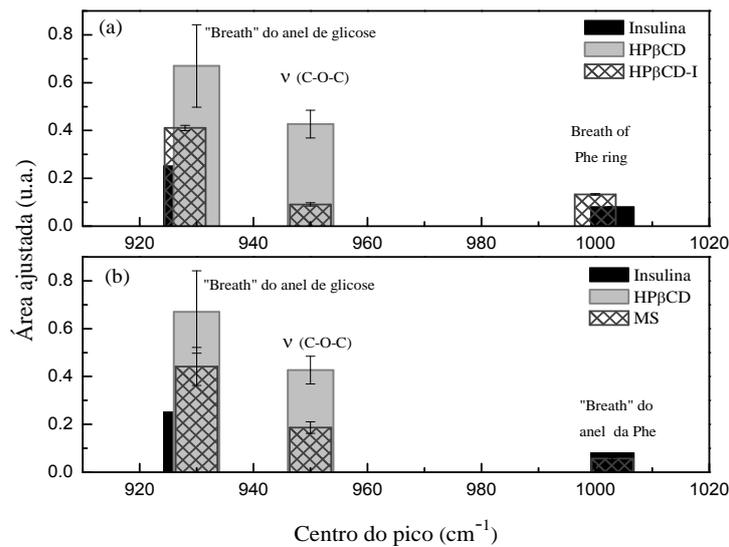


Figura 5.7 –Comparação das áreas ajustadas por deconvolução gaussiana para insulina, HPBCD, complexo e mistura física para a região espectral entre 910 e 1020  $\text{cm}^{-1}$ .

A capacidade da ciclodextrina de formar complexo de inclusão com proteínas e peptídeos, assim como estudos de caracterização do complexo (insulina: CDs) são amplamente relatados na literatura<sup>[15][32][40][41][42]</sup>. No entanto, até o presente momento nenhum trabalho reporta a utilização da Espectroscopia Raman como técnica de investigação da interação insulina/HP $\beta$ CD em seus estudos. Irie (1999), Dotsikas (2002) e demais pesquisadores afirmam que a CDs interagem com as proteínas principalmente através do lado hidrofóbico da cadeia. No caso da insulina, de interesse neste trabalho, a interação ocorreria com os resíduos de aminoácidos aromáticos, principalmente, tirosina e fenilalanina.

Com essa perspectiva, a Espectroscopia Raman apresenta-se como uma ferramenta valiosa para se avaliar interações envolvendo CDs e proteínas. Isto porque, como mostrado na Figura 5.1, os modos vibracionais associados aos resíduos dos aminoácidos aromáticos são ativos no Raman e aparecem em mais de uma frequência característica.

O pico Raman bem definido em  $1003\text{ cm}^{-1}$  (Figura 5.1.) é atribuído ao modo “breath” do anel da fenilalanina. Na Figura 5.7 pode-se avaliar como a adição da HP $\beta$ CD interfere nessa vibração. Pode-se observar que para a mistura física a banda aparece centrada com a da insulina pura sem qualquer modificação. Já para o complexo há um aumento significativo em sua área e um deslocamento na posição do pico com relação à mesma banda para a insulina pura, sugerindo que alguma interação possa ter ocorrido nessa região da molécula. É possível observar ainda que há um deslocamento para um menor número de onda, tal resultado pode ser indicativo de um aumento da massa efetiva devido ao encapsulamento do anel pela CD. Consequentemente, pelo aumento da massa efetiva ( $\bar{\mu}$ ) há uma diminuição no número de onda respectivo a frequência vibracional deste grupo de átomos, observando no espectro, portanto, um deslocamento no pico oriundo de tal vibração modificada. Este comportamento pode ser observado também para outras regiões do espectro e se explicam de forma análoga ao explanado acima.

Outras bandas associadas aos aminoácidos aromáticos são observadas no espectro Raman da insulina. Na Figura 5.8 são apresentados os espectros da insulina e do complexo, que exibem bandas referentes à vibração dos anéis aromáticos da fenilalanina e tirosina, na região entre  $1570$  e  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Na Figura 5.9 são mostradas as áreas dessas bandas em função da posição central do pico. Pode-se verificar que há uma variação das áreas entre as bandas observadas após a complexação. A banda em  $1587\text{ cm}^{-1}$ , referente ao anel da fenilalanina, apresenta ainda um comportamento de deslocamento em relação

à amostra pura. Este resultado mostra como no caso anterior que a CD possa ter interagido com esse aminoácido, concordando com os dados previstos na literatura. Os espectros da HPβCD não apresentam bandas nessa região do espectro, e a mistura simples apresenta bandas com intensidade do sinal muito baixa, por este motivo, foram comparados apenas os espectros do complexo e insulina.

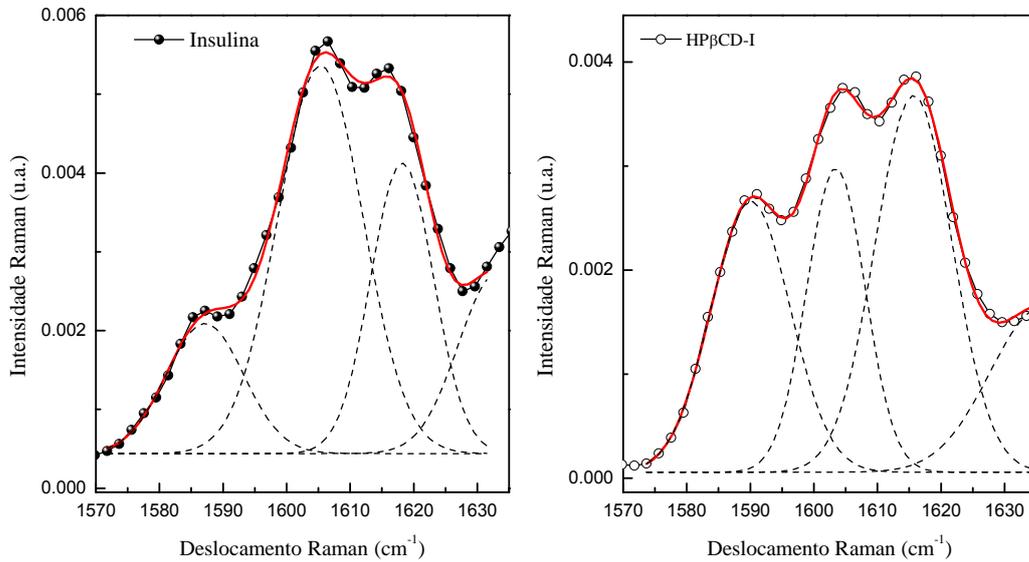


Figura 5.8 –Espectro Raman das amostras de insulina, HPβCD, complexo HPβCD-insulina e mistura simples para o intervalo entre 1570 e 1635  $\text{cm}^{-1}$ .

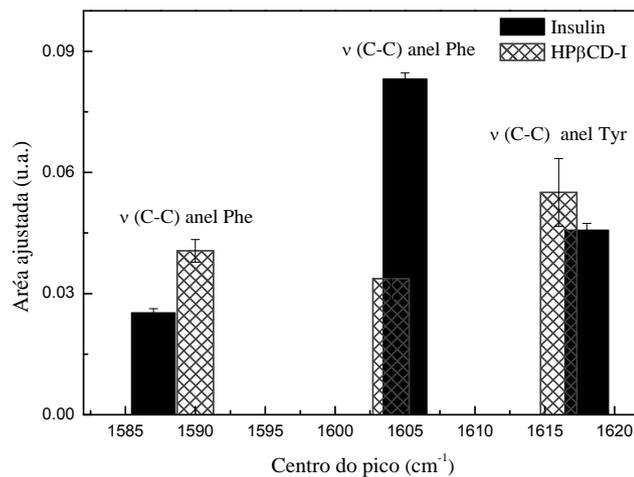


Figura 5.9 –Comparação das áreas ajustadas por deconvolução gaussiana para insulina e complexo para a região espectral entre 1582 e 1622 $\text{cm}^{-1}$ .

Trabalhos anteriores avaliaram a interação das CDs com os aminoácidos <sup>[39][81]</sup>. Linde e seus colaboradores (2010) mostraram como ocorre a interação entre a  $\beta$ -CD e seis diferentes aminoácidos, entre eles a fenilalanina e a tirosina. Eles reportam ainda quais partes da molécula de cada aminoácido é mais afetada pela formação do complexo de inclusão. Em ambos os casos os anéis seriam as partes que mais interagem com a CD devido à sua inserção na cavidade hidrofóbica do hospedeiro. Eles propuseram inclusive um esquema representativo do complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e fenilalanina, com o anel da molécula sendo encapsulado na cavidade. Irie e colaboradores (1999) também trazem uma proposta de formação de complexo de inclusão entre a DM- $\beta$ -CD (dimetil- $\beta$ -ciclodextrina) com resíduos de tirosina. Assim como o reportado por Linde (2010) em seu trabalho o anel da tirosina é parte da molécula que fica aprisionada na cavidade da CD. Essas representações propostas pelos autores estão mostradas na Figura 5.10.

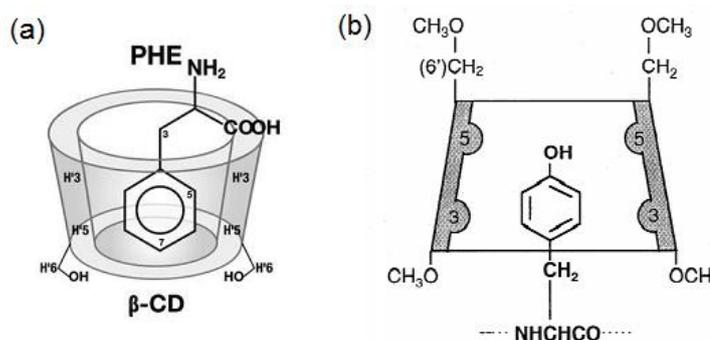


Figura 5.10 –Representação esquemática da formação dos complexos de inclusão: (a) entre a  $\beta$ -CD e a fenilalanina,<sup>[81]</sup> (b) entre a DM-  $\beta$ -CD e o resíduo de tirosina,<sup>[39]</sup>.

Com as informações obtidas da literatura podemos constatar que os resultados alcançados com a Espectroscopia Raman, para a região dos aminoácidos aromáticos, apresentam concordância com outras pesquisas já realizadas utilizando outras técnicas de detecção, como Ressonância Magnética Nuclear e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). A técnica foi capaz, não somente, de indicar que esses aminoácidos possam ter interagido com a HP $\beta$ CD, mas também de sugerir em que parte específica isto acontece. O que valida, portanto, a utilização desta técnica como uma nova ferramenta para o estudo e caracterização de complexos de inclusão envolvendo principalmente CDs e proteínas.

As interações que ocorrem entre as CDs e as proteínas, por meio da inclusão dos aminoácidos hidrofóbicos em sua cavidade, podem modificar a estrutura tridimensional

ou a associação intermolecular entre as proteínas. Como resultado, suas propriedades químicas e biológicas podem ser alteradas <sup>[39][40]</sup>. Rosa e colaboradores (2005) mostraram a partir de análises de FTIR da região da amida I, que a complexação insulina/HP $\beta$ CD modifica a estrutura secundária da insulina, cujo complexo foi inserido em microesferas poliméricas. A amida I também é ativa no Raman, assim analisamos essa região com o intuito de observar se após a complexação alguma mudança na estrutura secundária da proteína era notada da mesma forma como descrito por Rosa (2005).

O espectro da região da amida I também foi tratado utilizando funções gaussianas, cujas áreas foram usadas para identificar as várias conformações da amida que contribuem para a concentração total da amida I. Na

Figura 5.11 estão apresentadas duas áreas de gaussianas referentes às espécies distintas da amida I. A banda em 1658  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à estrutura  $\alpha$ -hélice e em 1676  $\text{cm}^{-1}$  à estrutura  $\beta$ . Pode-se observar que após a adição da HP $\beta$ CD há um aumento da banda em 1676  $\text{cm}^{-1}$  em relação à banda em 1658  $\text{cm}^{-1}$ . Estudo anterior realizado por Rosa <sup>[53]</sup> mostrou resultado semelhante, verificando que após a complexação há um aumento da estrutura  $\beta$  em relação à estrutura  $\alpha$ -hélice. Segundo o autor o resultado indica que a ciclodextrina pode interagir com resíduos da insulina adotando uma conformação da cadeia  $\beta$  estendida, alterando portanto a estrutura secundária da proteína. Segundo ele este resultado concorda com dados prévios de RMN.

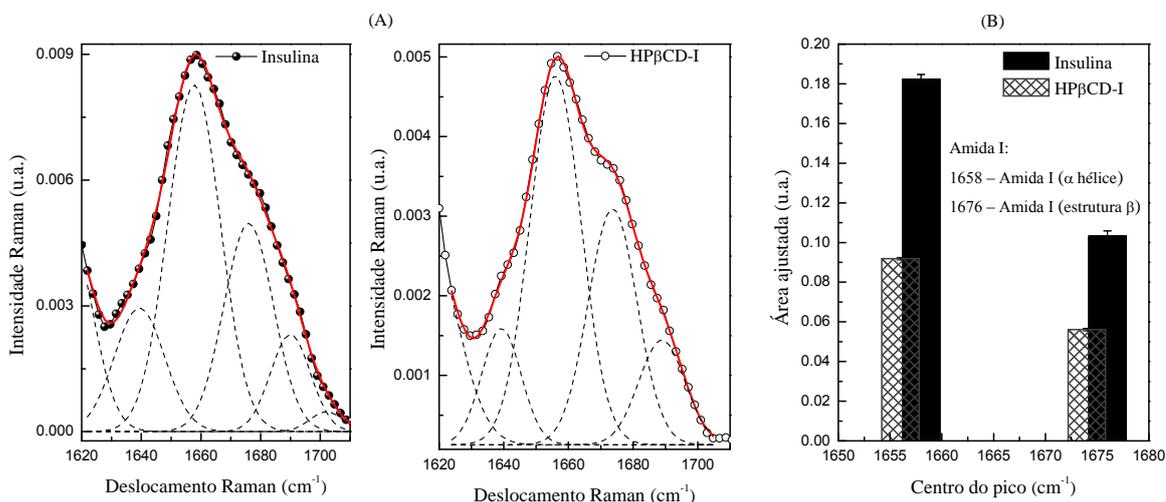


Figura 5.11 –(A) Espectros Raman para a insulina e complexo e (B) comparação das áreas ajustadas por deconvolução gaussiana para insulina e complexo para a região espectral entre 1620 e 1700 $\text{cm}^{-1}$ .

Embora os resultados indiquem uma modificação em uma das estruturas da Amida I, e, portanto, da estrutura secundária da proteína, é importante mencionar que sua

função biológica pareceu não ser afetada. Isto pode ser constatado no estudo clínico desenvolvido pela Sóstenes Rosa Valentini, que será apresentado a diante, em que o complexo foi utilizado no processo de cicatrização de úlceras por pressão. A insulina complexada não afetou os índices de glicemia dos pacientes e ajudou no processo de cicatrização das lesões, indicando que a proteína ainda desenvolvia sua função pretendida no estudo, mesmo podendo ter sido alterada sua estrutura da amida I.

### 5.1.1 FTIR

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada a fim de comparar e complementar os resultados encontrados no Raman. No entanto, as bandas da insulina, referentes principalmente às vibrações dos aminoácidos hidrofóbicos, que apresentaram modificações no Raman, não são ativas no infravermelho. Apesar disto, a técnica evidenciou modificações na banda da ciclodextrina, atribuída ao enlace glicosídico, confirmando o observado pelo Raman. A Figura 5.12 mostra os espectros de absorção no infravermelho, para as amostras da insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples e complexo para o intervalo entre 900 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

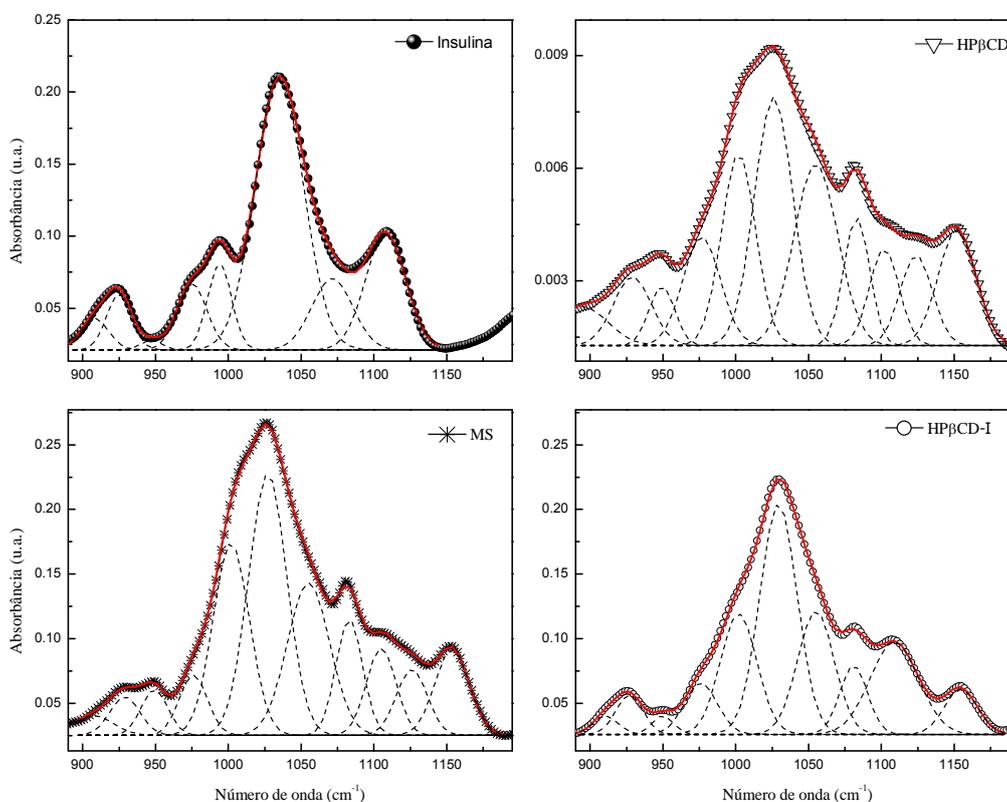


Figura 5.12 –Espectros FTIR para as amostras de insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples e complexo (HP $\beta$ CD-I), para o intervalo entre aproximadamente 900 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

A Figura 5.13 mostra as áreas das gaussianas referentes às bandas observadas para os modos vibracionais permitidos no infravermelho no intervalo de 920 a 955  $\text{cm}^{-1}$ . Nota-se que a banda em 949  $\text{cm}^{-1}$ , associada ao estiramento C-O-C da HP $\beta$ CD, após a complexação, apresenta uma diminuição significativa em sua área com relação à banda em 928  $\text{cm}^{-1}$ . No caso da mistura simples vê-se que a proporção entre as duas bandas se mantém, da mesma forma que na HP $\beta$ CD, mostrada em detalhe na Figura 5.13. Este resultado concorda com o observado na Figura 5.7 obtida com a espectroscopia Raman, convalidando os dados obtidos. A justificativa apresentada neste caso é análoga a que foi discutida para os dados Raman.

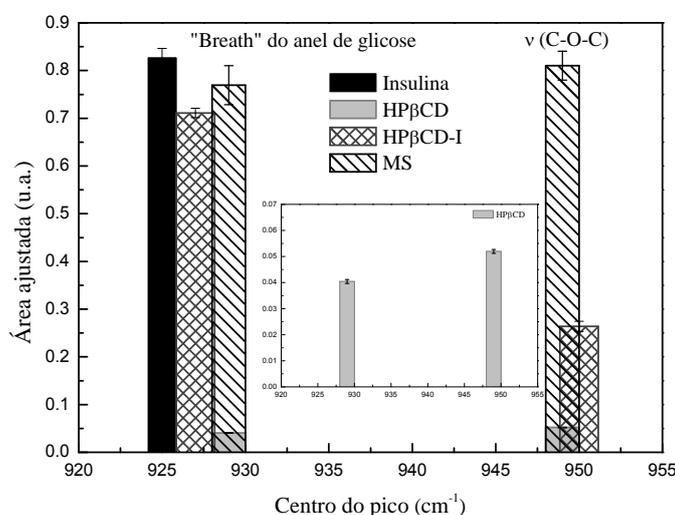


Figura 5.13 – Comparação das áreas ajustadas por deconvolução gaussiana para insulina, HP $\beta$ CD, complexo HP $\beta$ CD-I e mistura simples para a região espectral entre 920 e 955  $\text{cm}^{-1}$ .

## 5.1.2 $^1\text{H}$ RMN

A ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$ RMN foi empregada para avaliar a interação entre a insulina e a HP $\beta$ CD visando identificar a ocorrência de complexação e assim validar os resultados obtidos com as espectroscopias Raman e FTIR.

A Figura 5. 14 mostra os espectros RMN da região aromática da insulina na presença e na ausência da HP $\beta$ CD. A inclusão do lado hidrofóbico da cadeia na cavidade da HP $\beta$ CD pode levar a deslocamentos nas linhas dos espectros. A Tabela 5. 1 mostra que houve deslocamentos com a adição da CD em relação à insulina pura, confirmando a interação entre as duas moléculas. A tabela evidencia que a presença da CD provocou

deslocamentos químicos nos prótons da tirosina, fenilalanina e da histidina. Este resultado concorda com trabalhos anteriores<sup>[32][41]</sup> que também mostram que a presença da CD provoca deslocamentos químicos na região aromática (6.2 -7.0 ppm) da insulina, além dos prótons C2 das histidinas B5 e B10. Além disso, é possível verificar que o sinal dos prótons dos resíduos foi deslocado para campos magnéticos menores (valores negativos de  $\Delta\delta$ ).

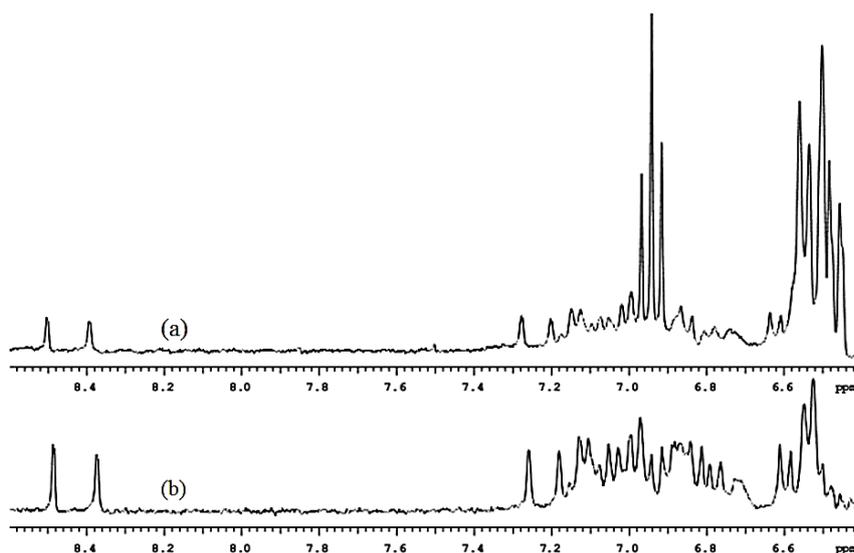


Figura 5. 14 - Espectro  $^1\text{H}$ RMN da região aromática da insulina: (a) na presença da HP $\beta$ CD (b) e insulina sozinha, em  $\text{D}_2\text{O}$  contendo 30%  $\text{CD}_3\text{COOD}$  at  $25^\circ\text{C}$ .

Tabela 5. 1 - Efeitos da HP $\beta$ CD nos deslocamentos químicos do  $^1\text{H}$  NMR da insulina em 30% de ácido acético deuterado a  $25^\circ\text{C}$ .

Número	Lado da cadeia	Posição	Deslocamento químico Insulina ( $\delta_i$ )	Deslocamento químico Insulina com HP $\beta$ CD ( $\delta_c$ )	$\Delta\delta = \delta_i - \delta_c$
1	Histidina (B 10)	C2	8.487	8.503	-0.016
2	Histidina (B 5)	C2	8.374	8.394	-0.020
3	Histidina (B 10)	C4	7.260	7.277	-0.017
4	Histidina (B 5)	C4	7.181	7.202	-0.021
5	Tirosina (A 19)	C2 e 6	7.130	7.149	-0.019
6	Fenilalanina (B 1)	C4	7.106	7.125	-0.019
			7.708	7.097	-0.019
			7.053	7.073	-0.020
7	Fenilalanina (B 24)	C3 e 5	7.029	7.053	-0.024
			6.842	6.866	-0.024
			6.813	6.837	-0.024
8	Tirosina (B 16)	C2 e 6	6.813	6.837	-0.024
9	Tirosina (A 14)	C2 e 6	6.793	6.807	-0.014
10	Tirosina (B 26)	C2 e 6	6.764	6.778	-0.014
			6.727	6.739	-0.012
11	Tirosina (A 14)	C3 e 5	6.612	6.636	-0.024
			6.583	6.608	-0.025

A análise de RMN concorda com o que foi observado com a espectroscopia Raman, em que os resultados também apontaram que a interação ocorre nesta região da proteína. Assim verificamos que a espectroscopia Raman pode ser utilizada como técnica de confirmação de formação de complexo de inclusão, permitindo estudo detalhado da interação presente entre os componentes envolvidos. Além disso, a técnica não necessita de preparação específica envolvendo solventes especiais para a realização do experimento, facilitando assim a concretização do estudo.

### 5.1.3 Estudo Clínico

Como mencionado anteriormente este projeto foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Enzimática da Universidade Estadual de Maringá. A doutoranda Sóstenes Rosa Valentini realizou um estudo clínico com os adesivos não adesivos a base de insulina e complexo HP $\beta$ CD-I. O estudo clínico teve como objetivo verificar se o complexo de inclusão poderia melhorar a eficiência no processo de tratamento de feridas de pressão, já que são difíceis de serem tratadas com os medicamentos existentes. A expectativa era de que a inclusão em ciclodextrinas poderia manter a formulação por mais tempo sobre a ferida evitando que a insulina pudesse provocar mudanças na glicemia dos pacientes. O estudo foi realizado no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM) em pacientes hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva. Este estudo faz parte da tese de doutorado da referida doutoranda e foi publicado em formato de artigo. Maiores detalhes a respeito encontra-se em sua respectiva referência <sup>[74]</sup>.

Os voluntários foram divididos em três grupos A, B e C, sendo cada grupo formado por  $n = 5$ . O grupo A foi tratado com o curativo não adesivo com complexo HP $\beta$ CD-I, o grupo B com o curativo não adesivo com insulina e o grupo C com o curativo não adesivo controle. Além da observação das lesões, também foi realizada a dosagem da glicemia de todos os pacientes. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) n° 035/2012 e pela Comissão de Regulamentação de Atividades Acadêmicas e Serviços Voluntários (COREA) do HUM n° 072/2013. O protocolo aprovado encontra-se nos ANEXOS do trabalho.

Como resultado Valentini verificou que não houve diferença significativa entre as dosagens realizadas para a glicemia em quase todos os pacientes analisados. Na avaliação do perfil de eficácia dos curativos não adesivos, Valentini observou que o uso do

curativo não adesivo com complexo HP $\beta$ CD-I mostrou uma menor média entre as medidas, e sua variabilidade foi menor comparada com o curativo não adesivo com insulina e curativo não adesivo controle, conforme demonstrado na Figura 5.15.

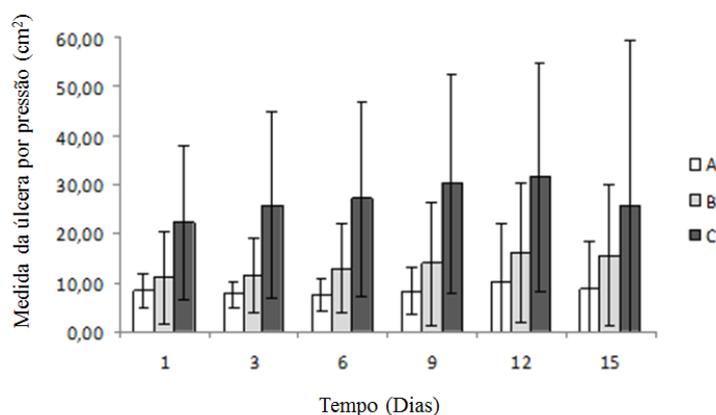


Figura 5.15 -Médias e variabilidade das medidas das úlceras por pressão em função do tempo para os pacientes do grupo A tratado com o curativo não adesivo com complexo HP $\beta$ CD-I, o grupo B tratado com o curativo não adesivo com insulina e o grupo C tratado com o curativo não adesivo controle<sup>[74]</sup>.

Na Figura 5.16 é possível observar fotos da evolução do tratamento realizado com os curativos não adesivos. Estes dados permitiram sugerir que a insulina complexada com HP $\beta$ CD promoveu melhor cicatrização da lesão. É possível observar ainda que as cores das feridas tratadas com o complexo contendo insulina apresentaram tonalidade para o rosa, indicando que a presença da insulina minimizou a presença de hemoglobina oxidada na ferida, fator este que contribui para aumentar a eficiência do processo de cicatrização<sup>[77]</sup>.

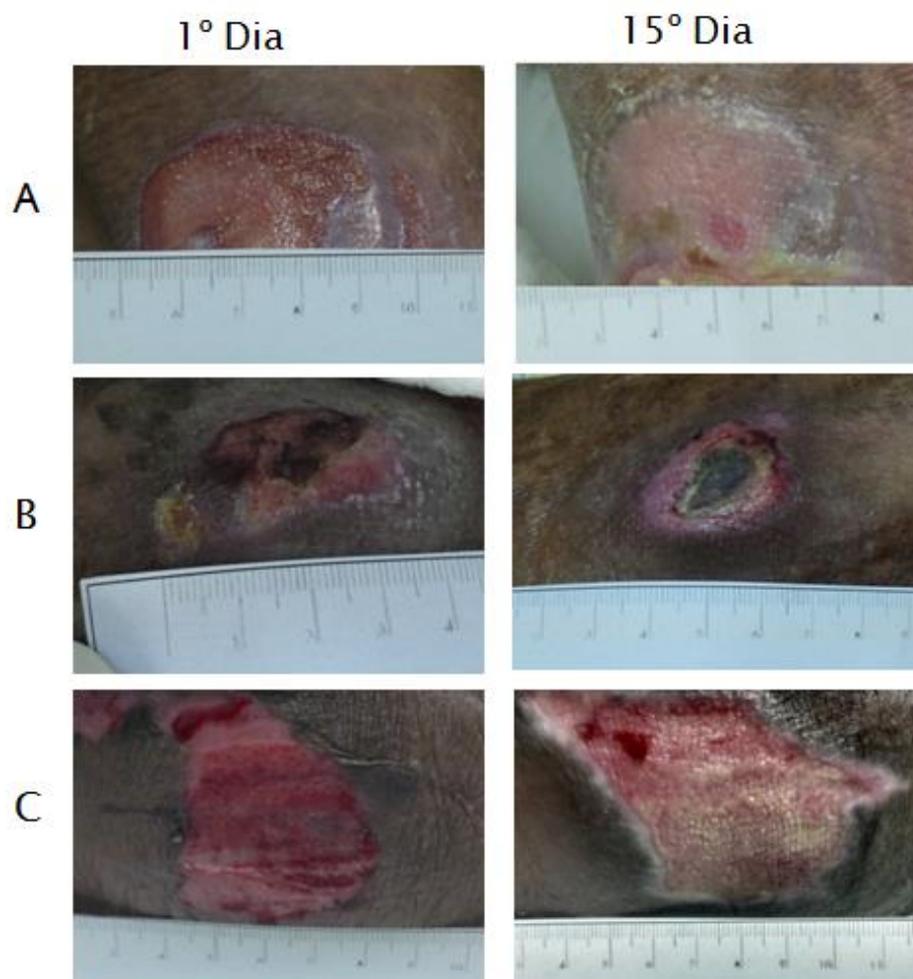


Figura 5.16 - Fotos da evolução do tratamento realizado com os géis (curativos não adesivos). (A) Pacientes tratados com o gel com complexo HP $\beta$ CD-I, (B) pacientes tratados com o gel com insulina, e pacientes tratados com o gel controle <sup>[74]</sup>.

## 5.2 Parte II - Complexos de inclusão entre $\beta$ -ciclodextrina e curcumina

### 5.2.1 FTIR

A Figura 5.17 mostra os espectros de absorção por FTIR das amostras de curcumina,  $\beta$ -ciclodextrina, mistura simples da curcumina com  $\beta$  ciclodextrina e complexo (curcumina- $\beta$ -ciclodextrina) preparadas por processo de co-precipitação. As atribuições dos picos de FTIR da curcumina são mostradas na Tabela 5. 2.

No espectro da curcumina não houve bandas na região de maior importância para a carbonila ( $1800-1650\text{ cm}^{-1}$ ), que caracterizaria a existência da molécula na forma cetônica. Isto indica, portanto, que a curcumina se apresenta preferencialmente na forma ceto-enol<sup>[75]</sup>.

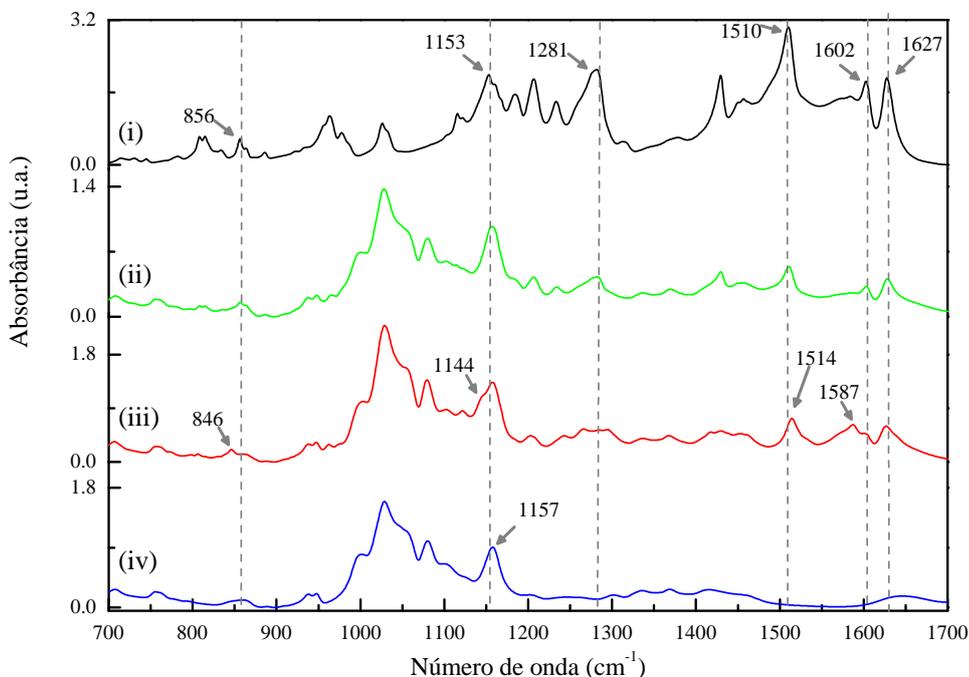


Figura 5. 17 – Espectros FTIR: (i) curcumina, (ii) mistura simples da curcumina com  $\beta$  ciclodextrina na razão molar 1:2, (iii) complexo curcumina-  $\beta$  ciclodextrina por co-precipitação 1:2, (iv)  $\beta$  ciclodextrina.

Tabela 5. 2 – Atribuições das vibrações no infravermelho da curcumina<sup>[75][82]</sup>.

Posição do pico FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modos vibracionais atribuídos
1627	$\nu$ ( $\text{C}_{\text{anel}}-\text{C}=\text{C}$ ); $\nu$ ( $\text{C}=\text{O}$ )
1603	$\nu$ ( $\text{C}=\text{C}$ ) no anel aromático
1587	$\nu$ ( $\text{CC}$ )* no anel aromático
1510	$\nu$ ( $\text{C}=\text{O}$ ); $\delta$ ( $\text{CCC}$ ); $\delta$ ( $\text{CC}=\text{O}$ )
1282	$\delta$ ( $\text{C}=\text{CH}$ ); $\delta$ ( $\text{CCH}$ )* no anel aromático
1261	$\delta$ ( $\text{CCH}$ )* no anel aromático; $\delta$ ( $\text{COH}$ )*
1232	$\delta$ ( $\text{COH}$ )*; $\delta$ ( $\text{COH}$ )**; ( $\delta$ ( $\text{COH}$ ) enol;
1207	$\delta$ ( $\text{CCH}$ )* no anel aromático; $\delta$ ( $\text{CCH}$ ) esqueleto; $\delta$ ( $\text{CH}_3$ )
1185	$\delta$ ( $\text{CH}_3$ )**; $\delta$ ( $\text{CCH}$ )
886	$\gamma$ ( $\text{CCH}$ )* no anel aromático
864	$\gamma$ ( $\text{CCH}$ ) esqueleto
857	$\gamma$ ( $\text{CCH}$ ) no anel aromático; $\gamma$ ( $\text{CCH}$ ) esqueleto
835	$\gamma$ ( $\text{CCH}$ )* no anel aromático, $\gamma$ ( $\text{CCH}$ )** no anel aromático
815	$\gamma$ ( $\text{CCH}$ )* no anel aromático
808	$\gamma$ ( $\text{CCH}$ )** no anel aromático

Modos vibracionais:  $\nu$ , estiramento;  $\delta$ , flexão, no plano;  $\gamma$ , flexão fora do plano.

Legenda: \* Vibração conectada com a parte enol da molécula (esquerda)

\*\* Vibração conectada com a parte ceto da molécula (direita).

O espectro da mistura simples exibiu picos que correspondem a ambos os componentes que se encontram presentes. No espectro do complexo curcumina- $\beta$ -CD por co-precipitação, boas evidências da formação do complexo foram obtidas. As linhas em tracejado indicam algumas das regiões do espectro que exibem modificações nas bandas da curcumina, causadas por possíveis interações entre ela e a ciclodextrina. Para analisar cada um destes registros de complexação, os espectros das amostras foram deconvoluídos a partir de funções gaussianas. Isto possibilita atribuir a cada banda presente no espectro sua vibração molecular correspondente e conseqüentemente, monitorar quais as ligações químicas da molécula que sofrem modificações induzidas pela complexação. Apresentaremos a seguir os espectros das amostras já deconvoluídos para as regiões indicadoras da interação entre a curcumina e a ciclodextrina.

Na Figura 5.18 (a) estão apresentados os espectros FTIR para as amostras de curcumina,  $\beta$  ciclodextrina, mistura simples e complexo no intervalo entre aproximadamente 1500 e 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Na Figura 5.18 (b), (c) e (d), estão apresentados os espectros deconvoluídos da curcumina, mistura simples e complexo, respectivamente.

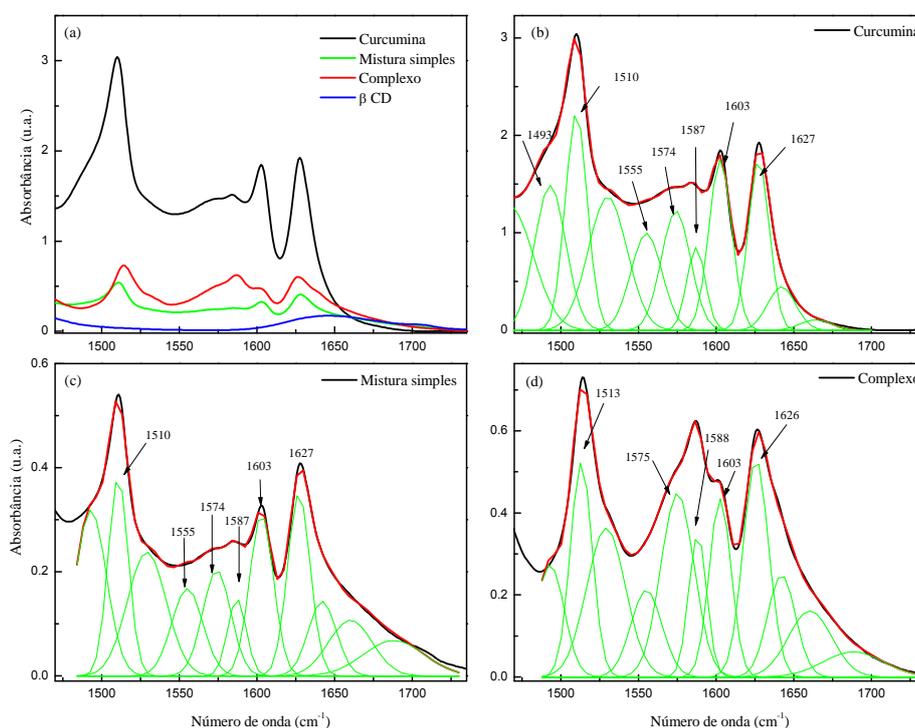


Figura 5. 18 – (a) Espectros FTIR das amostras de curcumina, mistura simples, complexo por co-precipitação e  $\beta$ -ciclodextrina para o intervalo espectral entre 1500 e 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Deconvolução do espectro: (b) de curcumina, (c) mistura simples e (d) complexo por co-precipitação. Em (b), (c) e (d) a linha em preto corresponde ao dado experimental e a em vermelho o ajuste matemático obtido da deconvolução pelas curvas gaussianas (em verde). Essa legenda será empregada às demais regiões do espectro em que empregamos o método de deconvolução gaussiana.

Pode-se observar na Figura 5.18 que a mistura simples apresenta um espectro similar ao da curcumina, uma vez que não há absorção da ciclodextrina neste intervalo. O complexo por sua vez apresenta modificações em algumas bandas e, portanto, pode sugerir sua formação. Esta região é considerada um importante indicador de evidência da complexação entre as moléculas porque pode apresentar picos associados às vibrações dos anéis aromáticos da curcumina, grupo este, que segundo a literatura, é encapsulado pela cavidade da CD caso ocorra a formação do complexo<sup>[75]</sup>. Além disso, o fato da ciclodextrina não apresentar bandas de absorção nesta região, facilita a observação de alterações que possam ocorrer nos picos da curcumina sem a influência de sobreposições das bandas da CD.

Neste sentido, pode-se observar que a banda mais intensa no FTIR para a curcumina, em  $1510\text{ cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de estiramento do grupo C=O, e flexão dos grupos, (CCC) e (CC=O), no espectro do complexo se desloca para a posição em  $1513\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que para a mistura simples permanece inalterada. Ainda no mesmo intervalo, pode-se notar que as bandas em  $1588$ ,  $1603$  e  $1627\text{ cm}^{-1}$  também apresentam mudanças no espectro do complexo. A banda em  $1603\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento do grupo C=C dos anéis aromáticos parece ter sua vibração desfavorecida em relação às bandas de  $1588$  e  $1627\text{ cm}^{-1}$ . Este resultado pode ser melhor visualizado na Figura 5.19, em que foram mostradas as áreas das bandas mencionadas em função de suas posições. O efeito de diminuição na banda correspondente à vibração do anel aromático da curcumina, na amostra do complexo, pode ser uma consequência do encapsulamento desta região da molécula pela cavidade da CD, restringindo assim, o movimento dos átomos do anel.

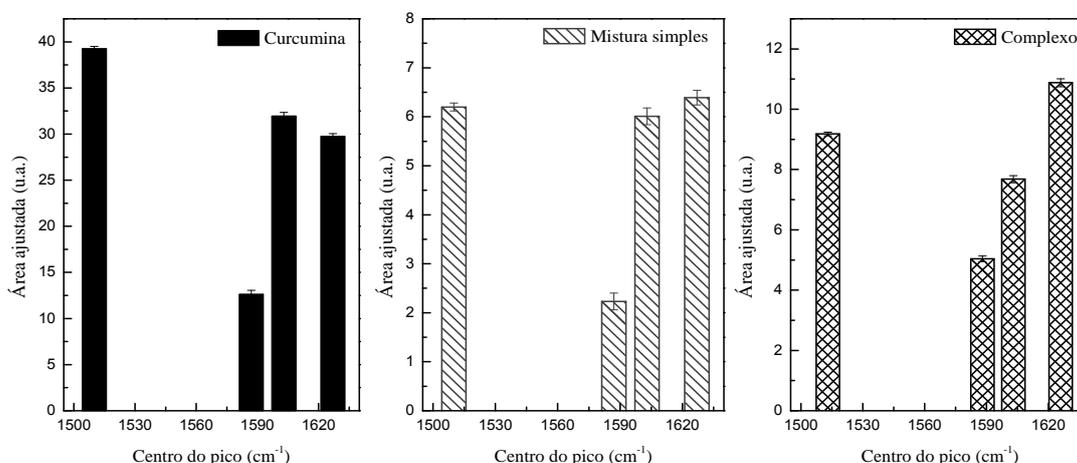


Figura 5.19 – Comparação entre as áreas das bandas ajustadas por deconvolução gaussiana para curcumina, mistura simples e complexo, para a região espectral entre  $1500$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ .

Outra região espectral que pode-se observar evidências da formação do complexo entre a curcumina e a  $\beta$ -CD, esta no intervalo entre  $1130$  e  $1330\text{ cm}^{-1}$ . Na Figura 5.20 são mostrados os espectros deconvoluídos das amostras para esta respectiva região.

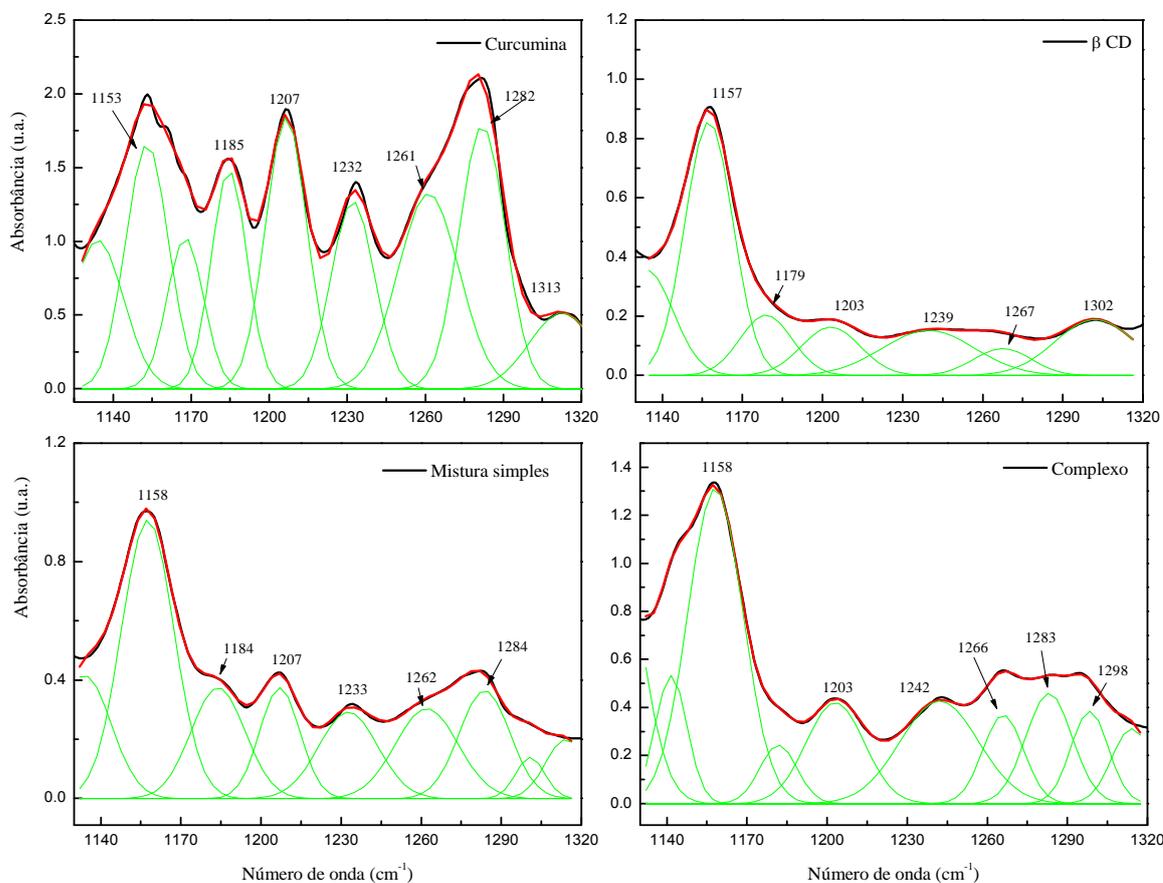


Figura 5.20 - Deconvolução do espectro FTIR da curcumina,  $\beta$  ciclodextrina, mistura simples e o complexo por co-precipitação para a região espectral entre  $1130$  e  $1330\text{ cm}^{-1}$ .

Na Figura 5.20 podemos observar que a ciclodextrina também apresenta absorção na região apresentada, e, portanto também contribui para os espectros da mistura física e complexo. Como esperado, o espectro da mistura física representa a soma entre os espectros da curcumina e da  $\beta$ -CD. Já o complexo não segue o mesmo comportamento. Em seu espectro, Figura 5.20, podemos observar que a banda em  $1203\text{ cm}^{-1}$  da curcumina está deslocada  $4\text{ cm}^{-1}$  em relação a sua posição no espectro da amostra pura. Este resultado indica que a complexação modifica essa ligação, cuja vibração corresponde ao movimento de flexão, no plano, do grupo CCH do anel aromático. Além disso, as bandas entre  $1255$  e  $1305\text{ cm}^{-1}$ , no espectro do complexo, apresentam um comportamento diferente ao exibido pela mistura simples. Essas bandas também podem ser atribuídas às vibrações do anel aromático da curcumina, como mostrado na Tabela 5. 2. A banda

em  $1262\text{ cm}^{-1}$  da curcumina, que em seu espectro aparece como um “ombro”, mais larga, se mantém na mesma posição e mesma forma para a mistura física. No espectro do complexo, no entanto, esta banda aparece como um pico, com maior definição, mais estreita e deslocada  $5\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1283\text{ cm}^{-1}$ , ao contrário, para a curcumina e mistura física se apresenta como um pico definido, na amostra do complexo, se torna uma banda larga, sem definição clara da sua posição. As áreas das bandas em função da posição foram mostradas na Figura 5.21. Pode-se visualizar a diferença entre as proporções das áreas na amostra do complexo, em relação à proporção apresentada pela mistura simples, principalmente quando comparamos a banda em  $1262$  com a em  $1283\text{ cm}^{-1}$ , para ambas as amostras.

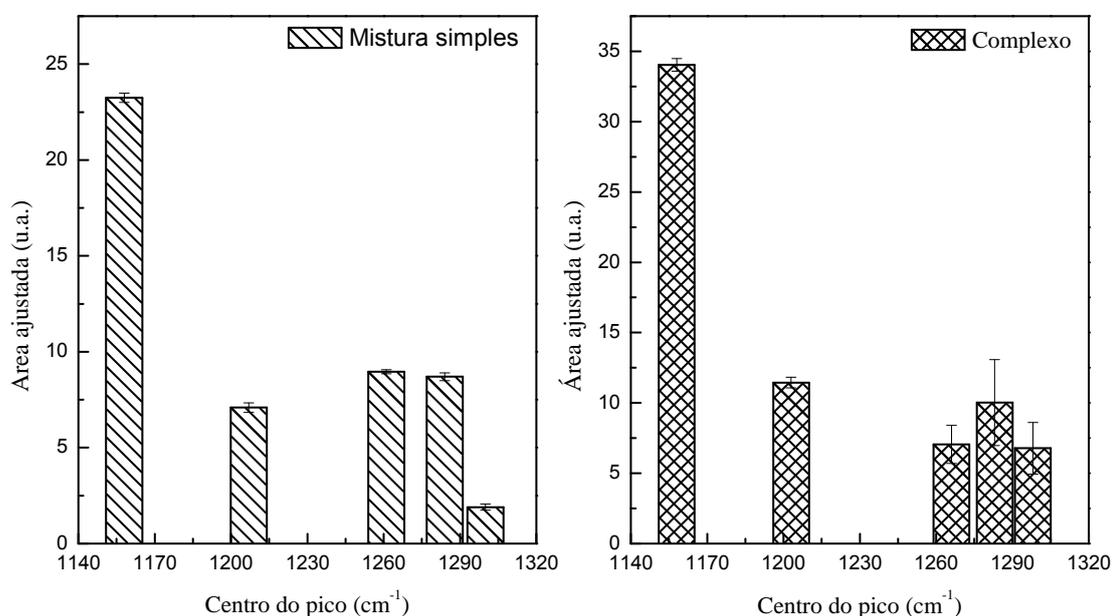


Figura 5.21 – Comparação entre as áreas das bandas ajustadas por deconvolução gaussiana para mistura simples e complexo, para a região espectral entre  $1140$  e  $1320\text{cm}^{-1}$ .

A Figura 5. 22 mostra os espectros da curcumina,  $\beta$ -CD, mistura simples e complexo, deconvoluídos para o intervalo entre  $790$  a  $890\text{ cm}^{-1}$ . Podemos observar que nesta região a ciclodextrina também apresenta bandas de absorção. Assim, os espectros da mistura e complexo possuem contribuição de ambos os materiais. O espectro da mistura simples representa uma soma entre os espectros das amostras precursoras. O espectro do complexo por sua vez vem acompanhado de modificações de algumas das principais bandas da curcumina.

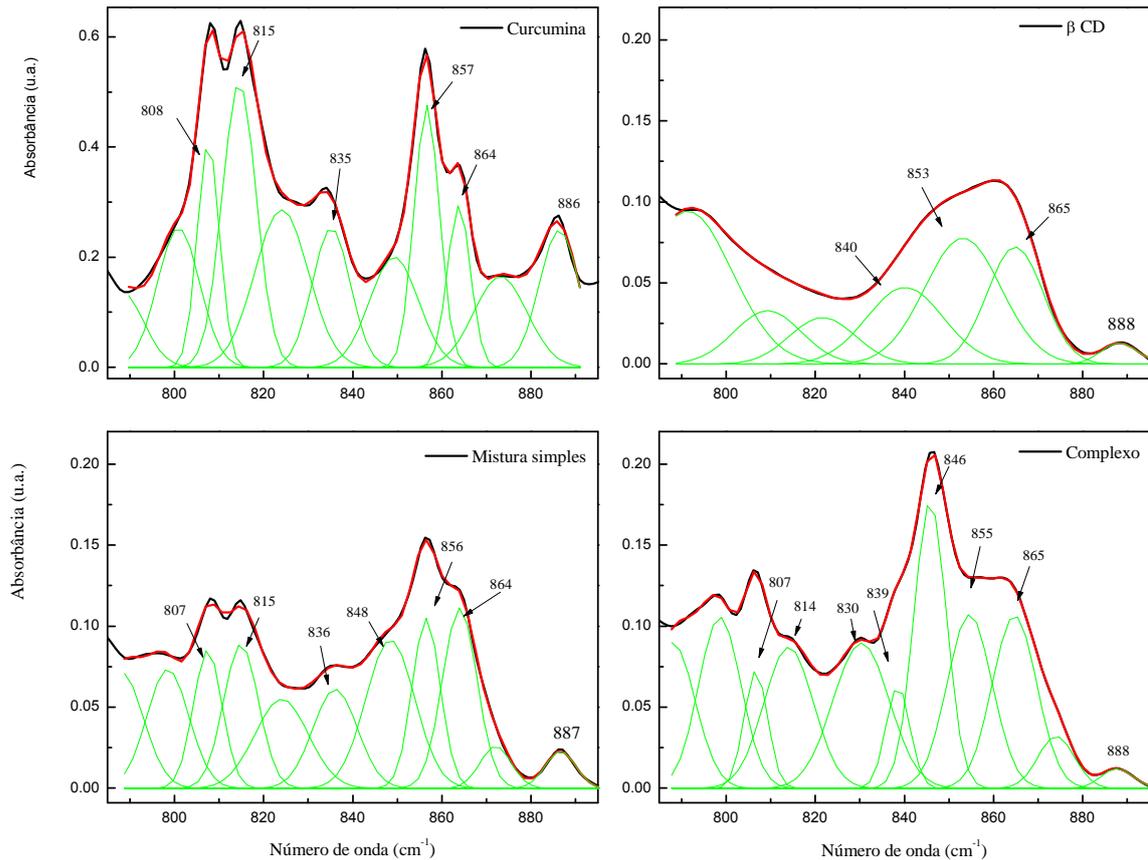


Figura 5.22 –Deconvolução do espectro FTIR da curcumina, β ciclodextrina, mistura simples e complexo por co-precipitação para a região espectral entre 790 e 890  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro da curcumina e mistura física podemos observar dois picos estreitos e bem definidos em 808 e 815  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro do complexo a banda em 814  $\text{cm}^{-1}$  diminui sua intensidade em relação a 807  $\text{cm}^{-1}$  e se apresenta como um “ombro” no espectro com um alargamento na banda. Essas bandas também correspondem aos anéis aromáticos da curcumina e correspondem à vibração de flexão, fora do plano, de ambos os anéis.

No espectro do complexo é possível observar que as bandas na região entre 830 e 870  $\text{cm}^{-1}$  foram deslocadas para números de ondas menores, quando comparadas as suas posições nos espectros da curcumina e mistura física. Esta região do espectro corresponde às diferentes modos vibracionais de flexão, fora o plano, do CCH dos anéis e o do esqueleto da molécula. Como exemplo, podemos constatar que a banda em 857  $\text{cm}^{-1}$  para a curcumina, é encontrada na mesma posição para a mistura simples. Já no espectro do complexo ela se encontra em 846  $\text{cm}^{-1}$ , portanto, deslocada 11  $\text{cm}^{-1}$  da sua posição normal. Para este intervalo espectral, foram representadas na Figura 5.23 as áreas das bandas ajustadas pelas curvas gaussianas em função de suas posições. Pode-se observar

a presença de uma banda extra para o complexo, na posição em  $855\text{ cm}^{-1}$ , ausente no espectro da mistura. Esta banda pode ser a contribuição do espectro da ciclodextrina, cuja banda aparece centrada em  $853\text{ cm}^{-1}$ . É possível também acompanhar a posição dos picos da curcumina na amostra do complexo, deslocados devido sua possível interação com a ciclodextrina.

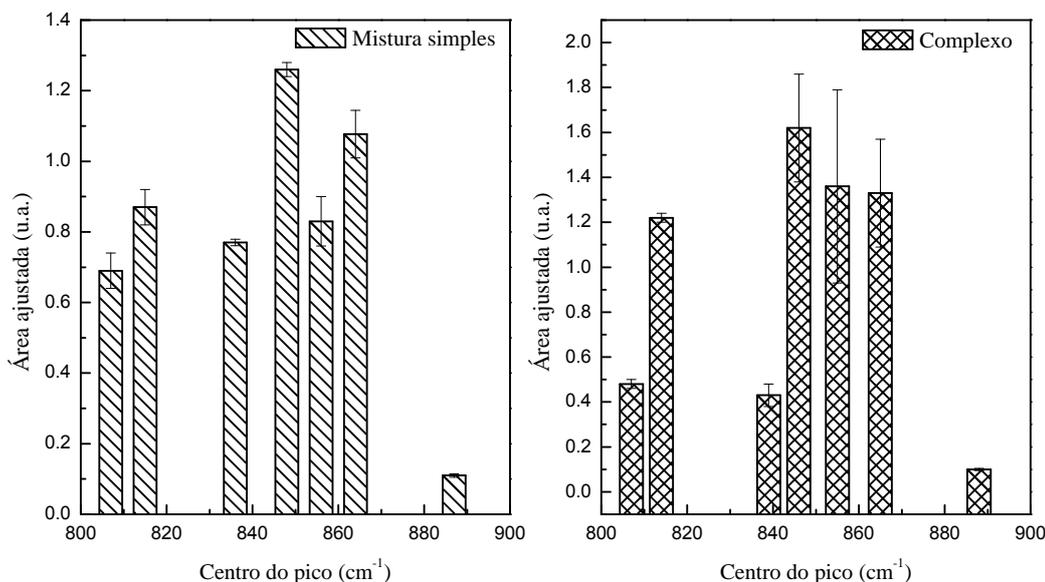


Figura 5.23 – Comparação entre as áreas das bandas ajustadas por deconvolução gaussiana para mistura simples e complexo, para a região espectral entre  $1140$  e  $1320\text{cm}^{-1}$ .

Dos resultados obtidos com a técnica FTIR podemos verificar que este método apresentou boas evidências da formação de um complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e a curcumina utilizando o método de co-precipitação. As modificações nos espectros do complexo ocorreram nas bandas referentes, principalmente, aos anéis aromáticos da curcumina, sugerindo que as interações possam ter ocorrido devido à entrada de um ou ambos os anéis da curcumina na cavidade de CD. Os resultados deste estudo estão de acordo com os obtidos na literatura. Tang e colaboradores (2002) trabalharam com o complexo entre a curcumina e  $\beta$ -CD e também evidenciaram a formação do complexo pelas modificações nas bandas atribuídas as vibrações dos anéis aromáticos, principalmente em  $1602$  e  $1281\text{ cm}^{-1}$ .

### 5.2.2 FT-Raman

Como dissemos anteriormente, as espectroscopias Raman e FTIR são consideradas técnicas complementares, algumas bandas que são favoráveis aparecem em um dos espectros podem não aparecer no outro. Desta forma, ao obtermos espectros com ambas as técnicas, uma completa varredura é realizada sobre o material em estudo e consequentemente possibilitando melhor e ampla caracterização do mesmo. Nesta perspectiva, utilizamos a técnica FT-Raman para comprovarmos e complementarmos os resultados já obtidos pela técnica FTIR na confirmação da formação do complexo entre a  $\beta$  ciclodextrina e a curcumina e as possíveis modificações estruturais ocorridas no complexo.

Na Figura 5. 24 são mostrados os espectros FT-Raman para as amostras de curcumina,  $\beta$ -ciclodextrina, mistura simples da curcumina com  $\beta$  ciclodextrina e complexo (curcumina- $\beta$ -ciclodextrina) preparados pelo método de co-precipitação. As atribuições aos picos no Raman da curcumina são mostradas na Tabela 5. 3.

Assim como no FTIR, o espectro Raman da mistura simples corresponde à soma dos espectros de ambos os componentes precursores. No espectro do complexo, boas evidências da formação do complexo foram obtidas. As linhas tracejadas na Figura 5. 24 indicam algumas das regiões do espectro que exibem modificações nas bandas da curcumina causadas por possíveis interações entre ela e a ciclodextrina. Para analisar cada um destes indícios de complexação, os espectros das amostras foram deconvoluídos por funções gaussianas, de forma análoga ao realizado para os espectros FTIR.

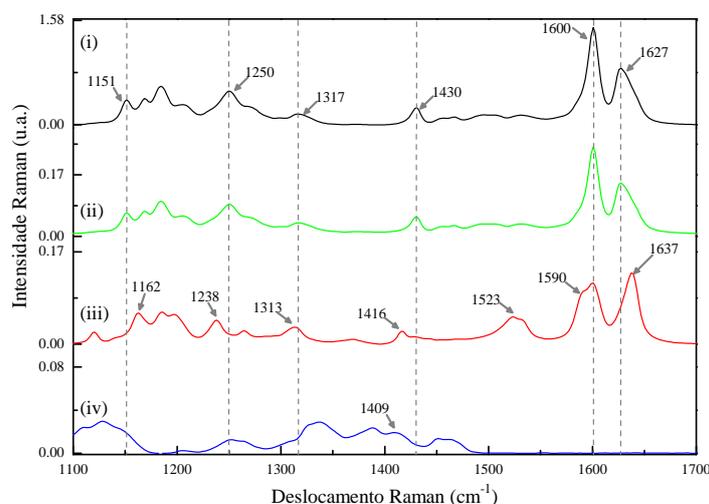


Figura 5. 24 – Espectros Raman: (i) curcumina, (ii) mistura simples da curcumina com  $\beta$  ciclodextrina na razão molar 1:2, (iii) complexo curcumina-  $\beta$  ciclodextrina por co-precipitação 1:2, (iv)  $\beta$  ciclodextrina.

Tabela 5. 3–As atribuições às vibrações no Raman da curcumina de acordo com a literatura.<sup>[75][82].</sup>

Posição do pico Raman (cm <sup>-1</sup> )	Modos vibracionais atribuídos
1627	$\nu$ (C <sub>anel</sub> -(C=C)); $\nu$ (C=O)
1601	$\nu$ (C=C) no anel aromático
1589	$\nu$ (CC)* no anel aromático
1508	$\nu$ (C=O); $\delta$ (CCC); $\delta$ (CC=O)
1494	$\delta$ (CCH)** no anel aromático; $\nu$ (CC)** no anel aromático
1430	$\delta$ (CCC) no anel aromático; $\delta$ (CCH) no anel aromático; $\delta$ (COH)*
1317	$\delta$ (CCH)* no anel aromático; $\delta$ (CCH)
1270	$\delta$ (CCH)** no anel aromático; $\delta$ (CCC)** no anel aromático; $\delta$ (COH)**
1251	$\delta$ (CCH)* no anel aromático; $\delta$ (COH)*
1206	$\delta$ (CCH)* no anel aromático; $\delta$ (CCH) esqueleto; $\delta$ (CH <sub>3</sub> )
1184	$\delta$ (CH <sub>3</sub> )**; $\delta$ (CCH)
1168	$\delta$ (CH <sub>3</sub> )*; $\delta$ (COH)*; $\delta$ (CCH) esqueleto

Modos vibracionais:  $\nu$ , estiramento;  $\delta$ , flexão, no plano;  $\gamma$ , flexão fora do plano.

Legenda: \* Vibração conectada com a parte enol da molécula (parte direita, mostrado na Figura - 2.20) \*\* Vibração conectada com a parte ceto da molécula (parte esquerda, ver Figura - 2.20)

A Figura 5.25 mostra os espectros Raman deconvoluídos para as amostras de curcumina, mistura simples e complexo no intervalo entre aproximadamente 1555 e 1675 cm<sup>-1</sup>.

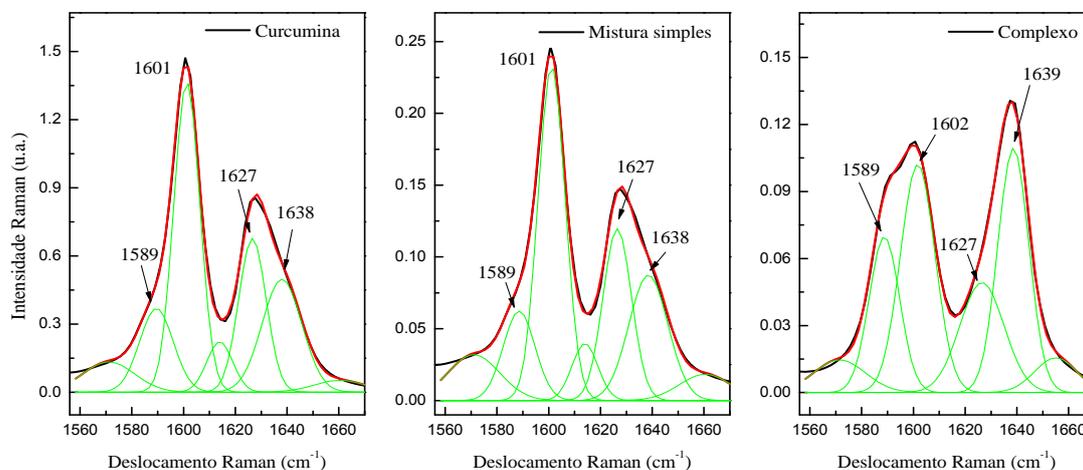


Figura 5.25 –Deconvolução do espectro Raman da curcumina, mistura simples e complexo por coprecipitação para a região espectral entre 1555 e 1675 cm<sup>-1</sup>.

Como mostrado pela Figura 5. 24 a  $\beta$ -CD não apresenta bandas acima de 1500 cm<sup>-1</sup>, o que possibilita evidenciar as modificações nas bandas da curcumina causadas por sua interação com a ciclodextrina. Assim, podemos verificar que as bandas em 1589, 1601, e 1627 cm<sup>-1</sup> são fortemente influenciadas pela presença do agen-

te complexante. A banda em  $1627\text{ cm}^{-1}$  se desloca para  $1639\text{ cm}^{-1}$  no espectro do complexo, enquanto que para a mistura simples a posição deste pico permanece inalterada. Ainda no espectro do complexo, podemos observar que a intensidade do pico em  $1602\text{ cm}^{-1}$  foi consideravelmente reduzida em relação às bandas vizinhas em  $1589$  e  $1639\text{ cm}^{-1}$ . A vibração correspondente a esta banda é atribuída ao estiramento C=C no anel aromático. Este comportamento também foi observado pela técnica FTIR, e novamente traz evidências da encapsulação dos anéis da curcumina pela cavidade da CD, que passam a ter seu movimento de vibração restringido, levando a uma diminuição da intensidade da banda no espectro. Todas essas alterações podem ser acompanhadas também, pela Figura 5.26, onde as áreas das principais bandas para este intervalo foram representadas em função da sua posição.

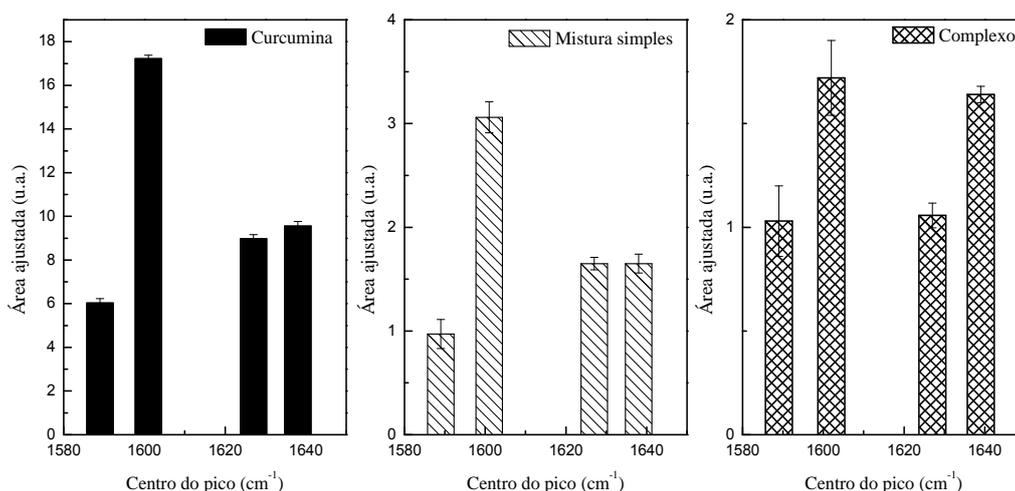


Figura 5.26 – Comparação entre as áreas das bandas ajustadas por deconvolução gaussiana para curcumina, mistura simples e complexo, para a região espectral entre  $1555$  e  $1675\text{ cm}^{-1}$ .

Outras diferenças foram observadas no espectro do complexo quando comparadas com os espectros da curcumina pura e da mistura simples. A Figura 5.27 mostra os espectros Raman das amostras, para a região entre  $1400$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ , que mostra algumas dessas alterações.

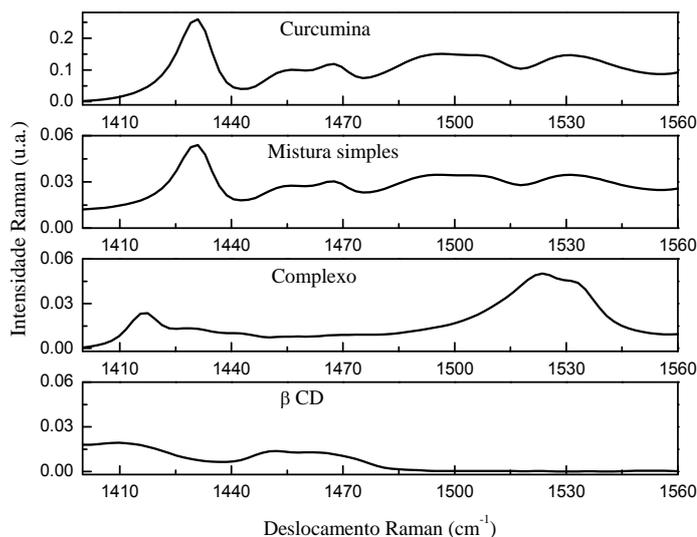


Figura 5.27 –Espectro Raman das amostras de curcumina, mistura simples, complexo por co-precipitação e  $\beta$  CD, para o intervalo entre 1400 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ .

Podemos observar que algumas bandas no espectro do complexo estão deslocadas em relação à posição por elas apresentada no espectro da amostra pura e da simples mistura entre as amostras. As bandas da curcumina em aproximadamente 1430, 1494 e 1508  $\text{cm}^{-1}$  se deslocam para 1416, 1522, 1532  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, no espectro do complexo, indicando interações entre a  $\beta$  CD e a curcumina nos anéis aromáticos, como mostrado na Tabela 5. 3.

Na região entre 1000 e 1350  $\text{cm}^{-1}$  também foram encontrados importantes indícios da formação do complexo de inclusão (curcumina -  $\beta$ -CD). Os espectros deconvoluídos para este intervalo estão apresentados na Figura 5.28.

Analisando os espectros podemos verificar que as bandas da curcumina centradas em 1168, 1206, 1251, 1270, 1317  $\text{cm}^{-1}$  aparecem no espectro do complexo centradas em 1164, 1200, 1238, 1263 e 1313  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda em 1270  $\text{cm}^{-1}$ , no espectro da amostra pura, aparece como um “ombro” e torna-se uma banda mais definida, centrada em 1263  $\text{cm}^{-1}$ , após a complexação. As vibrações associadas a essas bandas correspondem aos modos vibracionais de flexão entre os grupos CCH e CCC dos anéis aromáticos da curcumina e do grupo  $\text{CH}_3$  e  $\text{C}=\text{C}-\text{H}$  que liga o anel a cadeia da molécula (Tabela 5.3). Podemos observar ainda, que no espectro do complexo a banda em 1185  $\text{cm}^{-1}$  tem sua intensidade reduzida, quando comparada as bandas vizinhas em 1168 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Isto não acontece com a mistura simples, em que as bandas apresentam o mesmo comportamento da amostra de curcumina. As áreas destas bandas analisadas

foram representadas na Figura 5.29. Pode-se notar os deslocamentos ocorridos na amostra do complexo após a complexação.

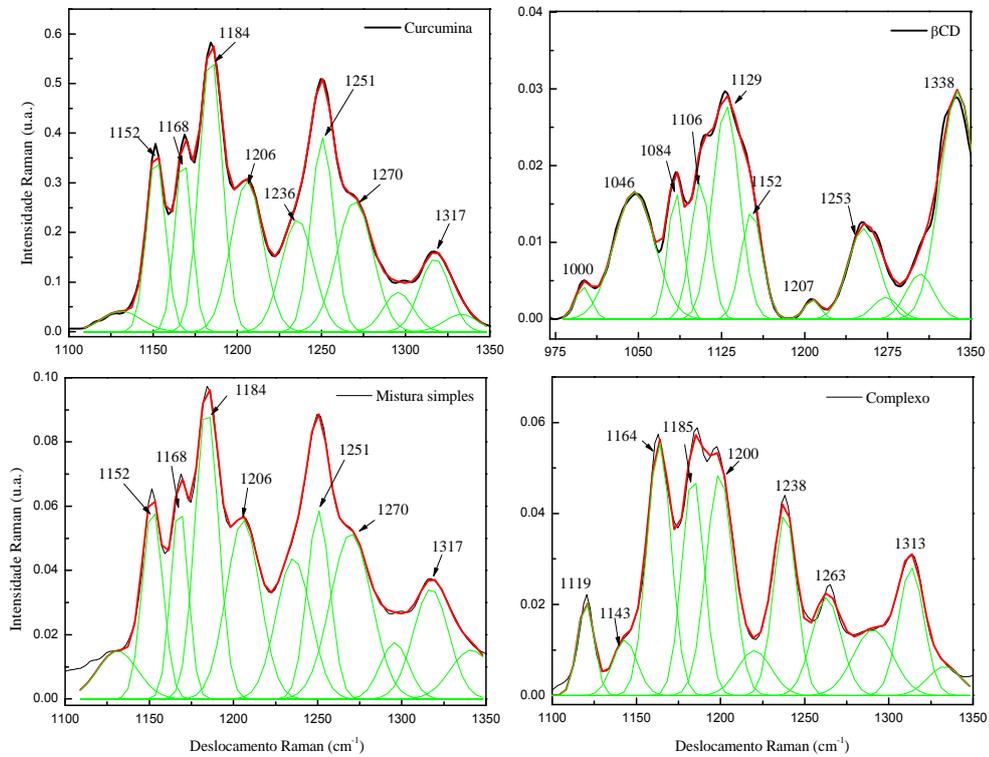


Figura 5.28 –Deconvolução do espectro Raman da curcumina, β ciclodextrina, mistura simples e complexo por co-precipitação para a região espectral entre 1000 e 1350  $\text{cm}^{-1}$ .

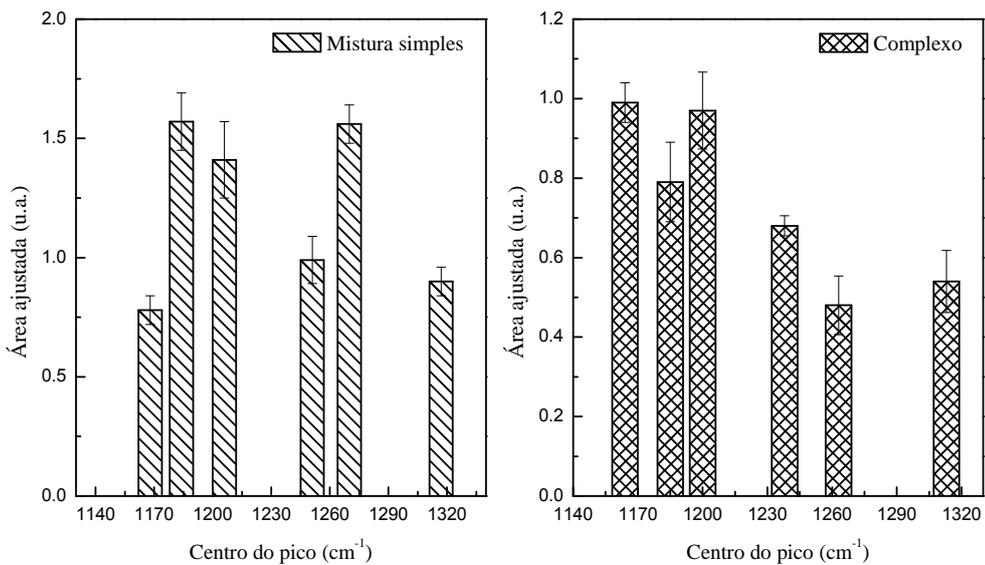


Figura 5.29 –Comparação entre as áreas das bandas ajustadas por deconvolução gaussiana para curcumina, mistura simples e complexo, para a região espectral entre 1000 e 1350 $\text{cm}^{-1}$ .

As alterações no espectro do complexo apresentados até o momento correspondem às modificações da amostra preparada pelo método de co-precipitação. No entanto, foram preparados também outros complexos pelos métodos, como o de liofilização, com e sem solubilização da curcumina em etanol e evaporação do solvente. O espectro para estes três complexos são apresentados na Figura 5.30. Os espectros obtidos por estes métodos foram menos intensos que o obtido pelo de co-precipitação. Ainda assim, na região entre 1500 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar algumas alterações nas principais bandas da curcumina, 1602 e 1627  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas às vibrações dos anéis aromáticos. Estas modificações podem ser melhor visualizadas na Figura 5.31, onde são apresentados os espectros deconvoluídos dos três complexos da Figura 5.30.

Podemos observar que os espectros dos complexos na Figura 5.31 apresentam as mesmas modificações exibidas pelo complexo obtido por co-precipitação, mas sem a mesma intensidade nos deslocamentos.

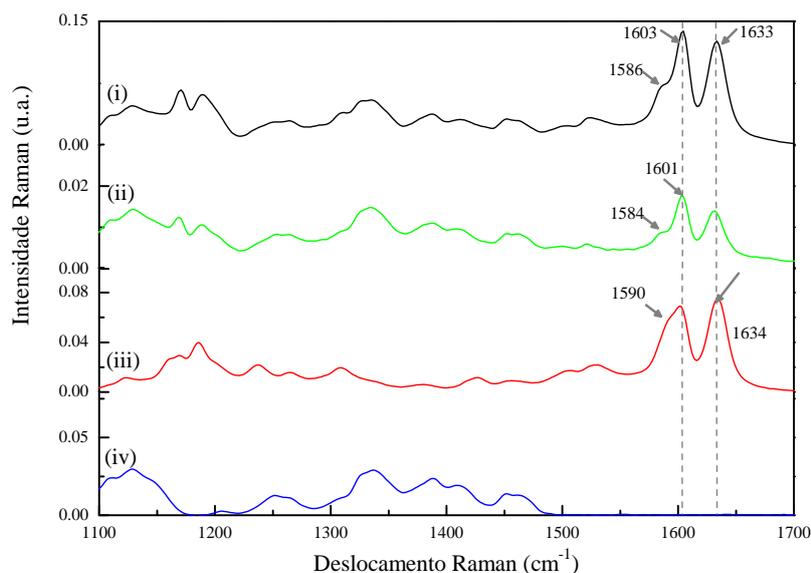


Figura 5.30 –Espectro Raman das amostras de complexo obtidos por : (i) liofilização com diluição da curcumina em etanol, (ii) liofilização sem diluição da curcumina em etanol, (iii) evaporação do solvente. (iv) Espectro Raman da  $\beta$  CD.

Visto que o complexo por co-precipitação foi o que apresentou indícios mais concretos da complexação entre a curcumina e a ciclodextrina, apenas esta amostra foi escolhida para as demais análises. Além disso, este complexo apresentou uma coloração final mais próxima daquela da amostra sem complexar. Já os demais complexos obtidos por liofilização e evaporação perderam cor, o que não é de interesse que aconteça com o

material. Na Figura 5.32 temos uma fotografia obtida das amostras de curcumina, mistura simples e complexos de inclusão, a fim de mostrarmos a coloração que cada amostra possuía.

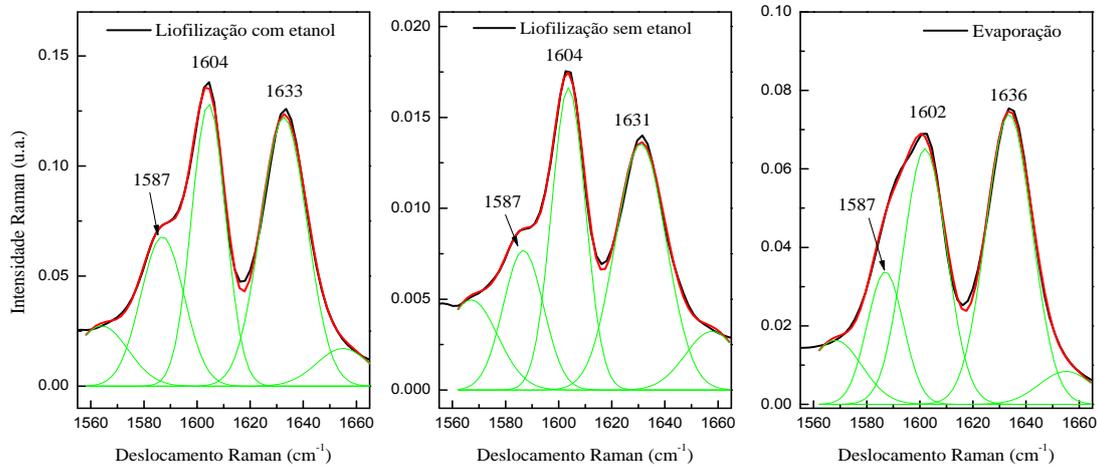


Figura 5.31 –Espectro Raman deconvoluídos para os complexos obtidos por liofilização com diluição da curcumina com e sem diluição da curcumina em etanol, e evaporação do solvente, para a região espectral entre 1560 e 1660  $\text{cm}^{-1}$ .



Figura 5.32 –Fotografia das amostras de curcumina pura, mistura simples ou física e complexos obtidos por: liofilização com e sem solvente, co-precipitação e evaporação.

Os resultados obtidos com a Espectroscopia Raman estão em acordo com os obtidos por FTIR, e ambos indicam que as extremidades da molécula de curcumina possam ter entrado na cavidade da CD para a formação do complexo de inclusão. Estes resultados são muito próximos aos descritos por Mohan e colaboradores (2012), que realizaram complexação da curcumina com ciclodextrinas modificadas e alterações consideráveis foram observadas nas mesmas bandas avaliadas no presente trabalho.

### 5.2.3 Espectroscopia Fotoacústica

A fim de avaliar o processo de complexação entre a curcumina e a ciclodextrina em uma região do espectro diferente do contemplado pelas técnicas FTIR e Raman, a Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada. Ela se apresenta como importante ferramenta para análises na região do ultravioleta e do visível do espectro eletromagnético por ser uma técnica não destrutiva e sem a necessidade de preparação do material. Assim, foram obtidos os espectros de absorção óptica das amostras na forma de pó. Os resultados estão mostrados na Figura 5. 33. Pode-se observar que a curcumina absorve a radiação em uma ampla faixa do espectro eletromagnético (200-700 nm), exibindo uma larga e intensa banda até 600 nm, e uma pequena e bem menos intensa entre 560 e 700 nm. Segundo Crivello e Bullut, (2005), a absorção em longos comprimentos de onda é indicação de que a molécula se apresenta predominantemente na forma ceto-enol. A ciclodextrina por sua vez não apresenta absorção nessa região espectral, o que possibilita acompanhar alterações no espectro da curcumina devido à sua interação com a CD.

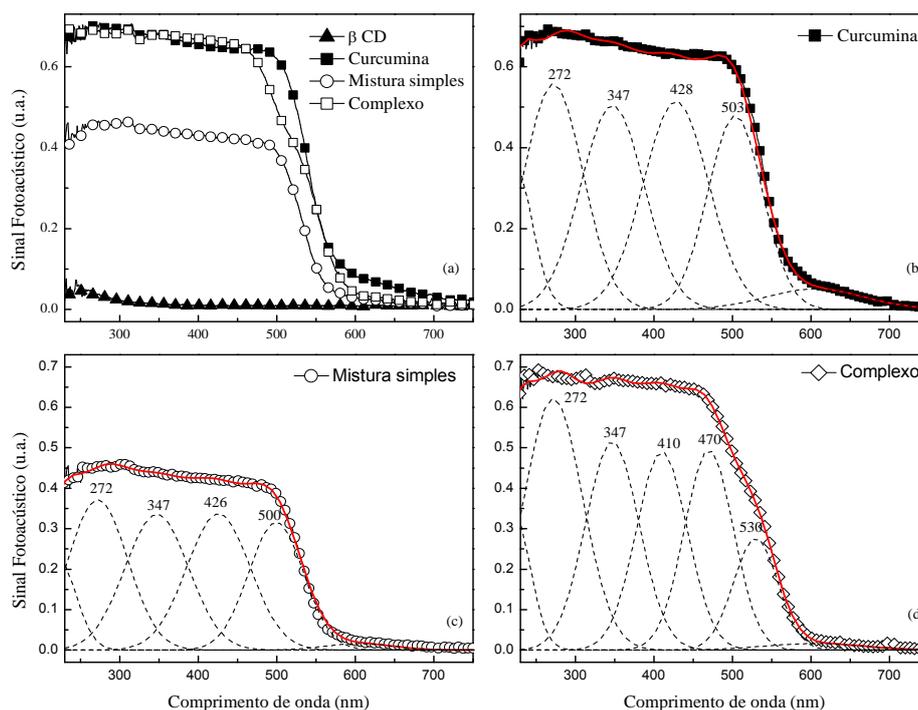


Figura 5. 33 – (a) Espectros de absorção óptica da  $\beta$  ciclodextrina, curcumina, mistura simples, e complexo por co-precipitação.

Na Figura 5. 33(a) pode-se verificar que o espectro da mistura simples reproduz o da curcumina, como esperado. O complexo por sua vez, se comporta de forma parecida à curcumina até aproximadamente 470 nm. Entre 470 e 600 nm, o espectro se modifica,

e surge um “ombro” em torno de 530 nm. Essa alteração entre o espectro do complexo com a curcumina e a mistura física pode ser visualizada com mais clareza comparando os espectros deconvoluídos por funções gaussianas, apresentados na Figura 5.33 (b), (c) e (d). Pode-se verificar que o espectro da curcumina apresenta gaussianas centradas em 221, 272, 347, 428, 503, 605 nm. A mistura física exibe os mesmos picos, o complexo por sua vez, altera as posições na região acima de 400 nm. Os picos assumem as posições 410 e 470 nm, e uma nova gaussiana aparece em 530 nm para ajustar o “ombro” que aparece no espectro. O pico em 428 nm é característico das extremidades da curcumina e é associado aos anéis aromáticos e seus grupos éter e hidroxila<sup>[84]</sup>. A alteração da posição desta banda no complexo pode sugerir a interação desta região da molécula com a ciclodextrina, resultado este que concorda com os apresentados pelas técnicas FTIR e Raman.

#### 5.2.4 Difração de Raios-X (DRX)

A difração de raios-X foi utilizada para avaliar a formação do complexo de curcumina- $\beta$ -CD, preparado a partir do método de co-precipitação. Os difratogramas das amostras de curcumina,  $\beta$ -CD, e complexo (curcumina- $\beta$ -CD) estão apresentados na Figura 5.34.

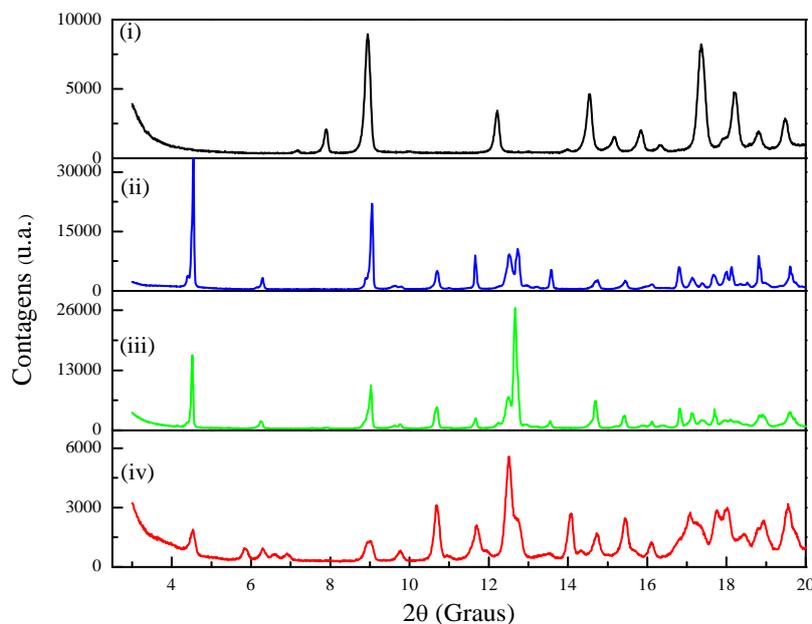


Figura 5.34 – Difração de raio-X: (i) curcumina, (ii)  $\beta$ -CD, (iii) mistura simples da curcumina com  $\beta$ -CD na proporção molar de 1:2, (iv) complexo curcumina- $\beta$ -CD obtido por co-precipitação, também na proporção molar de 1:2.

Os dados mostram que curcumina e  $\beta$ -CD exibiram uma série de linhas finas e intensas, que são indicativos de cristalinidade no material. O difratograma da mistura simples representou a soma das linhas espectrais de ambos os componentes que estavam presentes, sendo a cristalinidade ainda presente. A amostra do complexo por sua vez, apresentou em seu difratograma o desaparecimento de algumas linhas espectrais da curcumina: em  $7,90^\circ$ ,  $14,5^\circ$ ,  $15,2^\circ$ ,  $15,8^\circ$  e  $18,2^\circ$  ( $2\theta$ ). Além disso, observou-se o aparecimento de novas linhas, uma intensa em  $14,1^\circ$  e linhas mais fracas em  $5,83^\circ$ ,  $6,58^\circ$  e  $6,91^\circ$  ( $2\theta$ ). Este resultado indica a formação de novas fases cristalinas, que podem corresponder à formação do complexo de inclusão de mesma natureza, sugerindo a interação entre as moléculas de curcumina e a  $\beta$ -CD. É também importante observar que as intensidades dos picos são menores em relação aos espectros dos materiais precursores, indicando um grau de cristalinidade inferior para o complexo. Segundo Moyano e colaboradores, este fato pode ser atribuído a muito rápida precipitação do complexo durante a sua preparação, insuficiente para um crescimento regular do cristal. Os autores observaram este mesmo efeito na cristalinidade em medidas de DRX de complexos formados entre gliclazida e  $\beta$ -CD. Concluímos, portanto, que os resultados apresentados pela difração de raios-X confirmam os obtidos a partir das técnicas FTIR, FT-Raman e espectroscopia fotoacústica.

### 5.2.5 Estudos complementares

Como mencionado anteriormente este projeto foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Enzimática da Universidade Estadual de Maringá. Assim, além dos estudos até o momento apresentados, outros testes foram realizados pela doutoranda Camila Mangolim<sup>[23]</sup>. Foram realizados estudos sobre a eficiência da complexação, estabilidade, solubilidade, determinação da cor, aplicação em alimentos e análise sensorial.

Segundo Mangolim, os resultados encontrados mostraram que o complexo preparado por co-precipitação apresentou uma eficiência de 74%, indicando, portanto, que 74% da quantidade de corante que foi inicialmente adicionada para o processo permaneceu no complexo obtido. O estudo de solubilidade mostrou que a possível complexação aumentou a solubilidade do corante em 31 vezes. A estabilidade das amostras também foi avaliada em diversas condições. Em exposição à luz solar por 30 dias, o corante apresentou uma degradação 18% menor em relação à curcumina pura, apresentando uma retenção da cor da amostra em  $(84\pm 3)\%$ , enquanto que a curcumina e a mistura simples

apresentaram, após a exposição, uma retenção de cor de  $(72\pm 1)\%$  e  $(73.4\pm 0.2)\%$ , respectivamente.

Frente a variações de pH o complexo exibiu uma melhor estabilidade do que o corante puro em aproximadamente 2,7 vezes para valores de pH de 1-7. No entanto, a valores de pH 8 e 9, a degradação ocorreu para ambas as amostras. As amostras foram ainda submetidas a condições de armazenamento em três diferentes temperaturas, 4, -15 e 25° C. Os resultados foram observados pela retenção da cor do material, em que a retenção do complexo foi 9% melhor do que a da curcumina pura a -15 °C (uma temperatura que é apropriada para o armazenamento do corante de acordo com o fabricante) e 4 % melhor a 4 °C. Nenhuma melhoria ou variação entre o corante puro e complexado foi obtido para o armazenamento das amostras a 25° C.

A curcumina pura e o complexo (curcumina- $\beta$ -CD) foram utilizados para a preparação de sorvetes de baunilha. O produto que continha o complexo teve boa aceitação sensorial pelo público e foi de mais fácil preparação comparado com o corante puro, devido à sua melhor dispersão na mistura. Além disso, os dados de colorimetria mostraram que o produto preparado com complexo em relação ao que continha apenas a curcumina, intensifica a cor do produto, mesmo quando utilizada uma quantidade de 83% menos corante, gerando assim uma significativa economia no processo de produção.

Os resultados mostraram, portanto, que a ciclodextrina pode interagir com a curcumina melhorando algumas de suas propriedades como solubilidade e estabilidade. Além de melhorar em alguns aspectos a utilização do corante em alimento, viabilizando a sua utilização na indústria de alimentos.

## Conclusões

A partir dos resultados obtidos do primeiro estudo, concluímos que as Espectroscopias Raman e FTIR por Refletância Total Atenuada mostraram a complexação entre a insulina e a HP $\beta$ CD. Por meio de uma deconvolução espectral os espectros Raman das amostras de insulina, HP $\beta$ CD, mistura simples e complexo (HP $\beta$ CD–insulina) puderam ser comparados, possibilitando investigar alterações nos modos vibracionais de ambas as moléculas devido à interação entre elas. Os dados apontam que tanto a ciclodextrina quanto a insulina apresentaram alterações em suas bandas no espectro do complexo, quando comparados aos demais espectros. Na ciclodextrina pode ser visto mudanças nas bandas associadas à ligação glicosídica, ligação esta orientada para dentro da cavidade, sugerindo a inserção de um hóspede na mesma. Esta modificação na molécula da HP $\beta$ CD também foi observada nos espectros obtidos por FTIR.

Para a insulina foi possível observar mudanças nas bandas relacionadas aos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina. Sobretudo em picos atribuídos às ligações envolvendo os anéis aromáticos presentes nas estruturas desses dois aminoácidos. Isto sugere que a interação com a ciclodextrina aconteça localmente nestas regiões da molécula, concordando com os dados encontrados na ressonância magnética nuclear, considerada padrão nestes estudos. Os resultados também estão em concordância com o apresentado na literatura, em estudos envolvendo a complexação da insulina com ciclodextrinas, mas por outros métodos de caracterização, como H<sup>1</sup>RMN e DSC. Além disso, a Espectroscopia Raman mostrou que houve estabilidade das pontes de dissulfeto nas amostras contendo insulina. E no espectro do complexo pode ser observada, ainda, alteração na região Amida I, atribuída a uma das estruturas secundárias da proteína.

Assim a Espectroscopia Raman mostrou-se uma ferramenta útil e inovadora para o estudo e caracterização de complexos envolvendo ciclodextrinas e proteínas. Apresentando inclusive vantagens sobre técnicas consideradas padrão, pois não necessita de uma preparação específica envolvendo solventes especiais para a realização do experimento, facilitando, assim, a realização das análises.

No segundo estudo, os resultados sugerem a formação do complexo entre a curcumina e a  $\beta$ -CD. Os dados dão indícios de que ambas as extremidades da curcumina tenham sido inseridas na cavidade da ciclodextrina. Isto foi possível aplicando novamente o método de deconvolução espectral. Foram analisados e comparados, os espectros obtidos pelo Raman e FTIR das amostras de curcumina,  $\beta$ -CD, mistura simples e complexo. Ambas as técnicas indicaram alterações em vários modos vibracionais ligados, principalmente, aos anéis aromáticos presentes nos terminais da molécula. Além disso, o espectro Raman do complexo, obtido por co-precipitação, mostrou uma maior influência da complexação sobre as bandas de curcumina, do que os obtidos por evaporação e liofilização. Os resultados obtidos por espectroscopia fotoacústica e difração de raios-X também indicam a formação do complexo de inclusão, confirmando os obtidos por Raman e FTIR.

Finalmente, os estudos deste trabalho sugerem que as técnicas empregadas são ferramentas importantes que podem auxiliar no processo de caracterização físico química de complexos formados a partir de ciclodextrinas, uma área de grande importância científica e tecnológica, com possibilidades de aplicação na área de novos fármacos e alimentos in natura e processados.



# APÊNDICES

## *Espectroscopia vibracional: Modelo diatômico clássico*

Neste apêndice apresentaremos brevemente o modelo vibracional clássico para moléculas diatômicas. Iniciaremos com a revisão de alguns conceitos fundamentais para o entendimento do modelo, cuja interpretação e o desenvolvimento matemático são mais simples que o caso poliatômico apresentado no Capítulo 3.

### **A.1 Radiação e matéria**

A espectroscopia é a área da ciência dedicada ao estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Como cada comprimento de onda transporta diferente quantidade de energia e ao interagir com a matéria distintas interações são observadas<sup>[86]</sup>. A análise dessas interações, através dos espectros moleculares e atômicos, pode ser utilizada para caracterizar o material em estudo. Os resultados levam a informações a respeito da estrutura molecular (simetria molecular, distância e ângulos das ligações) e das propriedades químicas (distribuição eletrônica, alongação das ligações, processos intra e intermoleculares)<sup>[64][86]</sup>.

A radiação eletromagnética pode ser tratada classicamente como de caráter ondulatório. Cada onda pode ser caracterizada por um comprimento de onda, conforme ilustrado na Figura A.1. Maxwell (1855) foi o primeiro a apontar que a luz era justamente uma forma de onda eletromagnética, fazendo parte do espectro completo que mostra-se em ordem crescente de energia, desde as ondas de rádio até radiações de alta energia como os raios-X e os raios- $\gamma$ <sup>[64][71]</sup>.

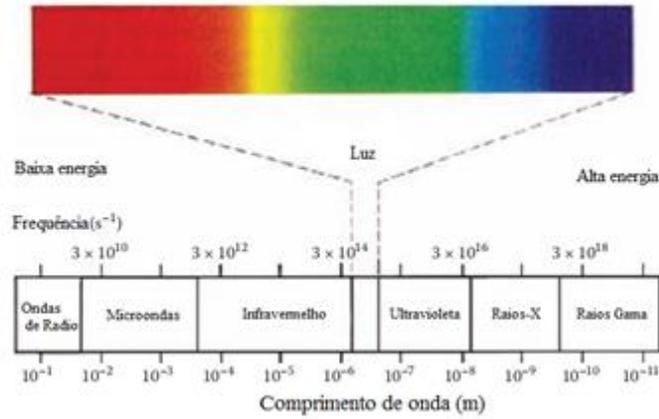


Figura A.1– Representação esquemática o espectro eletromagnético<sup>[86]</sup>.

Uma onda eletromagnética pode ser interpretada como uma componente do campo eletromagnético  $E$  e uma componente do campo magnético  $B$  oscilando no espaço, como mostrado na Figura A.2<sup>[64][71]</sup>. A direção de oscilação é perpendicular à direção de propagação da onda.

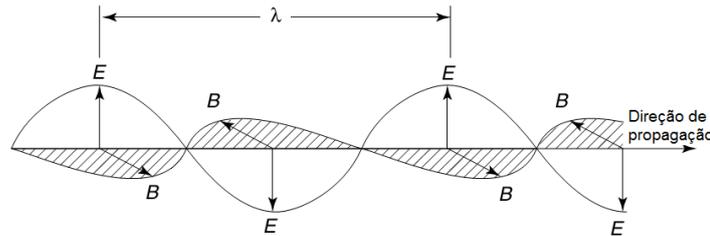


Figura A.2 – Componentes do campo elétrico e magnético de uma onda plano polarizada<sup>[67]</sup>.

Nossa discussão se baseará apenas na interação da componente elétrica da radiação com a matéria. Assim, podemos escrever a componente do campo elétrico em função do tempo como:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \tag{A.1}$$

Em que  $E_0$  e  $\nu$  são a amplitude e a frequência da radiação, respectivamente<sup>[62]</sup>. A frequência está relacionada com o comprimento da onda ( $\lambda$ ) da seguinte forma:

$$c = \lambda\nu \tag{A.2}$$

Sendo  $c$  a velocidade da luz.

A absorção ou a emissão da energia da radiação pela matéria não acontece continuamente, mas em pequenas frações de energia. Essa energia ( $E$ ) é proporcional à

frequência  $\nu_0$  do oscilador harmônico responsável pela absorção ou emissão da radiação [64]. Assim podemos escrever:

$$E = h\nu_0 \quad (\text{A.3})$$

Em que  $h$  é a constante de Planck, cujo valor corresponde a  $h = 6.63 \times 10^{-34} \text{J.s}$  [64]. Einstein chamou a quantidade de energia  $h\nu$  de fótons. Um fóton de energia é emitido quando uma transição eletrônica ocorre. No processo de emissão de luz um elétron de maior energia ( $E_h$ ) decai para um estado de menor energia ( $E_l$ ) [62][64][67]. Assim podemos escrever a equação que forma a base de todo o estudo quantitativo da espectroscopia:

$$E_h - E_l = \Delta E = h\nu \quad (\text{A.4})$$

Ao contrário da emissão, a absorção de um fóton por um átomo acontece do estado de menor para o de maior energia. Na Figura A.3 estão esquematizados esses dois processos envolvidos na interação da radiação com a matéria.

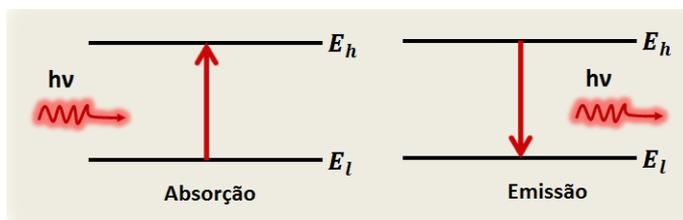


Figura A.3 - Interação da radiação eletromagnética com a matéria.

A partir das transições, que são fornecidas pelos espectros, podem-se determinar as posições relativas dos níveis energéticos de átomos e moléculas. No caso de moléculas, dependendo dos níveis energéticos envolvidos (eletrônicos, vibracionais e rotacionais) as transições podem ser observadas em regiões distintas do espectro eletromagnético [61][86]. Geralmente na região ultravioleta e visível estão compreendidas as transições eletrônicas, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas. Embora esta última também possa ser observada na região do infravermelho afastado em situações envolvendo moléculas com átomos leves [61].

Assim podemos considerar que a energia total de uma molécula é a soma das diferentes energias (eletrônica, vibracional e rotacional) compreendidas por ela [64].

$$E_{tot} = E_{ele} + E_{vib} + E_{rot} \quad (\text{A.5})$$

Em que  $E_{\text{ele}} \gg E_{\text{vib}} \gg E_{\text{rot}}$ . Isto permite, numa primeira aproximação, que cada um destes níveis possa ser considerado separadamente. Isto proporciona com que cada espectro possa ser estudado independentemente das interações existentes entre eles [64]. Neste contexto, será abordado a seguir o estudo dos espectros vibracionais através da espectroscopia Raman e no infravermelho. O modelo foi aplicado à molécula diatômica, cuja interpretação e o desenvolvimento matemático são mais simples.

## A.2 Modelo vibracional para moléculas diatômicas

O movimento vibracional é um deslocamento periódico referente aos núcleos (átomos) numa molécula, cujo centro de massa permanece inalterado no espaço. A combinação linear apropriada dos deslocamentos de cada núcleo a partir da sua posição é chamada coordenada de vibração,  $q$ , e é usada para descrever um movimento de vibração particular [62][68]. As moléculas poliatômicas apresentam vários e distintos modos vibracionais, já moléculas diatômicas apresentam apenas um modo. Isto simplifica a análise dos espectros e o tratamento teórico. Por este motivo vamos iniciar nossa discussão abordando o modelo para essa configuração. Utilizaremos para isso o modelo clássico do oscilador harmônico, obtendo as equações de movimento a partir da equação de Newton. Em seguida obteremos por um caminho diferente o resultado anterior. No entanto, introduziremos as expressões da energia cinética e potencial a partir das equações de Lagrange, cuja obtenção se torna muito mais simples para o caso poliatômico.

Em um primeiro momento consideremos que o modelo para as vibrações de uma molécula é o de massas pontuais (correspondente aos núcleos atômicos) ligadas por molas, com massa desprezível, correspondendo às ligações químicas. Na Figura A.4, podemos observar o exemplo mais simples para oscilador. Ele consiste de uma partícula de massa  $m$  ligada por meio de uma mola, de constante de força  $k$ , a uma parede rígida. A vibração consiste no movimento periódico da partícula sobre o eixo que contém a mola, fazendo com que a mesma sofra distensão, aumentando e diminuindo a distância da partícula à parede [87].

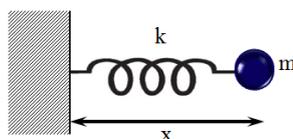


Figura A.4— Oscilador harmônico: a partícula de massa  $m$  vibra contra um ponto fixo sob a influência de uma mola de comprimento  $x$  e constante de força  $k$ .

Vamos basear nossa discussão na Figura A.5, que descreve a energia potencial associada à molécula. Para compreendermos o movimento envolvido precisamos entender primeiramente como a energia potencial tem influencia sobre ela.

Nas regiões vizinhas ao mínimo da curva ( ponto  $R_e$ ) a energia potencial pode ser aproximada por uma curva parabólica<sup>[63]</sup>. O que nos permite escrever:

$$V = \frac{1}{2}k\Delta x^2 \quad \Delta x = x - R_e \quad (\text{A.6})$$

Em que  $k$  é a constante de força da ligação, cujo valor aumenta à medida que as fronteiras da curva do potencial tornam-se mais abruptas<sup>[63]</sup>.

Para entendermos melhor a relação entre forma da curva do potencial e a constante  $k$ , vamos expandir o potencial em torno do mínimo usando série de Taylor:

$$V(\Delta x) = V(0) + \left(\frac{dV}{d\Delta x}\right)_0 \Delta x + \frac{1}{2}\left(\frac{d^2V}{d\Delta x^2}\right)_0 \Delta x^2 + \dots \quad (\text{A.7})$$

Para pequenos deslocamentos ao redor do ponto de mínimo podemos desprezar todos os termos de ordem superior ao quadrático. O primeiro termo, por escolha, pode ser considerado zero. A derivada primeira também se anula por se tratar de um ponto de mínimo, região de equilíbrio estável. Logo, o único termo diferente de zero é o proporcional ao quadrado do deslocamento, e então podemos escrever:

$$V(\Delta x) = \frac{1}{2}\left(\frac{d^2V}{d\Delta x^2}\right)_0 \Delta x^2 \quad (\text{A.8})$$

O que nos leva a constatar, em primeira aproximação, que a curva da energia potencial para uma molécula é parabólica e a constante de força  $k$  pode ser identificada com a derivada segunda de  $V$  com relação ao  $\Delta x$ <sup>[63]</sup>:

$$k = \left(\frac{d^2V}{d\Delta x^2}\right)_0 \quad (\text{A.9})$$

Vemos então que se a curva da energia potencial for muito abrupta, fortemente confinante, corresponderá a uma ligação rígida com valores elevados de  $k$ . Ao contrário se a curva for muito aberta e rasa, a constante  $k$  será pequena, como mostra a Figura A.6.<sup>[63]</sup>

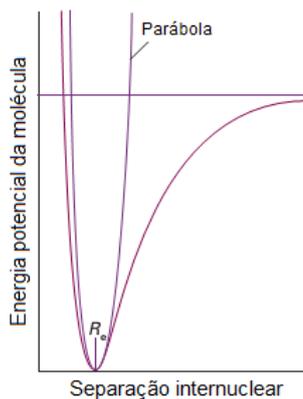


Figura A.5– Energia potencial da molécula em função da separação internuclear. O potencial do tipo parabólico pode ser considerado como uma boa aproximação em regiões próximas ao fundo do poço. À medida que saímos dessa região a aproximação torna-se ruim e completamente errônea. Nessas condições verificamos que a curva de potencial real é menos confinadora do que a parábola<sup>[63]</sup>.

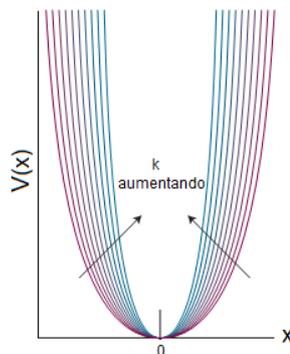


Figura A.6- A constante de força é uma medida da curvatura de energia potencial nas proximidades do comprimento de ligação no equilíbrio. Quanto mais íngreme o poço maior será o valor de  $k$ <sup>[63]</sup>.

Associada a energia potencial existirá uma força de restauração, conhecida como lei de Hooke, exercida pela mola com a finalidade de trazer a partícula de volta à posição inicial<sup>[63]</sup>. A relação entre elas é dada por:

$$f = -\frac{dV}{d\Delta x} \tag{A.10}$$

Substituindo  $V$  pela Equação(A.8), e já trocando a derivada segunda por  $k$ , obtemos:

$$f = -k\Delta x \tag{A.11}$$

É importante notar que o sinal negativo indica que a força de restauração é contrária ao deslocamento inicial sofrido pela partícula<sup>[87]</sup>.

Da segunda lei de Newton temos:

$$f = m\Delta\ddot{x} \quad (\text{A.12})$$

Igualando com a lei de Hooke, temos:

$$f = -k\Delta x = m\Delta\ddot{x} \text{ ou } \Delta\ddot{x} + \frac{k}{m}\Delta x = 0 \quad (\text{A.13})$$

#### Equação do oscilador harmônico

A Equação (A.13) descreve o movimento para um oscilador harmônico. Uma vez que a partícula entra em movimento assim permanecerá, completando ciclos, a menos que forças externas atuem no sistema cessando o movimento <sup>[61][87]</sup>.

Devido o movimento ser periódico é esperado que a solução da Equação (A.13) para  $\Delta x$  também seja periódica. Funções que se repetem no tempo, como seno e cosseno são pertinentes para este caso. Pode-se escrever a solução como:

$$\Delta x = x_0 \cos(2\pi vt + \varphi) \quad (\text{A.14})$$

A posição inicial da partícula é dada por  $x_0$  e a função cosseno com o termo  $2\pi$  indica a periodicidade do movimento <sup>[87]</sup>. A frequência com que acontece o movimento é representada por  $v$  e é o próximo parâmetro de interesse a ser obtido.

A partir da solução acima pode-se determinar  $\Delta\ddot{x}$  e então substituindo na equação do oscilador obter a seguinte expressão:

$$\begin{aligned} -4\pi^2 v^2 x_0 \cos(2\pi vt + \varphi) + \frac{k}{m} x_0 \cos(2\pi vt + \varphi) &= 0 \\ -4\pi^2 v^2 + \frac{k}{m} &= 0 \end{aligned}$$

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (\text{A.15})$$

Sendo  $v$  a frequência de oscilação da partícula, ela depende de duas variáveis que são propriedades da própria partícula, a massa e a constante de força <sup>[61]</sup>. É possível verificar que a Equação (A.14) é solução do sistema desde que  $v$  satisfaça Equação (A.15).

A energia potencial e cinética associada à esta partícula é dada respectivamente por,  $V = \frac{1}{2}k\Delta x^2$  e  $T = \frac{1}{2}m\Delta\dot{x}^2$ . De posse das duas equações pode-se construir a função

Lagrangeana ( $L = T - V$ ) e obter por um segundo caminho as equações de movimento da partícula<sup>[88]</sup>.

A equação de Lagrange pode ser dada por<sup>[88]</sup>:

$$\frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial L}{\partial \Delta \dot{x}} \right] - \frac{\partial L}{\partial \Delta x} = 0 \quad (\text{A.16})$$

Analisando as expressões para as energias observa-se que  $T$  é função apenas de  $\Delta \dot{x}$  e  $V$  apenas de  $\Delta x$ . Logo é possível reescreve-la da seguinte forma:

$$\frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}} \right] + \frac{dV}{d\Delta x} = 0 \quad (\text{A.17})$$

Efetuada as derivadas indicadas na equação acima:

$$\frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial}{\partial \Delta \dot{x}} \left( \frac{1}{2} m \Delta \dot{x}^2 \right) \right] - \frac{d}{d\Delta x} \left( \frac{1}{2} k \Delta x^2 \right) = 0 \quad (\text{A.18})$$

Que resulta:

$$m \Delta \ddot{x} + k \Delta x = 0 \quad (\text{A.19})$$

Que é idêntica a encontrada anteriormente e levará ao mesmo valor de frequência apresentada na Equação (A.15). A seguir será que o sistema seja constituído por duas partículas de massas  $m_1$  e  $m_2$  ligadas por uma mola, representado a ligação química existente entre elas, de constante  $k$ , como ilustra a Figura A.7<sup>[87]</sup>.

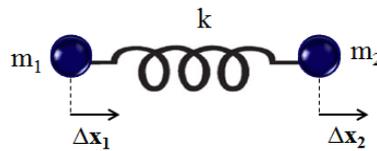


Figura A.7- A molécula diatômica como um oscilador harmônico.

Este caso torna-se mais complicado porque agora as duas partículas vão sofrer pequenos deslocamentos, durante a vibração, representados por  $\Delta x_1$  e  $\Delta x_2$ . Estes representam as variações das coordenadas cartesianas com o movimento ( $\Delta x, \Delta y, \Delta z$ ) e não devem ser confundidos com as coordenadas cartesianas das posições de equilíbrio ( $x, y, z$ ). Esclarecido isto, as energias cinética e potencial podem ser escritas como segue<sup>[88]</sup>:

$$T = \frac{1}{2}(m_1\Delta\dot{x}_1^2 + m_2\Delta\dot{x}_2^2) \text{ e } V = \frac{1}{2}k(\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 \quad (\text{A.20})$$

Conhecidas as expressões para as energias pode-se determinar a equação de Lagrange para cada coordenada, o que originará o seguinte sistema de equações diferenciais:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial T}{\partial \Delta\dot{x}_1} \right] + \frac{dV}{d\Delta x_1} &= 0 \\ \frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial T}{\partial \Delta\dot{x}_2} \right] + \frac{dV}{d\Delta x_2} &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

Substituindo a Equação (A.20) em (A.21) e fazendo as derivadas existentes obtém-se com relação, primeiramente, a  $\Delta x_1$ :

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}(m_1\Delta\dot{x}_1) - k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 \\ m_1\Delta\ddot{x}_1 + k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.22})$$

Procedendo analogamente com relação a  $\Delta x_2$  surgem duas equações de movimento:

$$\begin{aligned} m_1\Delta\ddot{x}_1 - k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 \\ m_2\Delta\ddot{x}_2 + k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.23})$$

Como visto anteriormente essas equações tem soluções do tipo oscilatórias, logo podem ser escritas como  $\Delta x_1 = A_1 \cos(2\pi\nu t + \varphi)$  e  $\Delta x_2 = A_2 \cos(2\pi\nu t + \varphi)$  fornecendo as soluções deste sistema de equações. Substituindo  $\Delta x_1$  e  $\Delta x_2$  e suas respectivas derivadas na Equação (A.13):

$$\begin{aligned} -4\pi^2\nu^2 m_1 A_1 - k(A_2 - A_1) &= 0 \\ -4\pi^2\nu^2 m_2 A_2 + k(A_2 - A_1) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.24})$$

Reagrupando segundo as amplitudes:

$$\begin{aligned} (-4\pi^2\nu^2 m_1 + k)A_1 - kA_2 &= 0 \\ -kA_1 + (-4\pi^2\nu^2 m_2 + k)A_2 &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.25})$$

Além da solução trivial,  $A_1 = A_2 = 0$ , este sistema de equações lineares homogêneas terá solução se o determinante dos coeficientes das amplitudes for igual à zero:

$$\begin{vmatrix} -4\pi^2\nu^2 m_1 + k & -k \\ -k & 4\pi^2\nu^2 m_2 + k \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{A.26})$$

Resolvendo o determinante obtêm-se:

$$(4\pi^2\nu^2)[4\pi^2\nu^2 m_1 m_2 - (m_1 + m_2)k] = 0 \quad (\text{A.27})$$

Cujas raízes são:

$$\nu = 0 \text{ e } \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{A.28})$$

Sendo,  $\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$  a massa reduzida.

Substituindo a primeira raiz em (A.25), resulta:  $kA_1 = kA_2$ . Como as amplitudes estão relacionadas aos deslocamentos, o resultado acima leva a  $\Delta x_1 = \Delta x_2$ , que é o movimento de translação. Para o segundo valor de frequência:

$$\begin{aligned} \left(-\frac{k}{\mu} m_1 + k\right) A_1 - kA_2 &= 0 \\ -kA_1 + \left(-\frac{k}{\mu} m_2 + k\right) A_2 &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.29})$$

Somando membro a membro tem-se:

$$-\frac{k}{\mu} (m_1 A_1 + m_2 A_2) = 0 \quad (\text{A.30})$$

O que leva a  $m_1 A_1 = -m_2 A_2$ , ou  $\frac{A_1}{A_2} = -\frac{m_2}{m_1}$  o que corresponde a escrever  $\frac{\Delta x_1}{\Delta x_2} = -\frac{m_2}{m_1}$ . Conclui-se deste último resultado que as partículas se deslocam em direções opostas e com amplitudes inversamente proporcionais às suas massas, ou seja, executam movimento vibracional. Outra informação interessante é com relação à segunda raiz obtida. Verifica-se que a molécula diatômica apresenta apenas um modo vibracional, que é definido em função das massas dos dois átomos e da constante  $k$ . Esta última ainda pode revelar importantes características a respeito do grau de interação entre os átomos na ligação química existente<sup>[61]</sup>.

O modelo discutido também pode ser resolvido utilizando coordenadas internas. Elas caracterizam as variações da forma de uma molécula, diferenciando-se da forma no equilíbrio, independentemente da posição da molécula ou da orientação no espaço. O tipo mais comum define mudanças de comprimento das ligações e dos ângulos de ligação com relação à posição de equilíbrio<sup>[62]</sup>. Para a molécula diatômica a coordenada

interna pode ser escrita por  $\Delta r$ , ( $\Delta r = \Delta x_2 - \Delta x_1$ ), da ligação entre os átomos 1 e 2<sup>[61]</sup>. Assim podem-se obter equações separadas para translação (coordenada de centro de massa) e para a vibração (coordenada interna de ligação).

A energia cinética pode ser escrita em função das coordenadas cartesianas de deslocamento e a energia potencial em função da coordenada interna, como a seguir:

$$V = \frac{1}{2}k(\Delta r)^2 \quad \text{e} \quad T = \frac{1}{2}(m_1\Delta\dot{x}_1^2 + m_2\Delta\dot{x}_2^2) \quad (\text{A.31})$$

Para o centro de massa, com coordenada  $X$ , é possível escrever que:

$$m_1\Delta x_1 + m_2\Delta x_2 = (m_1 + m_2)\Delta X \quad (\text{A.32})$$

Substituindo nesta equação  $\Delta x_2$  por  $\Delta r + \Delta x_1$ :

$$m_1\Delta x_1 + m_2(\Delta r + \Delta x_1) = (m_1 + m_2)\Delta X \quad (\text{A.33})$$

O que resulta em:

$$\Delta x_1 = \Delta X - \frac{m_2}{m_1 + m_2} \cdot \Delta r \quad (\text{A.34})$$

Procedendo de forma análoga encontra-se uma equação para  $\Delta x_2$ :

$$\Delta x_2 = \Delta X - \frac{m_1}{m_1 + m_2} \cdot \Delta r \quad (\text{A.35})$$

De posse de  $\Delta x_1$  e  $\Delta x_2$  pode-se derivá-los em função do tempo e seguida substituir na expressão da energia cinética. O que resulta em:

$$T = \frac{1}{2}[(m_1 + m_2)\Delta\dot{X}^2 + \mu\Delta\dot{r}^2] \quad (\text{A.36})$$

O que permite escrever novamente as equações de Lagrange:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial T}{\partial \Delta\dot{r}} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta r} &= 0 \\ \frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial T}{\partial \Delta\dot{X}} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta X} &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.37})$$

Calculando as derivadas e rearranjando os termos obtêm-se:

$$\begin{aligned} \mu\Delta\ddot{r} + k\Delta r &= 0 \\ (m_1 + m_2)\Delta\ddot{X} &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A.38})$$

A primeira equação tem forma parecida com as já resolvidas, e sua solução é  $\Delta r = A_0 \cos(2\pi vt + \Phi)$ . Que levará ao mesmo valor de frequência obtido anteriormente:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{A.39})$$

A segunda equação corresponde a um movimento translacional, com solução  $\Delta \ddot{X} = 0$ .

# Apêndice **B**

## *Trabalhos publicados durante o desenvolvimento da tese*

### **1. Artigos incluídos na tese:**

**a.** MANGOLIM, C. S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; SATO, F.; BAESSO, M. L.; MEDINA, A. N.; MATIOLI, G. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FTIR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chemistry*, v. 153, p. 361–370, 2014.

**b.** VALENTINI, S. R.; NOGUEIRA, A. C.; FENELON, V. C.; SATO, F. MEDINA, A. N.; SANTANA, R. G.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.490, p. 229–239, 2015.

### **2. Artigos não incluídos na tese:**

**a.** BULLA, M.K.; HERNANDES, L.; BAESSO, M.L.; NOGUEIRA, A.C.; BENTO, A.C.; BORTOLUZZI, B.B.; SERRA, L.Z.; CORTEZ, D.A. Evaluation of Photoprotective Potential and Percutaneous Penetration by Photoacoustic Spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Extract. *Photochemistry and photobiology*, v. 91, p. 558-566, 2015.

**b.** BORGHI-PANGONI, F. B.; TUNIN, L. M.; BONIFÁCIO, K. L.; NOGUEIRA, A. C.; HERNANDES, L.; YAMASHITA, F.; BARBOSA, D.S. BAESSO, M.L.; TRUITI, T. M. C; DINIZ, A. *Nectandra falcifolia*: potential phytopharmaceutical for skin damage protection designed by statistical approach and characterized by photoacoustic spectroscopy. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2015.

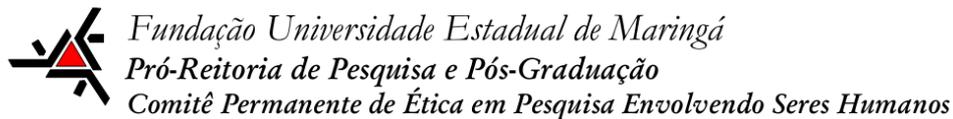
c. TUNIN, L. M.; BORGHI-PANGONI, F. B.; NOGUEIRA, A. C.; HIGACHI, L.; BARBOSA, D.S. BAESSO, M.L.; HERNANDES, L.; DINIZ, A.; TRUITI, T. M. C. Employing photoacoustic spectroscopy in the evaluation of the skin permeation profile of emulsion containing antioxidant phenolic-rich extract of *Melochia arenosa*. *Pharmaceutical Biology*, 2015.

d. NOGUEIRA, A. C. GRACIANO, A. X.; NAGATA, J.Y.; FUJIMAKI, M.; TERADA, R. S. S.; BENTO, A. C.; ASTRATH, N. G. C.; BAESSO, M. L. Photosensitizer and light diffusion through dentin in photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 18, 2013.

e. SOUSDALEFF, M.; BAESSO, M. L; MEDINA, A. N.; NOGUEIRA, A. C.; MARCOLINO, V. A.; MATIOLI, G. Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 955–965, 2013.

f. VILLA NOVA M.; GONÇALVES, M. C. P.; NOGUEIRA, A. C., HERCULANO, L. S. MEDINA, A. N; BAZOTTE, R. B. BRUSCHI, M.L. Formulation and characterization of ethylcellulose microparticles containing. l-alanyl-l-glutamine peptide. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 40, p. 1308-1317, 2013.

# ANEXOS



Nº 0069.0.093.000-11

PARECER Nº 035/2012

<b>Pesquisador(a) Responsável:</b> Graciette Matioli	
<b>Centro/Departamento:</b> CCS / Departamento de Farmácia	
<b>Título do projeto:</b> “Avaliação da complexação da papaína com ciclodextrina e elaboração de curativo não adesivo para debridamento, cicatrização e absorção de odor de úlceras de pressão”	
<p><b>Considerações:</b></p> <p>Trata-se de protocolo de pesquisa de área temática II, fase II, com o objetivo de “preparar e analisar os complexos de inclusão das ciclodextrinas (CDs) com a papaína por análises térmicas e espectroscopia fotoacústica e elaborar um curativo não adesivo para debridamento e cicatrização das úlceras de pressão, bem como absorção dos odores desagradáveis pelas CDs”.</p> <p>Trata-se de uma solicitação de emenda do protocolo acima citado com adição de mais um grupo de tratamento, no qual, a formulação terá adição do hormônio Insulina. A inclusão de tal hormônio se justifica pelo auto potencial anabólico do mesmo, o qual poderia facilitar a cicatrização das úlceras de pressão.</p> <p>Dessa forma, os grupos a serem pesquisados receberão três formulações a saber:</p> <p>Formulação A - pomada com insulina;</p> <p>Formulação B - pomada sem insulina (controle);</p> <p>Formulação C - pomada com complexo HPβCD-I.</p> <p>Considerando que os protocolos de aplicação e os sujeitos são os mesmos e esses já foram aprovados por esse comitê com parecer favorável (nº 133/2011) e considerando a apreciação do protocolo à luz da normativa ética vigente, este comitê de ética em pesquisa se manifesta por aprovar o protocolo na forma em que ora se apresenta.</p>	
<b>Situação:</b> EMENDA APROVADA	
<b>CONEP:</b> ( X ) para registro ( ) para análise e parecer <b>Data:</b> 17/09/2012.	
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 246ª reunião do COPEP em 17/09/2012.	<p>Profa. Dra. Ieda Harumi Higarashi <b>Presidente do COPEP</b></p>



Solicitação nº 72/2013

Requerente/Proponente: Sólstenes Rosa Valentini

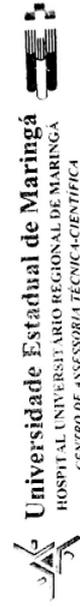
Solicitação de Emenda: Emenda do Projeto: "Avaliação da complexação da papoína com ciclodextrina e elaboração de curativo não adesivo para debridamento, cicatrização e absorção de úlceras de COPEP nº 09/2011, adesivo para debridamento, cicatrização e absorção de odor de úlceras de pressão".

Docente Orientador: Graciete Mattoli

PARECER FAVORÁVEL  SIM ( ) NÃO

*Graciete Mattoli*  
 Prof.ª Dr.ª Magda Lúcia F. de Oliveira  
 Assinatura e Carimbo  
 Superintendente

A solicitação está encaminhada a COREA e a Superintendente do H.U.M. e autorizada. O caso inicial está encaminhado à aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. Será realizado após aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. A solicitação está encaminhada à aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. Será realizado após aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. A solicitação está encaminhada à aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. Será realizado após aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14.



Solicitação nº 009/2011-ATC

Encaminhamos ao Diretor Superintendente para ciência e deliberação quanto ao solicitado

Requerente/Proponente: Sólstenes Rosa Valentini

Projeto de Pesquisa: "Avaliação da complexação da papoína com ciclodextrinas e elaboração de curativo não adesivo para debridamento, cicatrização e absorção de úlceras de pressão".

Docente Orientador: Graciete Mattoli

PARECER FAVORÁVEL  SIM ( ) NÃO

*Graciete Mattoli*  
 Prof.ª Dr.ª Magda Lúcia F. de Oliveira  
 Assinatura e Carimbo  
 Superintendente

A solicitação está encaminhada a COREA e a Superintendente do H.U.M. e autorizada. O caso inicial está encaminhado à aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. Será realizado após aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. A solicitação está encaminhada à aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14. Será realizado após aprovação do Comitê Permanente de F.O. - F.O. nº 14.

## Bibliografia

- [1] ROCHA, J. A.; MIRANDA, M. J.; ANDRADE, M. J. Abordagem terapêutica das úlceras de pressão - Intervenções baseadas na evidência. *Acta Médica Portuguesa*, v. 19, p. 29-38, 2006.
- [2] RAJU, D.; SU, X.; PATRICIAN, P. A.; LOAN, L. A.; MCCARTHY, M. S. Exploring factors associated with pressure ulcers: A data mining approach. *International Journal of Nursing Studies*, v. 52, p. 102-11, 2015.
- [3] WADA, A.; TEIXEIRA NETO, N.; FERREIRA M. C. Úlceras por pressão. *Revista Médica (São Paulo)*, v. 89, p. 170-177, 2010.
- [4] LOURO, M.; FERREIRA, M.; PÓVOA, P. Avaliação de protocolo de prevenção e tratamento de úlceras de pressão. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 19, p. 337-341, 2007.
- [5] PALFREYMAN, S. J.; STONE, P. W. A systematic review of economic evaluations assessing interventions aimed at preventing or treating pressure ulcers. *International Journal of Nursing Studies*, v. 52, p. 769-788, 2015.
- [6] REDDY, M.; GILL, S. S.; ROCHON, P. A. Preventing Pressure Ulcers: A Systematic Review. *Journal of the American Medical Association*, v. 296, p. 974-984, 2006.
- [7] MALLAH, Z.; NASSAR, N.; BADR, L. K. The effectiveness of a pressure ulcer intervention program on the prevalence of hospital acquired pressure ulcers: controlled before and after study. *Applied Nursing Research*, 2014.
- [8] PAPANIKOLAOU, P.; LYNE, P.; ANTHONY, D. Risk assessment scales for pressure ulcers: A methodological review. *International Journal of Nursing Studies*, v. 44, p. 285-296, 2007.
- [9] TUVDENDORJ, D.; ZHANG, X. J.; CHINKES, D. L.; AARSLAND, A.; KULP, G. A.; JESCHKE, M. G.; DAVID N.; HERNDON, D. N. Intensive insulin treatment increases donor site wound protein synthesis in burn patients. *Surgery*, v. 149, p. 512-518, 2011.
- [10] ZHANG X. J.; CHINKES D. L.; RAMANUJAM V. M. S.; WOLFE, R. R. Local injection of insulin-zinc stimulates DNA synthesis in skin donor site wound. *Wound Repair Regeneration*, v. 15, p. 258-265, 2007.

- [11] ZHANG, X. J.; WU, X.; WOLF, S. E. ; HAWKINS, H. K.; CHINKES, D. L.; WOLFE, R. R. Local Insulin-Zinc injection accelerates skin donor site wound healing. *Journal of Surgical Research*, v. 142, p. 90–96, 2007.
- [12] HRYNYK, M.; MARTINS-GREEN, M.; BARRON, A. E.; NEUFELD, R. J.; Sustained prolonged topical delivery of bioactive human insulin for potential treatment of cutaneous wounds. *International Journal Pharmaceutics*, v. 398, p.146-154, 2010.
- [13] LIU, Y.; PETREACA, M.; YAO, M.; MARTINS-GREEN, M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *Biomed Central Cell Biology*, v. 10, p. 1471-2121, 2009.
- [14] XIE, Z.; PARAS, C.B.; WENG, H.; PUNNAKITIKASHEM, P.; SU, L. C.; VU, K.; TANG, L.; YANG J.; NGUYEN K. T. Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomaterial*, vol. 7, p. 1-9, 2013.
- [15] SAJEESH, S.; SHARMA, C. P. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal Pharmaceutics*. v. 325, p. 147-154 , 2006.
- [16] CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p. 1-9, 2007.
- [17] MANGOLIM, C. S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; SATO, F.; BAESSO, M. L.; MEDINA, A. N.; MATIOLI, G. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FTIR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chemistry*, v. 153, p. 361–370, 2014.
- [18] MARCOLINO, V. A.; ZANIN, G. M.; DURRANT, L. R.; BENASSI, M. T. MATIOLI, G. Interaction of curcumin and bixin with  $\beta$ -cyclodextrin: complexation methods, stability, and applications in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 3348–3357, 2011.
- [19] SOUSDALEFF, M.; BAESSO, M. L; MEDINA, A. N.; NOGUEIRA, A. C.; MARCOLINO, V. A.; MATIOLI, G. Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p.955–965, 2013.
- [20] TOBAR, E. L.; BLANCH, G.P.; RUIZ DEL CASTILLO, M.L.; SANCHEZ-CORTES, S. Encapsulation and isomerization of curcumin with cyclodextrins characterized by electronic and vibrational spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 62, p. 292-298, 2012.

- [21] WILLIAMS, R.O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46,355-360, 1998.
- [22] DEL VALLE, M. M. Cyclodextrins and their uses, a review. *Process Biochemistry. Barking*, v. 39, 1033-1046, 2004.
- [23] MANGOLIM, C. S. Complexo de inclusão curcumina-  $\beta$ -ciclodextrina: estabilidade, solubilidade, e caracterização por FTIR, FT-Raman, difração de raios-X e espectroscopia fotoacústica. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- [24] EPUAP: European Pressure Ulcer Advisory Panel and National Pressure Ulcer Advisory Panel. Treatment of pressure ulcers. Washington DC: NPUAP National Pressure Ulcer Advisory Panel; 2009. Disponível em; <<http://www.epuap.org/guidelines/>>. Acessado em 10/01/2015.
- [25] SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. Brunner &Suddarth tratado de enfermagem médico-cirúrgica. 9ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1034 p. v. 2.
- [26] AUSTRALIAN WOUND MANAGEMENT ASSOCIATION. *Clinical Practice Guidelines for the Prediction and Prevention of Pressure Ulcers*. Australian: Cambridge, 2001. 56 p.
- [27] CAMPBELL, C.; PARISH, L.C. The decubitus ulcer: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, v.28, p. 527-532, 2010.
- [28] FIGUEIREDO, N. M. A. *Práticas de enfermagem: ensinado a cuidar de clientes em situações clínicas e cirúrgicas*. 6ª Edição. São Caetano do Sull: Difusão enfermagem, 2003. 487 p.
- [29] COSTA, M. P.; STURTZ, G.; COSTA, F. P. P.; FERREIRA, M. C.; BARROS FILHO, T. E. P. Epidemiologia e tratamento das úlceras de pressão: experiência de 77 casos. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 13, p. 124-133, 2005.
- [30] LONDON HEALTH SCIENCE CENTRE. London Ontario, Canadá, 2013. Disponível em<[http://www.lhsc.on.ca/Health\\_Professionals/Wound\\_Care/pressure.htm](http://www.lhsc.on.ca/Health_Professionals/Wound_Care/pressure.htm)>. Acessado em 11/01/2015
- [31] ZENG, G.; SHOU, J. J.; LI, K. K.; ZHANG, Y. H. In-situ confocal Raman observation of structural changes of insulin crystals in sequential dehydration process. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1814, p. 1631-1640, 2011.

- [32] ZHANG, L.; ZHU, W.; SONG, L.; WANG, Y.; JIANG, H.; XIAN, S.; REN, Y. Effects of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on in vitro insulin stability. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p. 2031-2040, 2009.
- [33] NELSON, D. L.; COX, M. ; Princípios de bioquímica de Lehninger. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1273p.
- [34] DEVLIN, T. M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 5ª Edição, São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 2003. 1296 p.
- [35] VOET, D.; VOET, J. G. ; PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264 p.
- [36] CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Biochemistry*. 6ª Edição. Canadá: Thomson Brooks/Cole, 2009. 751 p.
- [37] BETTELHEIM, F. A.; BROWN, W. H.; CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Introduction to Organic and Biochemistry*. 7ª Edição. Canadá: Brooks/Cole Cengage Learning, 2010. 570. p.
- [38] ORTIZ, C.; ZHANG, D.; XIE, Y.; JO DAVISSON, V.; AMOTZ, D. B. Identification of insulin variants using Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 332, p. 245-252, 2004.
- [39] IRIE, T.; UEKAMA, K. Cyclodextrin in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, p. 101-123, 1999.
- [40] FERNANDES, V. C.; DENADAI, A. M. L.; MILLÁN, R. D. S.; ALVES R. J.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Physico-chemical characterization of insulin:dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin and insulin:hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes and evaluation of the kind of complexes on the biodegradable microspheres preparation. *Brazilian Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 43, p.543-553, 2007.
- [41] DOTSIKAS, Y.; LOUKAS, Y. L. Kinetic degradation study insulin complexed with methyl-beta cyclodextrin. Conformation of complexation with electrospray mass spectrometry and  $^1\text{H}$  NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.29, p. 487-494, 2002.
- [42] AACHAMANN, F. L.; OTZEN, D. E.; LARSEN, K.L.; WIMMER, R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Engineering*, v.16, p. 905-912, 2003.
- [43] BRITO, A. F. O. Análise estrutural de ciclodextrina: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 882-888, 2004.
- [44] CHERNYKH, E. V.; BRICHKIN, S. B. Supramolecular complexes based on cyclodextrins. *High Energy Chemistry*, v. 44, n. 2, 83-98, 2010.

- [45] CHEN, M.; DIAO G.; ZHANG E. Study of inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and nitrobenzene. *Chemosphere*, v. 63, p. 522-529, 2006.
- [46] STELLA, J.V, RAJEWSKI, R.A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 14, 556-567, 1997.
- [47] VYAS, A; SARAF, S. Ciclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomenal Macrocyclic Chemistry*, v. 62, p. 23-42, 2008.
- [48] ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J. C.; R. RIAL-OTERO; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 1631–1640, 2009.
- [49] SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, v.76, 1825-1845, 2004.
- [50] DOUDZIUK, H.; BIELEJEWSKA, A.; SCHILF W.; UEDA, H. Complexation of paracyclophane with  $\beta$ - and  $\alpha$ -cyclodextrins studied by HPLC and NMR. *Central European Journal of Chemistry*, v. 9, p. 1056-1061, 2011.
- [51] MARTÍNEZ, A.; MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G. Cyclodextrin-based multivalent glycodisplays: covalent and supramolecular conjugates to assess carbohydrate–protein interactions. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 4746-4773, 2013.
- [52] UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, p. 900-915, 2004.
- [53] DE ROSA, G.; LAROBINA, D.; LA ROTONDA, M. I.; MUSTO, P.; QUAGLIA, F.; UNGARO, F. How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microsphere: the case of insulin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin system. *Journal of Controlled Release*, v. 102, p. 71-83, 2005.
- [54] MATIOLI, G. MORAES, F. F.; ZANIN, G, M. *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica, e produtos gerais*. Maringa: Eduem, 2000. 24 p.
- [55] SZENTE, L.; SZEJTLI J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 137-142, 2004.
- [56] TOBAR, E. L.; BLANCHB, G.P.; DEL CASTILLO M.L.R.; CORTES, S. S. Encapsulation and isomerization of curcumin with cyclodextrins characterized by electronic and vibrational spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 62, p. 292-298, 2012.
- [57] AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; MALANI, N.; ICHIKAWA, H. Curcumin: the indian solid gold. In: AGGARWAL, B. B.; SURH, Y. J.; SHISHODIA, S. *The molecular*

- targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease: advances in experimental medicine and biology*. New York: Springer, 2007. p. 1-75.
- [58] BASNET, P.; BASNET, N. S. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, v. 16, p. 4567-4598, 2011.
- [59] GOINDI, S.; MANN, K.; AGGARWAL, N. Gastro-retentive floating beads of curcumin- $\beta$ -cyclodextrin complex to treat stomach tumors. *Alternative Medicine Studies*, v. 1, p. 49-53, 2011.
- [60] GRIFFITHS, D. J. *Introduction to Quantum Mechanics*. United States of America: Prentice Hall, 1995. 394 p.
- [61] SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. 2ª edição. São Paulo: Unesp, 2008. 276 p.
- [62] DE OLIVEIRA, G. M. *Simetria de moléculas e cristais: Fundamentos da espectroscopia vibracional*. Porto Alegre: Bookman, 2009. 269 p.
- [63] ATKINS, P.; DE PAULA, J. *Físico-Química*. 7ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 593 p. v. 2.
- [64] CHANG, R. *Basic principles of spectroscopy*. Japan: International student edition, 1971. 304 p.
- [65] SCHRADER, B. *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and applications*. Weinheim (Federal Republic of Germany): VCH, 1995. 787 p.
- [66] FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN C. W. *Introductory Raman spectroscopy*. Elsevier. 2003. 434 p.
- [67] STUART, B. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley, 2004. 203 p.
- [68] BROWN, J. M. *Molecular spectroscopy*. New York: Oxford University Press, 1998. 89 p.
- [69] WOODWARD, L. A. Vibrational rules of selection and polarization: Their practical uses and limitations. In: Szymanski, H. A. (Eds.). *Raman spectroscopy: Theory and practice*. New York-London: Plenum Press, 1970.
- [70] WEN, Z-Q. Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 96, n. 11, p. 2861-2878, 2007.
- [71] DIAS, J. C. T. *Espectroscopia molecular: fundamentos, métodos e aplicações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. 162 p.

- [72] WOODWARD, L. A. *Introduction to the theory of molecular vibrations and vibrational spectroscopy*. Oxford: Oxford University Press, 1972. 370 p.
- [73] NORMAN, S. The historical development of experimental techniques in vibrational spectroscopy. In: CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS P.R. (Ed(s)). *Handbook of vibrational spectroscopy: theory and instrumentation*. John Wiley, 2002. p. 1-32
- [74] VALENTINI, S. R.; NOGUEIRA, A. C; FENELON, V. C.; SATO, F. MEDINA, A. N.; SANTANA, R. G.; BAESSO, M. L; MATIOLI, G. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.490, p. 229–239, 2015.
- [75] MOHAN, P. R. K.; SREELAKSHMI, G.; MURALEEDHARAN C.V.; ROY JOSEPH. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 62, p. 77-84, 2012.
- [76] YALLAPU, M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C.  $\beta$ -Cyclodextrin–curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 113–125, 2010.
- [77] MORAES, G.R. Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de *Caesalpinia peltophoroides Benth.* em feridas cutâneas e das mudanças estruturais de tecidos do pulmão infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Física. Universidade Estadual de Maringá, 2012.
- [78] LI, W.; LU, B.; CHEN, F.; YANG, F.; WANG, Z. Host-guest complex of cypermethrin with  $\beta$  -cyclodextrin: A spectroscopy and theoretical investigation. *Journal of Molecular Structure*, v. 990, p. 244–252, 2011.
- [79] LI, W.; LU, B.; CHEN, F.; YANG, F.; WANG, Z. Spectroscopic and theoretical study on inclusion complexation of beta-cyclodextrin with permethrin. *Journal of Molecular Structure*, v. 981, p. 194-203, 2010.
- [80] EGYED, O. Spectroscopy studies on  $\beta$ -cyclodextrin. *Vibrational Spectroscopy*, v.1, p. 225-227, 1990.
- [81] LINDE, G. A.; LAVERDE JUNIOR, A.; FARIA, E. V.; COLAUTO, N. B.; MORAES. F. F.; ZANIN G. M. The use of 2D NMR to study  $\beta$ -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. *Food Research International*, v. 43, p.187-192, 2010.
- [82] KOLEV, T. M.; VELCHEVA, E. A.; STAMBOLIYSKA, B. A.; SPITELLER, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumina. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 102, p. 1069–1079, 2005.

- [83] TANG, B.; MA, L.; YOUWANG, H.; G.YINGZHANG, G. Study on the supramolecular interaction of curcumin and  $\beta$ -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p. 1355–1361, 2002.
- [84] CRIVELLO, J. V.; BULUT, U. Curcumin: A naturally occurring long-wavelength photosensitizer for diaryliodonium salts. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 43, p. 5217–5231, 2005.
- [85] MOYANO, J. R.; M. J. ARIAS-BLANCO; GINÉS, J. M. GIORDANO, F. Solid-state characterization and dissolution characteristics of gliclazide-fl-cyclodextrin inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.148, p. 211-217, 1997.
- [86] RECHMAN, I.; MOVASAGHI, Z.; RECHAMAN, S. *Vibrational spectroscopy for tissues analysis*. CRC Press, 2013. 303 p.
- [87] DE OLIVEIRA, L. F. C. *Espectroscopia molecular. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 1, p. 1-30, 2001.
- [88] SYMON, K. R. *Mecânica*. Rio de Janeiro: Campus, 1996. 685 p.