



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Estudo da complexação da fisetina com ciclodextrinas”

Mariana Rizzi Guzzo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Estudo da complexação da fisetina com ciclodextrinas”

Mariana Rizzi Guzzo

Profa. Dra. Laura Tiemi Okano

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

Guzzo, Mariana Rizzi

Estudo da Complexação da Fisetina com Ciclodextrinas,
2007.

142 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de
concentração: Química.

Orientador: Okano, Laura Tiemi.

1. Flavonóides. 2. Ciclodextrinas. 3. Transferência de
Próton no Estado Excitado.

Navegue

(Fernando Pessoa)

Navegue, descubra tesouros, mas não os tire do fundo do mar, o lugar deles é lá.

Admire a lua, sonhe com ela, mas não queira trazê-la para a terra.

Curta o sol, se deixe acariciar por ele, mas lembre-se que o seu calor é para todos.

Sonhe com as estrelas, apenas sonhe, elas só podem brilhar no céu.

Não tente deter o vento, ele precisa correr por toda parte, ele tem pressa de chegar
sabe-se lá onde.

Não apare a chuva, ela quer cair e molhar muitos rostos, não pode molhar só o seu.

As lágrimas? Não as seque, elas precisam correr na minha, na sua, em todas as faces.

O sorriso! Esse você deve segurar, não deixe-o ir embora, agarre-o!

Quem você ama? Guarde dentro de um porta jóias, tranque, perca a chave!

Quem você ama é a maior jóia que você possui, a mais valiosa.

Não importa se a estação do ano muda, se o século vira e se o milênio é outro, se a idade aumenta; conserve a vontade de viver, não se chega à parte alguma sem ela.

Abra todas as janelas que encontrar e as portas também.

Persiga um sonho, mas não deixe ele viver sozinho.

Alimente sua alma com amor, cure suas feridas com carinho.

Descubra-se todos os dias, deixe-se levar pelas vontades, mas não enlouqueça por elas.

Procure, sempre procure o fim de uma história, seja ela qual for.

Dê um sorriso para quem esqueceu como se faz isso.

Acelere seus pensamentos, mas não permita que eles te consumam.

Olhe para o lado, alguém precisa de você.

Abasteça seu coração de fé, não a perca nunca.

Mergulhe de cabeça nos seus desejos e satisfaça-os.

Agonize de dor por um amigo, só saia dessa agonia se conseguir tirá-lo também.

Procure os seus caminhos, mas não magoe ninguém nessa procura.

Arrependa-se, volte atrás, peça perdão!

Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar necessário.

Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue nelas.

Se achar que precisa voltar, volte!

Se perceber que precisa seguir, siga!

Se estiver tudo errado, comece novamente.

Se estiver tudo certo, continue.

Se sentir saudades, mate-a.

Se perder um amor, não se perca!

Se achá-lo, segure-o!

"Circunda-te de rosas, ama, bebe e cala. O mais é nada".

Dedico este trabalho à minha família.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa (Ricardo Reis)

Agradecimentos

Aos meus pais, *Eliana e Fábio (in memorian)*, e à minha irmã *Carolina*, a quem devo tudo o que sou. Muito obrigada pelo amor incondicional, compreensão, dedicação, respeito, apoio e incentivos dispensados durante toda minha vida.

À Deus, pela oportunidade de concluir mais uma etapa dessa breve passagem.

À Prof. Dra *Laura Tiemi Okano* pela orientação, projetos, oportunidades, ensinamentos pessoais e profissionais, apoio, amizade e atenção dedicados durante todos os cinco anos de trabalho. Obrigada por todos os seus puxões de orelha.

À Profa. Dra. *Sofia Nikolaou* pela enorme contribuição ao trabalho, ensinamentos e por disponibilizar seu laboratório e reagentes. Obrigada pelas longas conversas.

Ao Prof. Dr. *Antonio Eduardo da Hora Machado* pelos extraordinários cálculos teóricos e gentil convite de uma semana em Uberlândia para me ensinar modelagem molecular. Obrigada pela paciência.

Ao Prof. Dr. *Antônio Cláudio Tedesco* pelo convívio no laboratório, aprendizados e por emprestar seus equipamentos.

Aos Prof. Dr. *Amando Siuiti Ito* e Prof. Dr. *Richard John Ward* pela disponibilidade de seus equipamentos.

À técnica *Mercia Virginia Carlos* pela ajuda dispensada nas medidas de HPLC da quercetina.

À todos os funcionários do Departamento de Química por toda a ajuda e boa-vontade.

*“Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.
E o que importa não é o que você tem na vida,
mas quem você tem na vida.
E que bons amigos são a família
que nos permitiram escolher.”
(Aprendendo a Viver - William Shakespeare)*

À *Suzie*, pelas longas tardes de companhia.

Ao *Rômulo Zorzo Cruz*, por tornar minha vida mais feliz.

Aos meus avós, *Fábio* e *Nayr*, às minhas tias e aos meus primos, por fazerem parte da minha família, pelas alegrias, união, amor e incentivo.

Aos meus amigos irmãos *Cidelmara Helena Coelho*, *Cristina Amaro Silvério* e *Emmanuel Zimmermann Moreira*. Não tenho palavras para expressar a imensa gratidão que tenho por vocês... por todas as risadas, alegrias, desafios, tristezas e sonhos vividos juntos.

À minhas queridas amigas *Ana Cecília Bulhões Figueira*, *Ana Paula Ramos*, *Glasiela Lemos Anconi* e *Tatiana Stedile Minorin* por trazerem alegria e companheirismo aos nossos almoços.

À *Olimpia Paschoal Martins* pela especial amizade, carinho, conselhos e auxílio nos experimentos.

Aos amigos do laboratório *Jacques Miranda*, *Daniel de Oliveira*, *Jean Balan*, *Daniela Manfrim*, *Patrícia Macaroff*, *Daniela Maranhão*, *Alessandra Pelegrino*, *Renata de Lima*, *Vânia de Paoli* e *Fernando Primo*, por toda a amizade, discussões e incentivos.

Às minhas amigas *Gabriela Saliby*, *Priscila Cabau*, *Olívia Alonso*, *Helena de Guide*, *Lívia Rodrigues*, *Gabriela Wanderley*, *Raquel Lucas* e *Juliana Barcelos* pelos longos e adoráveis anos de convívio escolar.

À *Tatiana Lopes* e *Cássia* pela amizade, paciência e auxílio para realizar os experimentos de anisotropia e fluorescência resolvida no tempo.

À todos meus companheiros de trabalho no período de 2002 a 2007 (em especial: *Amanda, Andréia, Karina, Marcilene, Carolina, Adriana, Leandro, Ísis, Andreza, Simara, Claire, Jeane e Tadeu*).

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

"O homem não morre quando deixa de viver, mas sim quando deixa de amar."

(Charlie Chaplin)

ÍNDICE

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xix
Resumo.....	xx
Abstract.....	xxii
I INTRODUÇÃO	23
I.1 Flavonóides	23
I.2 Ciclodextrinas.....	29
I.3 As Técnicas Utilizadas	33
I.3.1 Absorção de Luz Ultravioleta-Visível.....	33
I.3.2 Indução de Dicroísmo Circular.....	34
I.3.3 Fluorescência estática	35
I.3.4 Fluorescência Resolvida no Tempo.....	38
I.3.5 Anisotropia Estática	39
I.3.6 Ressonância Magnética Nuclear	41
II OBJETIVOS	42
III PARTE EXPERIMENTAL.....	43
III.1 Materiais	43
III.1.1 Flavonóides:.....	43
III.1.2 Ciclodextrinas:	44
III.1.3 Outros Reagentes:.....	44
III.2 Equipamentos:.....	45
III.3 Métodos.....	46
III.3.1 Purificação da 7-hidroxiflavona	46
III.3.2 Preparação da Solução de Fisetina em Vários Solventes	47
III.3.3 Preparação dos Complexos Flavonóide-CD.....	47
III.3.4 Complexos de CD em Soluções Tamponadas	48
III.3.5 Soluções Básicas em D ₂ O para as Medidas de RMN de ¹ H.....	48

III.3.6	Determinação da Constante de Equilíbrio, K	49
III.3.7	Análise de Solubilidade da Fisetina nas CDs.....	50
III.3.8	Aplicação dos Métodos Mecânico-Quânticos	51
IV	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
IV.1	Cálculos Teóricos	53
IV.1.1	Transferência Intramolecular de Próton da Fisetina no Estado Excitado	53
IV.1.2	Formação do complexo entre a fisetina e a β -CD.....	54
IV.2	Estudo da Fisetina	60
IV.2.1	Medidas Espectroscópicas da Fisetina em Diversos Solventes	60
IV.2.2	Fluorescência Resolvida no Tempo da Fisetina em Diversos Solventes	76
IV.3	Estudo do Complexo de Inclusão Fisetina - β -CD	82
IV.3.1	Medidas Espectroscópicas dos Complexos	82
IV.3.2	Estudo da Solubilidade da Fisetina em CDs.....	90
IV.3.3	Anisotropia:.....	95
IV.3.4	Fluorescência Resolvida no Tempo da Fisetina em β -CD.....	98
IV.4	Estudo do Complexo de Inclusão Fisetina - γ -CD.....	101
IV.4.1	Medidas Espectroscópicas dos Complexos	101
IV.4.2	Estudo da Solubilidade da Fisetina em γ -CD.....	109
IV.4.3	Anisotropia.....	114
IV.5	RMN de ^1H da Fisetina e dos Complexos Fisetina - β - e γ -CDs	117
IV.6	Estudo da 7-Hidroxi flavona.....	122
IV.6.1	Medidas Espectroscópicas da 7-HF em Diferentes pHs.....	122
V	CONCLUSÃO.....	135
VI	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplos de um flavonóide bicíclico e um flavonóide tricíclico.....	24
Figura 2.	Estrutura da fisetina e reação de transferência de próton intramolecular durante o tempo de vida do estado excitado formando mais uma espécie fluorescente, tautômero (T*) (WOLFBEIS, KNIERZINGER & SCHIPFER, 1983).....	26
Figura 3.	Reação de ESIPT na 3-HF e seus derivados. Para a fisetina R = OH. (Sengupta & Kasha, 1979; Kasha, 1986).....	27
Figura 4.	Estrutura da β -CD, contendo sete unidades de D-glicose.....	29
Figura 5.	Estrutura esquemática da CD, sendo Di o diâmetro interno e De o diâmetro externo.	30
Figura 6.	Diagrama de Jablonski (F = emissão de fluorescência, P = emissão de fosforescência, ISC = cruzamento entre sistemas, CI = conversões internas, RV = processos de relaxação vibracional, S ₀ = estado fundamental, S _i = estado singlete, T _i = estado excitado tripleto, Re = reações a partir do estado excitado). (TURRO, 1991).....	36
Figura 7.	Curvas de energia potencial relativas ao processo de absorção em termos do princípio de Franck-Condon (McMILLIN, 1978).....	37
Figura 8.	Densidade eletrônica da fisetina (A) e cargas de Mulliken (B).	54
Figura 9.	Dados da aplicação do modelo semi-empírico SAM1 no estudo da incorporação da fisetina em β -CD através do anel fenila.....	56
Figura 10.	Dados da aplicação do modelo semi-empírico SAM1 no estudo da incorporação da fisetina em β -CD através da parte cromona (A) duas ligações de hidrogênio e (B) uma única ligação de hidrogênio.....	57
Figura 11.	Dados de modelo semi-empírico SAM1 da incorporação da fisetina desprotonada em β -CD através do anel fenila. (A) vista superior (B) visão lateral.....	58

Figura 12.	Espectros de absorção da fisetina em diversos solventes, próticos (A) e apróticos (B)	61
Figura 13.	Espectro normalizado de emissão da fisetina, 20 $\mu\text{mol/L}$, em diferentes solventes, com $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$.	66
Figura 14.	Espectro de emissão de fluorescência da fisetina em glicerol, variando-se o comprimento de onda de excitação.	66
Figura 15.	Mecanismo proposto para a transferência de próton da fisetina no estado excitado em (1) metanol e (2) solventes de hidrocarbonetos. A abreviatura usada indica os seguintes processos envolvidos: a = absorção, rs = reorientação do solvente, t = tautomerização. (WOOLFE & THISTLETHWAITE, 1981).	70
Figura 16.	Gráficos da (A) área de fluorescência da fisetina e da (B) área de fluorescência sobre a absorção normalizada em 360 nm da fisetina versus a polarizabilidade do solvente.	73
Figura 17.	Gráfico da área de fluorescência da banda 3 sobre a da banda 2 da fisetina versus a polarizabilidade do solvente.	74
Figura 18.	Gráfico da área de fluorescência da fisetina versus a viscosidade do solvente, (viscosidade = m(Pa.s)).	75
Figura 19.	Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina 25 μM em solução aquosa. (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul, a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000. O ajuste dos dados experimentais deste gráfico desconsiderou os primeiros pontos.	77
Figura 20.	Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina 25 μM em solução aquosa. (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul, a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000. O ajuste dos dados experimentais foi feito considerando todos os pontos experimentais.	78

Figura 21.	Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina 25 μM em metanol. (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul, a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000.	79
Figura 22.	Espectros de absorção UV-Vis da fisetina 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\beta\text{-CD}$ em pHs 4,3 (A) e 11,5 (B).	83
Figura 23.	Espectro de emissão de fluorescência da fisetina 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\beta\text{-CD}$ em pHs (A) neutro e (B) 11,5, com $\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$	84
Figura 24.	(A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da fisetina protonada em função da concentração de $\beta\text{-CD}$, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand para ajuste dos pontos experimentais. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$	87
Figura 25.	Espectro de dicroísmo circular da fisetina protonada nas concentrações 5 $\mu\text{mol/L}$ em solução aquosa (preto) e 50 $\mu\text{mol/L}$ na presença de $\beta\text{-CD}$ 12 mmol/L (vermelho).	89
Figura 26.	Diagrama de solubilidade da fisetina em $\beta\text{-CD}$ a (A) 15, (B) 25, (C) 35 e (D) 45 $^{\circ}\text{C}$, analisadas no comprimento de onda de 360 nm.	91
Figura 27.	Gráfico de Van't Hoff, a 25 $^{\circ}\text{C}$, no comprimento de onda de 360 nm, para o complexo fisetina- $\beta\text{-CD}$	93
Figura 28.	Gráficos de anisotropia da fisetina em função da concentração de $\beta\text{-CD}$ em pH (A) 4,4 e (B) 11,4.	96
Figura 29.	Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina 25 μM em solução aquosa de $\beta\text{-CD}$ 12 mM . (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000.	99
Figura 30.	Espectro de absorção no UV-Vis da fisetina 5 $\mu\text{mol/L}$ em $\gamma\text{-CD}$ 10 mM em pHs neutro, básico e neutro.	101

Figura 31.	Espectros de emissão de fluorescência da fisetina 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\gamma\text{-CD}$ em pHs neutro (A) e 11,5 (B), com $\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$	102
Figura 32.	(A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da fisetina desprotonada em função da concentração de $\gamma\text{-CD}$, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\gamma\text{-CD}]^2$	105
Figura 33.	Espectro de dicroísmo circular da fisetina protonada nas concentrações 5 $\mu\text{mol/L}$ em solução aquosa (preto) e 50 $\mu\text{mol/L}$ na presença de $\gamma\text{-CD}$ 30 mmol/L (vermelho).	107
Figura 34.	Diagramas de solubilidade da fisetina em $\gamma\text{-CD}$ a (A) 15, (B) 25, (C) 35 e (D) 45 $^{\circ}\text{C}$, analisados no comprimento de onda de 360 nm.	110
Figura 35.	Gráfico de Van't Hoff, a 25 $^{\circ}\text{C}$, no comprimento de onda de 360 nm, para o complexo fisetina - $\gamma\text{-CD}$	112
Figura 36.	Gráficos de anisotropia da fisetina em função da concentração de $\gamma\text{-CD}$ em pH (A) 4,4 e (B) 11,4.	115
Figura 37.	Estrutura da 7-HF.	122
Figura 38.	Espectro de absorção da 7-HF, 15 μM , em diferentes pHs.....	123
Figura 39.	Gráficos da intensidade de absorção da 7-HF em função do pH (A) e da primeira e segunda derivadas do gráfico anterior (B).....	124
Figura 40.	Espectros de absorção UV-Vis da 7-HF 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\beta\text{-CD}$ em pHs 4,2 (A) e 9,4 (B).	126
Figura 41.	Espectros de emissão de fluorescência da 7-HF 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\beta\text{-CD}$ em (A) pH = 4,2, com $\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$ e em (B) pH = 9,4, com $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$	127
Figura 42.	Espectro de emissão de fluorescência da 7-HF 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\gamma\text{-CD}$ em (A) pH = 4,2, com $\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$ e em (B) pH = 9,4, com $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$	128

Figura 43. (A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da 7-HF protonada (pH 4,2) em função da concentração de β -CD, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$ 130

Figura 44. (A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da 7-HF desprotonada (pH 9,4) em função da concentração de β -CD, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$ 131

Figura 45. Espectro de dicroísmo circular da 7-HF nas concentrações 5 $\mu\text{mol/L}$ em solução aquosa (preto) e 50 $\mu\text{mol/L}$ na presença de β -CD 10 mmol/L (vermelho) em pHs (A) 4,2 e (B) 9,4. 133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades das CDs.....	30
Tabela 2 -	Parâmetros termodinâmicos para a complexação da fisetina com β -CD empregando o método semi-empírico SAM1	55
Tabela 3 -	Comprimentos máximos de absorção e emissão de fluorescência da fisetina em diversos solventes de acordo com sua constante dielétrica (D)	62
Tabela 4 -	Deconvolução das bandas da fisetina presentes no espectro de absorção de luz ultravioleta - visível.....	63
Tabela 5 -	Razão entre as áreas das bandas 3 e 2 de absorção da fisetina	64
Tabela 6 -	Comprimentos máximos de emissão de fluorescência da fisetina em diversos solventes de acordo com sua constante dielétrica (D)	67
Tabela 7 -	Componentes do tempo de vida no estado excitado da fisetina em diferentes solventes	76
Tabela 8 -	Componentes do tempo de vida no estado excitado da fisetina em diferentes solventes	76
Tabela 9 -	Valores de pKa de cada hidroxila da fisetina (JOVANOVIC et al., 1994)	82
Tabela 10 -	Constantes de inclusão dos complexos em diferentes pHs	88
Tabela 11 -	Média dos valores do coeficiente molar ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$), ϵ , da fisetina em água	90
Tabela 12 -	Valores de Kc (L/mol) para o complexo fisetina- β -CD em diferentes temperaturas.....	92
Tabela 13 -	Valores termodinâmicos para o complexo fisetina- β -CD.....	93
Tabela 14 -	Componentes do tempo de vida da fisetina e em presença de β -CD.....	98

Tabela 15 -	Constantes de inclusão dos complexos em diferentes pHs	106
Tabela 16 -	Valores de Kc para o complexo fisetina - γ -CD em diferentes temperaturas	111
Tabela 17 -	Valores termodinâmicos para o complexo fisetina - γ -CD	112
Tabela 18 -	Dados de RMN de ^1H , deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) da molécula fisetina em diferentes meios	117
Tabela 19 -	Dados de deslocamento químico δ (ppm) de RMN de ^1H para fisetina, β - e γ -CD e complexos de fisetina e β - (γ -) CD em soluções de $\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_{3(\text{g})}$	118
Tabela 20 -	Constantes de inclusão do complexo 7-HF - β -CD em diferentes pHs.....	132

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

3-HF	3-hidroxiflavona
7-HF	7-hidroxiflavona
μ	Momento de dipolo
τ	Tempo de vida
χ^2	Chi-quadrado
ΔG	Variação de energia livre
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
CD	Ciclodextrina
DC	Dicroísmo circular
ESIPT	Transferência intramolecular de próton no estado excitado
Fis	Fisetina
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
I	Intensidade de fluorescência
k	Constante de velocidade cinética
K	Constante de estabilidade, associação ou complexação
K _c	Constante de formação aparente
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
N	Espécie ou forma normal
r	Anisotropia
R ²	Coeficiente de correlação linear
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S ₀	Estado fundamental
S ₁	Estado excitado singlete
T	Espécie ou forma tautomérica
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Resumo

Neste trabalho de Mestrado, foram feitos estudos do comportamento fotofísico da fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona) em diversos solventes através de medidas de absorção de luz UV-Visível, fluorescência estática e resolvida no tempo e da interação entre a fisetina e a 7-hidroxiflavona com ciclodextrinas (β - e γ -) (CDs) através de experimentos de absorção de luz UV-Visível, sinal induzido de dicroísmo circular, fluorescência estática e resolvida no tempo, anisotropia de estado estacionário e RMN de ^1H , focando a dependência destas medidas em função da temperatura e do pH. Os resultados experimentais foram comparados com estudos mecânico-quânticos baseados no modelo semi-empírico SAM1 (AMPAC), e nos funcionais B3LYP e MPW1PW91, da Teoria do Funcional de Densidade, empregando os conjuntos de funções de base 6-311G* e 3-21G**.

Os estudos da fisetina em diferentes solventes próticos e apróticos mostraram que a fluorescência da sonda é fortemente dependente do solvente. Tornaram, também, evidente o complexo comportamento da fisetina nos diferentes meios devido a possibilidade de ocorrer os equilíbrios entre as suas estruturas normal, desprotonadas e tautômero formado pela transferência interna de próton no estado excitado.

Resultados experimentais indicam a formação de complexos de inclusão entre a fisetina e a β - e γ - CDs. A fisetina com β -CD forma complexo de estequiometria 1:1 nos meios neutro/ácido e básico, cujos valores de constante de complexação são 900 ± 100 e 240 ± 90 (L/mol), respectivamente. Os dados teóricos mostraram que a inclusão da fisetina na β -CD ocorre preferencialmente pelo anel fenila. O complexo com a γ -CD apresenta estequiometria de 1:1 em meio ácido/neutro e de 1:2 em meio básico, com constantes de complexação de 94 ± 30 e 130 ± 10 (L/mol), respectivamente.

Os estudos com a 7-hidroxiflavona revelaram que somente ocorre a formação de complexos com a β -CD de estequiometria 1:1 e não há dependência do pH. As constantes de complexação obtidas nos meios ácido/neutro e básico são similares,

1430 ± 510 e 1220 ± 165 L/mol, respectivamente, induzindo a conclusão que a inclusão desta molécula na β -CD é feita através do anel fenila.

Abstract

In this work, the photophysics of fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) in several solvents was studied through UV-vis absorption spectra, steady-state and time-resolved fluorescence measurements. The interaction between fisetin and 7-hydroxyflavone and cyclodextrins (β - e γ -) (CDs) was also investigated by UV-vis absorption spectra, induced signal of circular dichroism, steady-state and time-resolved fluorescence, steady-state anisotropy, and ^1H NMR, with dependence on pH and temperature. Some experimental data were compared with quantum-mechanics studies based on the SAM1 (AMPAC) semi-empirical model, as well as with the B3LYP and MPW1PW91 functional models from the Density Functional Theory using the 6-311G* and 3-21G* basis sets.

The study of the photophysics of fisetin in protic and aprotic solvents showed a complex behavior and a strong dependence on the solvent. The occurrence of many equilibria between the possible structures of fisetin, e.g. the normal, a few deprotonated ones, and the tautomer due to the excited state intramolecular proton transfer can be responsible for the complex analyses of these experimental data.

The spectroscopic measurements show that, at pH 4.0 and 6.5, the complex fisetin - β -CD is formed in a Fis: β -CD 1:1 stoichiometry and an equilibrium constant (K) of 900 ± 100 L/mol. In basic medium (pH 11.5), K decreases to 240 ± 90 L/mol. Molecular modeling points out that the inclusion complex is formed preferentially via entry of the fisetin phenyl group into β -CD. On the other hand, the fisetin - γ -CD has a stoichiometry of 1:1 in acid/neutral solutions and of 1:2 in basic conditions. The K values are 94 ± 30 e 130 ± 10 (L/mol), respectively.

The 7-hydroxyflavone can only form inclusion complexes with β -CD. The stoichiometry is 1:1 and there is no dependence on pH. Both equilibrium constants determined either in acid or basic medium is very similar to each other, 1430 ± 510 , and 1220 ± 165 L/mol, respectively. For this reason, we suppose that the inclusion of this compound into β -CD is also through the phenyl ring of the flavonoid.

I INTRODUÇÃO

1.1 Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos naturais amplamente encontrados em plantas superiores, frutas, sucos de frutas e vinhos. Um levantamento realizado em 1999 descreveu 6467 estruturas conhecidas de flavonóides (HARBORNE & BAXTER, 1999), sendo destas 4000 de origem natural (McPHAIL *et al.*, 2003).

Possuem diferentes estruturas químicas que têm em comum 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de dois anéis aromáticos e uma cadeia de três átomos de carbono entre elas, Figura 1. A classificação dos flavonóides é feita de acordo com as características químicas e biossintéticas, subdividindo-se nos grupos: Chalconas, Flavonóis, Flavonas, Dihidroflavonóides (Flavonas e Flavononóis), Antocianinas, Antocianidinas, Isoflavonóides, Auronas, Neoflavonóides, Biflavonóides, entre outros.

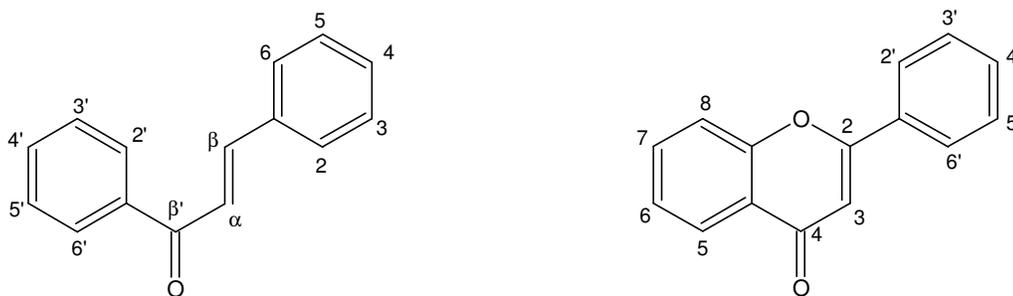


Figura 1. Exemplos de um flavonóide bicíclico e um flavonóide tricíclico.

Esta classe de compostos vem conquistando a atenção de vários setores industriais, como as áreas farmacêutica e alimentícia, justificando o crescente número de estudos e pesquisas. Foi comprovado que os flavonóides podem ser empregados como fármacos anticâncer, antitumor, antiinflamatório, anticoagulante, antialérgicos e antivirais, decorrente da natureza antioxidante destes compostos (FARKAS, GÁBOR & KÁLLAY, 1985; GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999; MUKAI *et al.*, 1997). A atividade quimopreventiva dos flavonóides é dependente de suas características estruturais, como o número de substituintes OH nos anéis A e B e a insaturação entre a ligação C2-C3 (Figura 1) (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Os estudos sobre a atividade antioxidante dos flavonóides mostram que estas moléculas bloqueiam o efeito danoso de várias espécies altamente oxidantes, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\cdot) ou radicais peroxi (HO_2^\cdot), e suprimem o oxigênio singlete. Este fato é decorrente do extenso sistema de elétrons π conjugados encontrados em sua estrutura molecular que permite a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; McPHAIL *et al.*, 2003). Esta atividade ocorre durante o vigoroso processo oxidativo na digestão (JOVANOVIC *et al.*, 1994).

Desta forma, é altamente recomendado uma dieta rica em flavonóides, através da ingestão de frutas, verduras, chás e vinhos tintos. O consumo regular de vinho tinto em algumas regiões francesas ficou conhecido como o “paradoxo francês”, onde o consumo alcoólico é contrabalanceado pelo baixíssimo índice de mortalidade por

doenças cardíacas, uma vez que os constituintes fenólicos auxiliam na prevenção dessas doenças (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

A presença praticamente universal dos flavonóides nas folhas verdes auxilia as plantas na resistência aos raios UV-B, visto que estes pigmentos absorvem na região de 280-315 nm e, então, são capazes de atuar como filtros UV. Além disso, protegem as plantas da invasão microbiana (HARBORNE & WILLIAMS, 2000) e contribuem para a estabilização da maioria das cores encontradas no reino vegetal. As antocianinas são os pigmentos responsáveis pela coloração azul, vermelha e roxa em muitas frutas, frutos e folhas; no entanto, são instáveis e altamente susceptíveis à degradação. A complexação com os flavonóides, fenômeno conhecido como copigmentação, permite que as antocianinas apresentem cores mais brilhantes, fortes e estáveis. (EIRO & HEINONEN, 2002)

A fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona), Figura 2, uma molécula representante dos flavonóides, possui proeminentes atuações biológicas devido a sua atividade antioxidante e sua ação inibidora da proteína quinase C. Esta última é uma proteína viral codificada indispensável para a maturação e processamento do vírus da AIDS tornando a fisetina um alvo viável na terapia anti-HIV (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999; SENGUPTA, BANERJEE & SENGUPTA, 2004). Este flavonóide também encontra aplicação na área espectroscópica como corante para uso em laser, devido ao seu comportamento de emissão dual de fluorescência (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999). Esta polihidroxiflavona é conhecida por ser bom emissor de fluorescência com um rendimento quântico de 0,2 em etanol a temperatura ambiente (FALKOVSKAIA, SENGUPTA & KASHA, 1998).

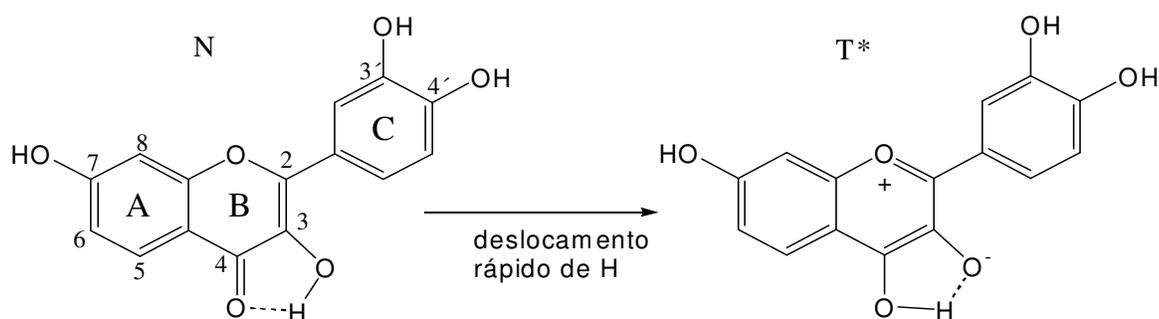


Figura 2. Estrutura da fisetina e reação de transferência de próton intramolecular durante o tempo de vida do estado excitado formando mais uma espécie fluorescente, tautômero (T^*) (WOLFBEIS, KNIERZINGER & SCHIPFER, 1983).

O comportamento de emissão de fluorescência da fisetina em meios de diferentes polaridades é comparado com a 3-hidroxi-flavona (3-HF) (SYTNIK, GORMIN & KASHA, 1994). Ambas as moléculas possuem no estado excitado singlete um momento de dipolo maior que no estado fundamental. Além disso, no estado excitado singlete, ambas podem sofrer uma transferência de próton intramolecular (ESIPT) a partir do grupo hidroxila na posição três para o oxigênio da carbonila (WOLFBEIS, KNIERZINGER & SCHIPFER, 1983), formando um tautômero, como mostrado na Figura 2. Observa-se este comportamento de emissão dual de fluorescência em solventes aceptores de ligações de hidrogênio (como 1,4-dioxano, acetato de etila e acetonitrila), bem como em solventes doadores e aceptores de ligações de hidrogênio (como metanol, etanol e 1-propanol) (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999).

São encontrados poucos os trabalhos que descrevem o comportamento fotofísico da fisetina, apesar do seu amplo interesse farmacológico. Em parte, isto se deve à semelhança de comportamento desta molécula com a 3-HF.

Sengupta e Kasha (1979) foram os primeiros a interpretar a fluorescência dual da 3-HF (ditas como emissão “azul” e “verde”) derivadas de um isômero normal (N) e de um tautômero (T^*), semelhante ao descrito na Figura 2. De acordo com estes autores, excitando-se a 3-HF, cuja estrutura molecular no estado fundamental é representada por N, ocorre uma reação adiabática de ESIPT que leva a formação do estado excitado T^* , apresentado na Figura 3.

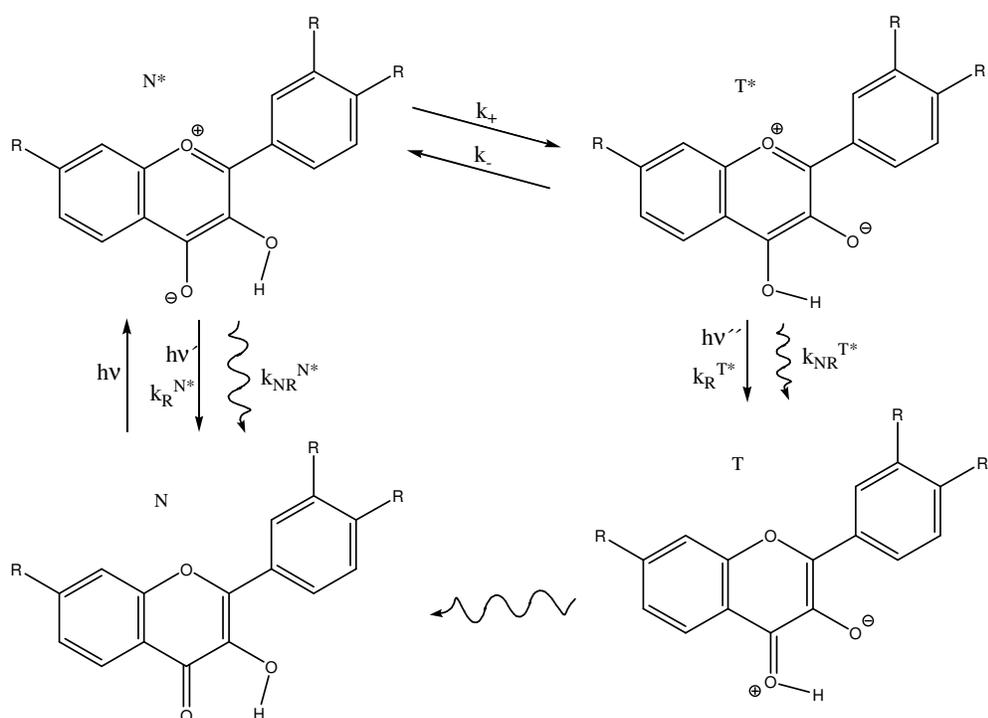


Figura 3. Reação de ES IPT na 3-HF e seus derivados. Para a fisetina $R = OH$. (Sengupta & Kasha, 1979; Kasha, 1986)

Neste modelo proposto de quatro níveis para explicar a ES IPT, a evolução dependente do tempo da forma normal inicialmente excitada (N^*) deve envolver a transição para o estado T^* com uma constante de velocidade k_+ juntamente com conversões radiativas e não-radiativas, $k_R^{N^*}$ e $k_{NR}^{N^*}$, respectivamente, para o estado fundamental N . O decaimento da forma tautomérica T^* , por sua vez, pode ser uma transição reversa para N^* com constante de velocidade k_- e/ou por conversões radiativas e não-radiativas para o estado fundamental T , com constantes de velocidade de $k_R^{T^*}$ e $k_{NR}^{T^*}$, respectivamente. (SHYINKAR *et al.*, 2003; SENGUPTA & KASHA, 1979; KASHA, 1986)

Estudos posteriores feitos por McMorro e Kasha (1983, 1984) concluíram que a ES IPT é muito rápida em solventes puros de hidrocarbonetos e que a fluorescência de N^* não poderia ser observada mesmo em matriz sólida. Experimentos de fluorescência e de absorção de transientes reativos resolvida no tempo na escala de femtossegundos mostraram que em solventes apróticos como metil ciclohexano e

acetonitrila, a reação de ESIPT poderia ser mais rápida do que 60 fs (AMEER-BEG *et al.*, 2001; SCHWARTZ, PETEANU & HARRIS, 1992).

Cogitaram-se várias estruturas para explicar as diferentes bandas de fluorescência da 3-HF em solventes hidroxílicos (MANDAL & SAMANTA, 2003). Strandjord e Bárbara (1985) estudando o comportamento da 3-HF em uma série de álcoois notaram uma correlação direta entre a constante de velocidade de transferência de próton lenta e a habilidade de doar ligações de hidrogênio do solvente. Encontraram também que a constante de velocidade do processo lento é independente da viscosidade do solvente. Assumiu-se a formação de um complexo 1:1 com as moléculas de álcoois (STRANDJORD & BARBARA, 1985). Sugeriram, posteriormente, que este sistema é governado preferencialmente por fatores energéticos do complexo soluto-solvente do que pela dinâmica de reorganização do solvente (STRANDJORD, SMITH & BARBARA, 1985). Mandal e Samanta (2003) mostraram que a banda de absorção da 3-HF em longo comprimento de onda em meio alcoólico é gerada pela forma aniônica da molécula no estado fundamental, derivada da desprotonação do grupo 3-hidroxílico mediada pelo solvente. White e colaboradores estudaram o efeito da pressão na ESIPT de polihidroxi flavonas, concluindo que, sob pressão, a fisetina tem o mesmo comportamento que a 3-HF (ZHU *et al.*, 2004).

A 7-hidroxi flavona, assim como a fisetina, possui propriedades luminescentes originais. Isto confere a molécula um grande potencial para sondar os microambientes de sistemas biológicos ou outros nos quais está presente (SENGUPTA & KASHA, 1979).

No entanto, estes flavonóides (fisetina e 7-hidroxi flavona) possuem baixa solubilidade em água. A complexação destes com ciclodextrinas aumenta sua aplicação industrial, pois pode melhorar sua solubilidade em meio aquoso.

1.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, produzidas a partir do amido e da celulose. As mais conhecidas (α -, β - e γ -CDs) são cristalinas, homogêneas e não higroscópicas, sendo constituídas por macrociclos de 6, 7 e 8 unidades de glucopiranosose, respectivamente. A estrutura tridimensional mais estável para estas CDs possui a forma de um toróide com as aberturas superior e inferior apontadas pelos grupos hidroxílicos secundário e primário, respectivamente. Possuem uma estrutura exterior hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica, cujo tamanho depende do número de unidades de D-glicose. A hidrofobicidade da cavidade interna é resultado de um ambiente rico em elétrons, em grande parte oriundos dos átomos de oxigênio glicosídico. (ATWOOD *et al.*, 1996)

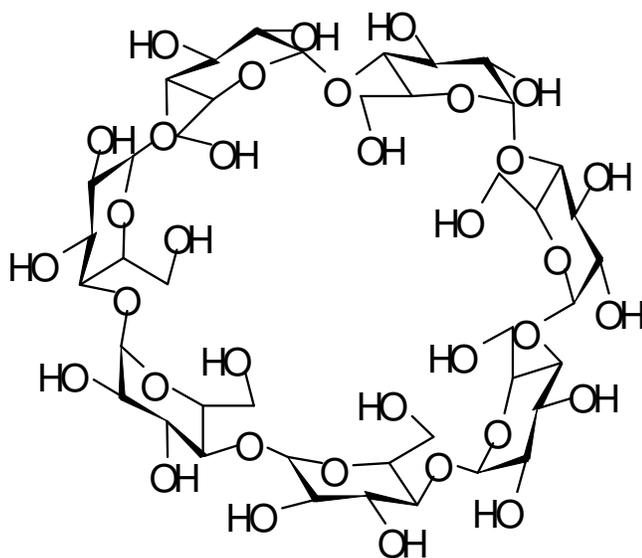


Figura 4. Estrutura da β -CD, contendo sete unidades de D-glicose.

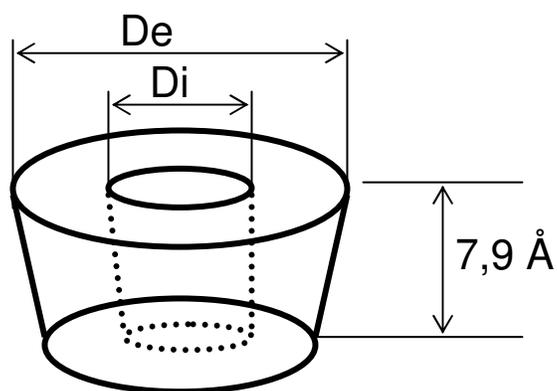


Figura 5. Estrutura esquemática da CD, sendo D_i o diâmetro interno e D_e o diâmetro externo.

Tabela 1 - Propriedades das CDs

Propriedade	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades glucopiranoses	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C (% p/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura da cavidade (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades das CDs α -, β - e γ -. Como o número de unidades glucopiranoses varia entre estas CDs nota-se uma variação do peso molecular, diâmetros interno e externo e volume. A única propriedade que não sofre alteração é a altura da cavidade. Baseado nessas dimensões, geralmente, a α -CD complexa com moléculas de baixo peso molecular, a β -CD forma complexos de inclusão com compostos aromáticos e heterociclos e a γ -CD, com moléculas maiores, como macrociclos e esteróides (DEL VALLE, 2004).

A solubilidade em água das CDs ilustra seu comportamento anômalo, a solubilidade da β -CD é apenas 1,85 g por 100 mL, enquanto as da α - e γ -CD são relativamente altas, 14,5 g por 100 mL e 23,2 g por 100 mL, respectivamente. A solubilidade das CDs depende fortemente da temperatura. A 50 °C a solubilidade das três CDs é três vezes maior que a 20 °C. (ATWOOD *et al.*, 1996)

Devido a sua estrutura, as CDs possuem a propriedade de encapsular completamente ou, ao menos, parcialmente dentro de sua cavidade interna hidrofóbica uma grande variedade de moléculas hóspedes (sólidas, líquidas ou gasosas) formando os complexos de inclusão. A formação do complexo é um ajuste dimensional entre a cavidade hospedeira e a molécula hóspede. A efetividade da complexação depende deste ajuste e de interações locais específicas entre os átomos da superfície. A cavidade lipofílica da CD proporciona um microambiente de tamanho apropriado para a localização de moléculas não-polares. A inclusão de uma molécula na cavidade da CD não provoca a quebra nem a formação de ligações covalentes e é, essencialmente, uma substituição da molécula de água inclusa por uma outra menos polar. Este processo é uma interação energeticamente favorável da molécula hóspede não-polar com a cavidade hidrofóbica solvatada. (ATWOOD *et al.*, 1996; DEL VALLE, 2004)

A formação do complexo compreende os seguintes passos elementares:

(i) as moléculas de água escapam da cavidade da CD e sua energia será correspondente àquela no estado gasoso. Como consequência, interações de van der Waals e o número de ligações de hidrogênio diminuem, enquanto os graus de liberdade translacional e rotacional tridimensional das moléculas de águas libertas aumentam;

(ii) a energia conformacional do anel da CD diminui na relaxação no caso da α ou β -CD;

(iii) a molécula hóspede apolar desfaz sua hidratação e assume o estado de um gás ideal;

(iv) a molécula hóspede entra na cavidade vazia da CD e o complexo é estabilizado por interações de van der Waals e, algumas vezes, por ligação de hidrogênio. A molécula hóspede mantém apenas um grau de liberdade rotacional;

(v) as moléculas de água deslocadas condensam do estado gasoso para o líquido. Alterações na entalpia e entropia podem ser consideradas como idênticas às aquelas bem conhecidas da condensação da água;

(vi) a estrutura da água é reestabelecida ao redor da parte exposta da molécula hóspede, e integrada com a esfera de hidratação do anel da CD. (ATWOOD *et al.*, 1996)



velocidade de entrada e k^- = constante de velocidade de saída.

A habilidade das CDs em formar os complexos de inclusão com a molécula hóspede é decorrente de dois fatores: o primeiro é estérico e depende da relação entre os tamanhos do hóspede e do hospedeiro; o segundo fator deve-se as interações termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema (CD, hóspede, solvente). (DEL VALLE, 2004) Porém, estes complexos de inclusão podem alterar as propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes (TOMMASINI *et al.*, 2004).

As CDs atuam como sistemas carregadores de fármacos, pois aumentam a solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade da molécula hóspede e diminuem a toxicidade e o seu efeito quando se trata de uma droga, dentre outros fatores (HAIYUN *et al.*, 2003). Estas características das CDs fazem com que elas e seus derivados sejam aplicados na química analítica, agricultura, nas áreas farmacêutica, alimentícia, cosmética, ambiental e têxtil (DEL VALLE, 2004).

Neste trabalho de Mestrado, uma parte experimental foi concentrada no esforço de descrever o comportamento fotofísico da fisetina em diversos solventes. Este estudo foi realizado através das técnicas de absorção de luz ultra-violeta/visível, fluorescência estática e resolvida no tempo. A segunda parte foi investigar a complexação da fisetina e a 7-hidroxi-flavona com CDs (α -, β - e γ -), variando o pH do meio e a temperatura. Os estudos foram realizados através de medidas de absorção da luz ultravioleta-visível, emissão de fluorescência estática e resolvida no tempo, anisotropia estática, indução do sinal de dicroísmo circular e RMN de ^1H . Os dados experimentais foram comparados com cálculos mecânico-quânticos.

1.3 As Técnicas Utilizadas

1.3.1 Absorção de Luz Ultravioleta-Visível

A técnica de absorção de fótons é regida por dois importantes princípios: Lei de Beer e Lei de Lambert. A primeira enuncia que a quantidade de luz absorvida por moléculas que possuam cromóforos é proporcional à sua concentração. A segunda diz que a proporção de luz absorvida pelo meio que esteja no caminho da luz é independente da intensidade inicial. (TURRO, 1978)

Unindo as duas leis, chega-se a seguinte expressão:

$$\log\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = \varepsilon l C \quad (1)$$

Onde: I_0 é a quantidade de luz incidente; I_T quantidade de luz transmitida; l caminho óptico; ε coeficiente de absorção molar e C concentração de molécula absorvente.

A absorvidade molar é uma propriedade inerente a cada molécula, como também, é independente do caminho óptico e da concentração do meio. (TURRO, 1978)

O complexo hóspede – CD pode ser estudado pelas alterações em várias propriedades espectrais da molécula hóspede e da CD, por exemplo o deslocamento do comprimento de onda máximo ou intensificação/diminuição do sinal de absorção da molécula hóspede decorrente da formação do complexo. Estes comportamentos podem ser explicados pela alta densidade eletrônica dentro da cavidade da CD que mobiliza os elétrons da molécula incorporada. Isto pode provocar uma blindagem parcial dos elétrons excitados na cavidade da CD. (ATWOOD *et al.*, 1996)

1.3.2 Indução de Dicroísmo Circular

Dicroísmo circular é uma forma de absorção espectroscópica que é aplicável quando há quiralidade no cromóforo. Nesta técnica a amostra é irradiada por uma luz polarizada circularmente, que é transformada para uma luz elíptica se a amostra absorver diferencialmente os componentes polarizados circularmente para a direita e para a esquerda. (ATWOOD *et al.*, 1996) O dicroísmo circular (DC) é a diferença de absorção, A , da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita: (CAMPBELL & DWEK, 1998)

$$DC = A_E - A_D \quad (2)$$

A indução de sinal de dicroísmo circular é extensivamente utilizada para o estudo da complexação da CD.

Pela adição de CD em uma solução aquosa de um hóspede potencialmente aquiral, ele tornar-se-á quiral decorrente da localização no ambiente da cavidade quiral da CD, e a indução dos efeitos de Cotton serão observados em um espectro de dicroísmo circular, também chamado de fenômeno de indução de dicroísmo circular. Este efeito pode ser atribuído, principalmente, à atividade óptica da molécula hóspede induzida pela inclusão em uma cavidade quiral, e, parcialmente, à alteração da cavidade da CD. (ATWOOD *et al.*, 1996)

O efeito de Cotton somente é observado quando a molécula hóspede, ou mais exatamente quando metade do cromóforo, é realmente incluído na cavidade da CD. A associação na face externa de um hóspede potencial em uma molécula de CD deve acarretar em algumas modificações nas propriedades espectrais, mas não na indução de dicroísmo circular. (ATWOOD *et al.*, 1996)

O sinal e a intensidade dos efeitos da indução de Cotton são completamente sensíveis à distância e orientação do momento de dipolo de transição do hóspede cromóforo na cavidade da CD. Se o momento de dipolo elétrico do hóspede coincide com o eixo da CD, ou seja, são paralelos, um efeito de Cotton positivo é observado. Quando são perpendiculares entre si, um efeito de Cotton negativo é observado. (ATWOOD *et al.*, 1996; MURPHY *et al.*, 2000)

1.3.3 Fluorescência estática

Luminescência é a emissão de luz de uma substância e ocorre a partir de um estado eletronicamente excitado. A luminescência é dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. No estado excitado singlete, o elétron no orbital excitado está pareado (spin oposto) com o segundo elétron no estado fundamental. Conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido por spin e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. A velocidade de emissão é geralmente 10^8 s^{-1} e o tempo de vida de fluorescência é da ordem de 10 ns. A fluorescência ocorre tipicamente em moléculas aromáticas. (LAKOWICZ, 1999)

Fosforescência é a emissão de luz a partir do estado excitado triplete, no qual o elétron no estado excitado tem a mesma orientação de spin que o elétron no estado fundamental. A transição deste elétron no estado excitado triplete para o estado fundamental são proibidas e a velocidade de emissão é lenta ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$). Portanto, o tempo de vida da fosforescência é de milissegundos a segundos. (LAKOWICZ, 1999)

É importante ressaltar que tanto a fluorescência quanto a fosforescência ocorrem, usualmente, a partir do estado excitado de menor energia, S_1 . Lembrando que, no caso da fosforescência, o povoamento do estado excitado triplete ocorre pelo cruzamento entre sistemas a partir do estado S_1 . A desativação de estados singlete superiores (S_2 , S_3 , etc), até S_1 ocorre usualmente por via não-radiativa (conversões internas) e é extremamente rápida (TURRO, 1991; LAKOWICZ, 1999).

Identificam-se dois processos para transições não-radiativas, de acordo com a multiplicidade do spin dos estados participantes:

Conversão interna (CI): envolve a transferência de elétrons entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin;

Cruzamento entre sistemas (ISC): envolve a transferência de elétrons entre estados de diferentes multiplicidades de spin. (GILBERT; BAGGOT, 1991).

Todos os processos acima citados são usualmente ilustrados pelo digrama de Jablonski, que é o ponto de partida para a discussão da absorção e emissão de luz (TURRO, 1991; LAKOWICZ, 1999)

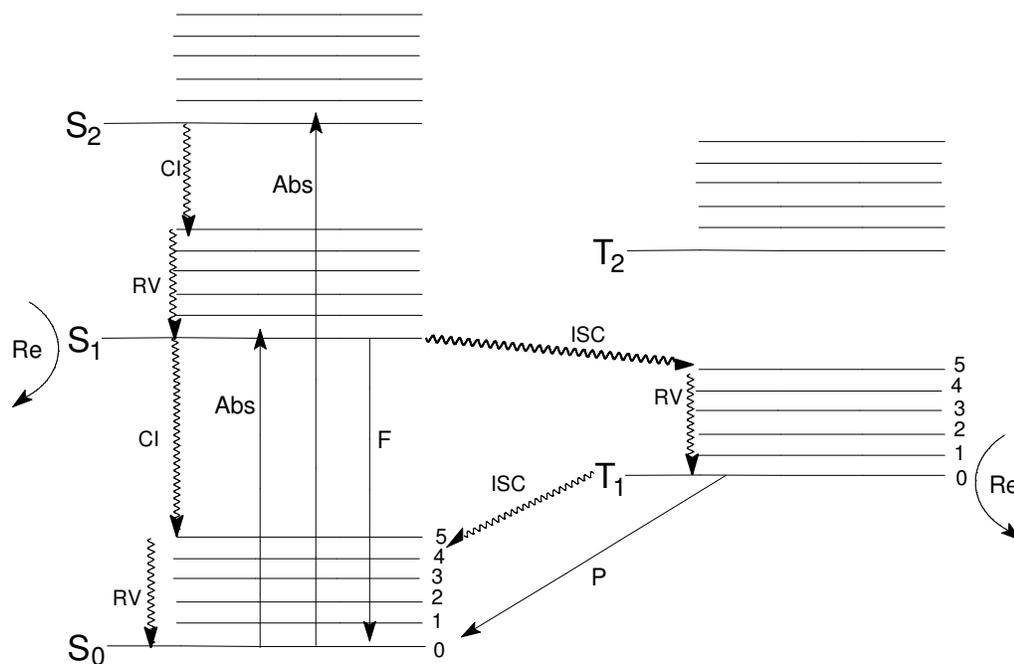


Figura 6. Diagrama de Jablonski (F = emissão de fluorescência, P = emissão de fosforescência, ISC = cruzamento entre sistemas, CI = conversões internas, RV = processos de relaxação vibracional, S_0 = estado fundamental, S_i = estado singlete, T_i = estado excitado tripleto, Re = reações a partir do estado excitado). (TURRO, 1991)

Num diagrama de Jablonski típico, os estados eletrônicos singlete fundamental, primeiro e segundo são descritos por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Os subníveis denotados pelos números quânticos 0, 1, 2, etc. representam os estados vibracionais (os quais são desativados por processos de relaxação vibracional, RV).

As transições eletrônicas entre estados são indicadas por linhas verticais, ilustrando a natureza quase instantânea da absorção e emissão de luz. A absorção de radiação eletromagnética ocorre em aproximadamente 10^{-18} s, um tempo muito curto comparado ao movimento nuclear (LAKOWICZ, 1999). Assim, a transição vibrônica mais provável será aquela em que não estão envolvidas mudanças nas coordenadas nucleares. Essa transição é chamada de máximo de Franck-Condon (FC), e representa

uma transição vertical no diagrama de energia potencial, Figura 7 (TURRO, 1991; LAKOWICZ, 1999). O máximo de FC corresponde à superposição máxima entre a função de onda vibracional do estado fundamental e a função de onda vibracional do estado excitado. O envelope de bandas vibracionais do sistema de bandas de absorção é chamado de envelope de FC e seus máximos correspondem ao máximo de FC. Esse máximo se aproxima da posição da absorção vibrônica mais intensa. Se a última for a transição 0-0, como é o caso da absorção $S_0 \rightarrow S_1$ de muitos hidrocarbonetos aromáticos, isto significa que a configuração nuclear média do estado eletrônico excitado é similar àquela do estado fundamental, visualizada na Figura 7 (McMILLIN, 1978).

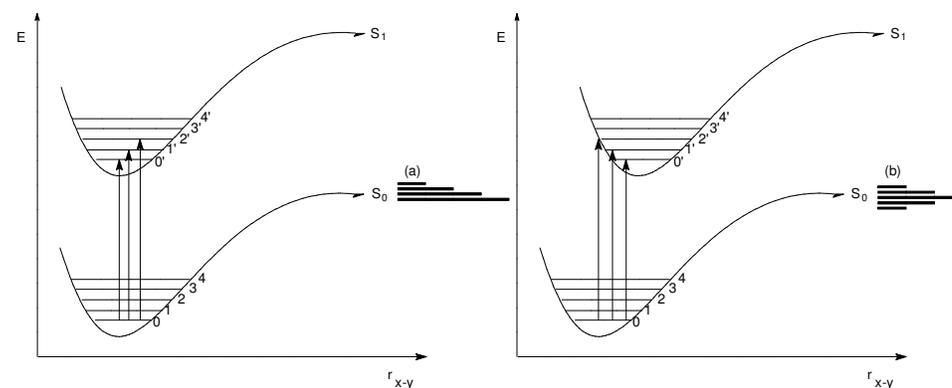


Figura 7. Curvas de energia potencial relativas ao processo de absorção em termos do princípio de Franck-Condon (McMILLIN, 1978).

Todas estas observações fazem parte do princípio de Franck-Condon. Basicamente, estes pressupostos são suficientes para o entendimento do comportamento fotofísico de moléculas, somando-se a eles o entendimento das interações intermoleculares provenientes do meio e da sonda.

Sondas fotofísicas são moléculas com propriedades luminescentes e no estado excitado possuem propriedades físicas diferentes do seu estado fundamental. Durante o período de vida do estado excitado, estas sondas observam e geram informações sobre o ambiente que as envolve. Estas sondas podem ser aplicadas no estudo de

sistemas supramoleculares, como as CDs, fornecendo informações acerca do microambiente onde elas se encontram. (KLEINMAN & BOHNE, 1997)

Muitos compostos que possuem uma fluorescência intensa em solventes orgânicos mostram apenas uma fluorescência negligenciável em água. A adição de CDs a estas soluções aquosas resultará em um significativo aumento na intensidade de fluorescência. (ATWOOD *et al.*, 1996)

A vantagem do uso da técnica de fluorescência é sua extrema sensibilidade a pequenas concentrações. É possível a obtenção de dados com uma boa resolução entre sinal e ruídos (BOHNE, REDMOND & SCAIANO, 1991).

Medidas de fluorescência realizadas para a determinação da constante de estabilidade são baseadas na proporcionalidade da intensidade de fluorescência e da concentração do fluoróforo, $F = kc$, sendo k uma constante de proporcionalidade (incorpora o rendimento quântico e a absortividade). (ATWOOD *et al.*, 1996)

1.3.4 Fluorescência Resolvida no Tempo

A fluorescência resolvida no tempo fornece informações mais detalhadas acerca do fluoróforo do que a fluorescência estática. Por exemplo, sobre diferentes tempos de decaimento, então se pode pressupor a presença de mais de uma espécie fluorescente no sistema em estudo. A fluorescência estática irá apenas revelar uma intensidade média dependente da média ponderada dos dois tempos de vida. O tempo de vida de um fluoróforo é, por definição, o tempo médio entre sua excitação e seu retorno ao estado fundamental. (LAKOWICZ, 1999)

Consideremos a fluorescência para o estado S_1 de uma certa molécula, M , em competição direta com os mecanismos de conversão interna e cruzamento entre sistemas, como ilustrado na Figura 6,

A velocidade para o decaimento de $[M^*]$ é dada por:

$$-\frac{d}{dt}[M^*] = k_F[M^*] + k_{ISC}[M^*] + k_{IC}[M^*] \quad (3)$$

O decaimento de $[M^*]$ obedece a uma cinética de primeira ordem. Assim, $[M^*]$ decai exponencialmente para zero, com uma constante de velocidade k_{exp} , dependente não apenas do decaimento radiativo, mas de todos os processos que levem à desativação do estado M^* ,

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{-k_{\text{exp}} t}, \quad k_{\text{exp}} = k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}} \quad (4)$$

Ou seja, $k_{\text{exp}} = \sum k_i$

Logo, a medida do tempo de vida experimental é dada por

$$\tau_{\text{exp}} = \frac{1}{k_{\text{exp}}} = \frac{1}{\sum k_i} \quad (5)$$

Um dos métodos de medir a fluorescência resolvida no tempo é pela contagem de fótons únicos (“single photon counting”) ou fluorometria pulsada. Esta técnica está baseada no fato que a probabilidade em função do tempo para a emissão de um único fóton deve seguir a distribuição estatística de todos os fótons emitidos. O uso de uma contagem estatisticamente precisa de eventos de emissão ocorrendo num grande número de pulsos de excitação permite a construção de um histograma que reflete exatamente o perfil do tempo de emissão da amostra. (BOHNE, REDMOND & SCAIANO, 1991)

1.3.5 Anisotropia Estática

Anisotropia de fluorescência é também uma técnica muito utilizada para estudar interações moleculares (McCARROLL, BILLIOT & WARNER, 2001) e pode fornecer informações importantes sobre interações hóspede-hospedeiro (XU & McCARROLL, 2005). Esta técnica é baseada na polarização que é, entre outros fatores, a medida de

movimentação rotacional de uma molécula fluorescente. (McCARROLL, BILLIOT & WARNER, 2001)

A excitação através de uma luz polarizada resulta na emissão de uma fluorescência polarizada devido a fotosseleção de fluoróforos de acordo com sua orientação relativa ao plano do campo elétrico dos fótons de excitação. A origem deste fenômeno está baseada na existência de momento de transição para a absorção e emissão o qual fica posicionado ao longo de uma direção específica na estrutura do fluoróforo. Isto permite conhecer a deslocalização angular média que ocorre no fluoróforo entre a absorção e a emissão dos fótons. Este parâmetro de deslocalização é dependente da velocidade e extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Estes movimentos de difusão dependem, por sua vez, da viscosidade do solvente e do tamanho e forma da molécula em rotação. Estes fatores provocam a despolarização, que também pode ocorrer devido à anisotropia intrínseca do fluoróforo. É importante lembrar que existem outras possíveis origens da luz polarizada que podem interferir nas medidas de anisotropia, por exemplo: reflexão e espalhamento da luz. A transferência de energia por ressonância (TER) resulta na desproteção da emissão e, portanto, há uma diminuição no sinal de anisotropia. (LAKOWICZ, 1999)

A anisotropia de emissão ($\langle r \rangle$) é definida pela seguinte equação: (LAKOWICZ, 1999)

$$\langle r \rangle = (I_{vv} - I_{vh}) / (I_{vv} + 2I_{vh}) \quad (6)$$

Onde: I_{vv} e I_{vh} são as intensidades de fluorescência dos componentes paralelo e perpendicular da emissão com excitação usando luz polarizada no plano vertical.

Quando uma molécula fluorescente está livre em solução, ela gira numa velocidade proporcional ao seu tamanho. Se, no entanto, esta forma um complexo com outra espécie, sua velocidade rotacional será proporcional ao complexo inteiro. O grande volume do complexo irá presumivelmente resultar num tempo de correlação rotacional mais lento, portanto, um alto valor de anisotropia. (McCARROLL, BILLIOT & WARNER, 2001)

1.3.6 Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de RMN é uma ferramenta bastante utilizada para o estudo de complexos com CDs nos estados líquidos e sólidos por mostrar evidências diretas da inclusão dentro da cavidade da CD. Por esta técnica é possível avaliar quantitativamente a estrutura, a constante de complexação e parâmetros termodinâmicos e cinéticos da formação do complexo. (ATWOOD *et al.*, 1996; SCHNEIDER; HACKET; RÜDIGER, 1998) Esta técnica permite a clara distinção entre uma real inclusão ou apenas uma interação externa entre a CD e a molécula hóspede.

Se o hóspede estiver incluso na cavidade interna da CD, os átomos de hidrogênio localizados na cavidade interna da CD nas posições C3 e C5 serão consideravelmente blindados pelo hóspede. Os átomos de hidrogênio da superfície externa, C2, C4 e C6, praticamente não serão afetados. (ATWOOD *et al.*, 1996)

Estudos de NOESY são aplicados para certificar a estrutura proposta, estes mostram as interações intermoleculares dos prótons do anel fenílico da fisetina com os prótons da cavidade da CD, prótons que estão próximos um dos outros no espaço mesmo não estando ligados, verificando a inclusão. (PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2000)

II OBJETIVOS

Os objetivos desta Dissertação de Mestrado se fundamentaram na investigação:

- (i) do comportamento da fisetina em diferentes ambientes de solvatação;
- (ii) dos estados fundamental e excitado singlete das estruturas normal e tautomérica da fisetina na presença de β - e γ -CDs em diferentes pHs através das técnicas de absorção UV-Vis, fluorescência estática e resolvida no tempo e anisotropia estática;
- (iii) da estrutura do complexo formado entre fisetina e CDs pela técnica de indução do sinal de dicroísmo circular e cálculos teóricos e
- (iv) dos cálculos dos parâmetros termodinâmicos da constante de complexação entre fisetina-CDs por medidas de solubilidade e comparadas com resultados obtidos por cálculos mecânico-quânticos.

Paralelamente, foi proposto um estudo para analisar o comportamento da 7-hidroxi-flavona (7-HF) em diferentes pHs e CDs. O objetivo foi obter uma comparação entre estruturas de diferentes flavonóides que favoreçam ou não a transferência de próton intramolecular no estado excitado singlete.

III PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Materiais

III.1.1 Flavonóides:

- Fisetina (Aldrich, lote: 05612DO) e
- 7-Hidroxiflavona (Acros, lote: A016779501).

III.1.2 Ciclodextrinas:

- β -CD (Acros, 99%, Lote: A0057301501);
- α - e γ -CD (amostras gentilmente cedidas pela indústria química Wacker).

III.1.3 Outros Reagentes:

- Acetato de etila (J.T. Baker, P.A.);
- Acetonitrila (Fisher Scientific, P.A.);
- Água deuterada (Acros, 99,8 %);
- Água ultrapura (sistema Millipore);
- Butanol (Aldrich, P.A.);
- Clorofórmio (Merck, P.A.);
- Diclorometano (Mallinckrodt, P.A.);
- Dietilamina (Merck, P.A.);
- Dimetilformamida (Merck, P.A.);
- Dimetilsulfóxido deuterado (Aldrich, 99,9 %);
- Etanol (J.T. Baker, P.A.);
- Fosfato de sódio dibásico anidro (J.T. Baker);
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado (J.T. Baker);
- Glicerol (Mallinckrodt, P.A.);
- Hidróxido de sódio (Nuclear, P. A.);
- Hidróxido de sódio deuterado 30 % peso em D₂O (Acros, 99 %);
- Metanol (J.T. Baker, P.A.);
- Metanol deuterado (Acros, 99,8 %) e
- Tetrahidrofurano (Aldrich, P.A.).

Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

III.2 Equipamentos:

- As medidas de absorção foram realizadas, a 23 °C, no espectrofotômetro UV-Vis U-3000 Hitachi, verificando-se a faixa de 700 a 200 nm com uma fenda de 5 nm e velocidade de 600 nm/min. Todas as medidas foram feitas com correção prévia da linha de base.
- Medidas de emissão de fluorescência foram realizadas, a 23 °C, no espectrofluorímetro F-4500 Hitachi, variando-se o comprimento de onda de excitação e faixa de emissão com fendas de emissão e excitação de 10 nm para a fisetina e de 10 e 20 nm para a 7-HF, e velocidade de 240 nm/min.
- As medidas de dicroísmo circular foram realizadas a 25 °C na faixa de 450 a 190 nm com velocidade de 200 nm/min no espectropolarímetro J-180, Jasco, com sistema de controle interno de temperatura Jasco PTC-423S acoplado ao equipamento. O sinal final obtido para cada amostra foi devido a uma média de dois espectros registrados. A linha de base foi uma solução aquosa de flavonóide contendo no máximo 0,5 % (v/v) de metanol, a qual não apresenta sinal de dicroísmo circular, já que é uma molécula aquiral. Os espectros das soluções aquosas de CD na ausência de flavonóide foram subtraídos daqueles na presença do hóspede.
- Para as medidas de fluorescência resolvida no tempo foi utilizado um equipamento do laboratório do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, baseado no método de Contagem de Fótons Únicos (Single Photon Counting). A fonte de excitação foi um sistema laser titânio-safira da Tsunami 3950 Spectra Physics, excitado pelo laser de estado sólido Millenia Spectra Physics. A velocidade de repetição de pulsos de 5 ps foi utilizada em conjunto com uma frequência de 8,0 MHz usando o coletor de pulsos Spectra Physics 3980. O laser foi ajustado na frequência em 315 nm e obteve-se o seu terceiro harmônico pelo cristal BBO (GWN-23PL Spectra Physics). Pulsos de excitação em 305 ou 328 nm foram direcionados para o espectrofotômetro Edinburgh FL900. O comprimento de onda de emissão foi selecionado por um monocromador na faixa de 510 a 533

nm dependendo da amostra analisada. Os fótons emitidos foram detectados por um fotomultiplicador Hamamatsu R3809U do tipo placa de microondas refrigerada. O FWHM da função de resposta do instrumento foi tipicamente 65 ps, determinado com o tempo de resolução de 12,0 ps por canal. As medidas foram feitas usando um tempo de resolução de 48 ps por canal. O software fornecido pela Edinburgh Instruments foi usado para analisar as curvas de decaimento cinético. O ajuste adequado de um decaimento multiexponencial foi considerado pela inspeção da representação gráfica do resíduo e pelos parâmetros estatísticos como a redução do chi-quadrado (χ^2).

- O experimento de anisotropia foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Richard John Ward. Utilizou-se o espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100C, a 25 °C, com excitação em 330 nm e a emissão de 525 nm. Foram utilizados os polarizadores Glan-Thompson, a abertura das fendas de excitação e emissão de 16, 8 e 8 nm e a voltagem fotomultiplicadora de 600 V.
- Os espectros de RMN de ^1H foram feitos no espectrômetro DRX500, série Avance da Bruker. Para os espectros de RMN de ^1H , o pulso de 90° foi igual a 8,35; 11,0 ou 12,0 μs , com respectiva potência de 0, -2,50 ou -3,50 dB. Para o espectro de NOESY, foram utilizados os mesmos parâmetros e o valor de tempo de combinação (“mixing time”) foi de 0,75 s.
- As medidas com variação de pH foram monitoradas através de um pHmetro digital e eletrodo de pH/mV da Digimed.

III.3 Métodos

III.3.1 Purificação da 7-hidroxiflavona

A 7-HF foi recristalizada de etanol, conforme descrito em (LOOKER & HANNEMAN, 1957) e apresentou um ponto de fusão com variação de 1 °C (247 – 248

°C). A literatura descreve o ponto de fusão da 7-HF em 240 °C (LOOKER & HANNEMAN, 1957).

III.3.2 Preparação da Solução de Fisetina em Vários Solventes

Devido à baixa solubilidade da fisetina em vários solventes, preparou-se uma solução estoque deste flavonóide 1 mmol/L em metanol.

Pequenas alíquotas dessa solução estoque foram adicionadas aos diferentes solventes utilizados para atingir a concentração de 20 µmol/L de fisetina, contendo metanol em quantidade máxima de 0,5 % (v/v). Após breve agitação, foram realizadas as medidas experimentais.

III.3.3 Preparação dos Complexos Flavonóide-CD

Preparou-se uma solução estoque de fisetina ou 7-HF 1 mmol/L em metanol, pois os flavonóides apresentam baixa solubilidade em água.

Uma solução mais concentrada de CD (para γ -CD 30 mmol/L e β -CD 12 mmol/L) na presença da sonda na concentração de 5, 25 ou 50 µmol/L, contendo metanol em quantidade máxima de 0,5 % (v/v), foi preparada e deixada sob agitação por 4 horas. A seguir, diluições foram feitas utilizando como solvente uma solução de flavonóide na concentração desejada. Todas as soluções foram deixadas sob agitação por 24 horas antes da realização das medidas experimentais.

III.3.4 Complexos de CD em Soluções Tamponadas

Para as medidas realizadas com o meio tamponado, prepararam-se duas soluções tampão. Para o tampão básico adicionaram-se volumes iguais de soluções aquosas de fosfato de sódio dibásico 0,2 mol/L e hidróxido de sódio 0,1 mol/L, para obter o pH ao redor de 12. Para o tampão ácido, pH aproximadamente 4,6, adicionou-se uma razão de 400:1 de NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 . A cada uma destas soluções foi adicionada quantidade suficiente da solução estoque de flavonóide 1 mmol/L em metanol para obter a concentração final desejada de sonda fotofísica e porcentagem máxima de metanol de 0,5 % (v/v).

III.3.5 Soluções Básicas em D_2O para as Medidas de RMN de ^1H

Para a obtenção de uma concentração adequada de fisetina em solução aquosa, para os experimentos de RMN de ^1H , foi necessário tornar o meio básico. Para isso, foram empregados dois tipos de procedimento. O primeiro consistiu em utilizar amônia gasosa para basificar a água deuterada. Esta amônia foi gerada pela reação entre a solução de NaOH 2M e NH_4Cl sólido, sob agitação e ligeiro aquecimento, em um sistema semifechado, onde a saída do gás borbulhava em um recipiente contendo a água deuterada antes de ser liberado para o meio ambiente. Em paralelo, foi feito um experimento à parte, contendo água ultra-pura e controle de pH realizado através de um pH-metro.

O segundo procedimento consistiu em utilizar-se de uma mistura disponível comercialmente de D_2O com NaOD a 30% (m/m).

III.3.6 Determinação da Constante de Equilíbrio, K

Os experimentos de absorção da radiação UV-Vis e fluorescência no estado estacionário permitem a determinação da constante de equilíbrio através do emprego da equação de Benesi-Hildebrand (BENESI & HILDEBRAND, 1949):

$$\Delta I = \frac{[Fis]_T \Delta x K [CD]}{1 + K [CD]} \quad (7)$$

Esta equação é aplicável em um experimento de complexação com CD, se a concentração de CD, $[CD]$, estiver presente em excesso quando comparada a concentração da sonda, $[Fis]_T$, e desde que haja uma variação na intensidade da medida, ΔI , com o aumento da concentração de CD. Δx pode representar a diferença entre o rendimento quântico de emissão de fluorescência ou a absorvidade molar nos experimentos de fluorescência e de absorção da radiação UV-Vis, respectivamente.

Nestas circunstâncias, a curva de um gráfico contendo ΔI em função da concentração de CD pode ser ajustada através da equação 7, fornecendo diretamente o valor de K .

A relação linear da equação de Benesi-Hildebrand (equação 7), fornece um gráfico de duplo recíproco:

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{[Fis]_T \Delta x} + \frac{1}{[Fis]_T \Delta x K [CD]} \quad (8)$$

e é válida quando o complexo formado possui estequiometria 1:1. Nos casos em que uma boa correlação linear não é encontrada no gráfico do duplo recíproco, é possível avaliar se a estequiometria é 1 hóspede: 2 CD através coeficiente de correlação linear do gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[CD]^2$.

III.3.7 Análise de Solubilidade da Fisetina nas CDs

A solubilidade da fisetina nas CDs foi analisada de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors (HIGUCHI & CONNORS, 1965). Quantidades em excesso de fisetina (aproximadamente 1 mg) foram adicionadas em frascos contendo quantidades determinadas de β -CD (0-0,012 mol/L) e γ -CD (0-0,030 mol/L) e agitadas à temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, as soluções permaneceram num banho termostatizado por aproximadamente 2 horas na temperatura de 25 °C. A seguir foram filtradas e analisadas no espectrofotômetro para determinar a concentração de fisetina. O mesmo procedimento foi realizado nas temperaturas de 15, 35 e 45 °C. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Para o cálculo da concentração de fisetina em cada solução, foram determinados nos três comprimentos de onda de maior absorção (248, 318 e 360 nm), os coeficientes de absorvidade molar, ϵ . Em seguida, pela aplicação da lei de Lambert-Beer, determinou-se a concentração de fisetina solubilizada para cada concentração de β -CD empregada.

Construiu-se um gráfico da concentração de fisetina em função da concentração de β -CD. Na parte linear no diagrama de solubilidade, segundo a equação de Higuchi e Connors (HIGUCHI & CONNORS, 1965), temos:

$$K = \frac{\text{coef. angular}}{\text{coef. linear} (1 - \text{coef. angular})} \quad (9)$$

Esses resultados também permitiram a obtenção de parâmetros termodinâmicos relacionados à formação do complexo. Através da forma integrada da equação de Van't Hoff pode-se calcular as variações de entalpia e entropia, dependentes da variação da constante de estabilidade com a temperatura. O gráfico de $\ln K$ em função do inverso da temperatura fornece pela equação 10, os valores de ΔH e ΔS através dos coeficientes angular e linear, respectivamente.

$$\ln Kc = -\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) + \left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \quad (10)$$

A variação da energia livre, ΔG , pode ser calculada pela equação de Gibbs, considerando a temperatura ambiente.

$$\Delta G_{25}^\ddagger = \Delta H - T.\Delta S \quad (11)$$

III.3.8 Aplicação dos Métodos Mecânico-Quânticos

Inicialmente, a estrutura da molécula de fisetina isolada foi otimizada utilizando-se a Teoria de Hartree-Fock (UHF), para descrever o estado fundamental, e um procedimento de Interação de Configurações baseado no método *ab initio* CI-Singles, para o estado S_1 . O conjunto de bases empregado em ambas as situações foi 3-21G**. A otimização da estrutura da fisetina isolada, no estado fundamental, também foi feita, por medida comparativa, usando método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) baseado no funcional híbrido B3LYP. Cálculos DFT com dependência temporal (TD-DFT) também foram feitos no sentido de se explorar parâmetros relativos ao estado S_1 da fisetina e da fisetina desprotonada. Esses cálculos basearam-se no funcional híbrido B3LYP e no conjunto de bases 6-31G**. Os cálculos UHF, CI-Singles e DFT foram efetuados empregando o pacote computacional Gaussian 03W (Rev. B05, Version 6), juntamente com o programa GaussView 03 (Frisch *et al.*, 2003).

O espectro de RMN da fisetina no estado fundamental foi simulado aplicando-se um outro método DFT, baseado no funcional MPW1PW91 (WIBERG *et al.*, 1999). Neste caso, empregou-se o conjunto de funções de base 6-311G*. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram calculados considerando a constante de blindagem do TMS (31,8821), calculada usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases 6-311G*, associados ao método "Gauge-Independent Atomic Orbital" (GIAO), e às palavras-chave NMR = IGAIM (Frisch *et al.*, 2003).

Para a obtenção de dados teóricos acerca da β -CD e do complexo fisetina/ β -CD, as estruturas foram primeiramente otimizadas empregando-se o método semi-empírico SAM1 (UHF), em cálculo SCF quadraticamente convergente, baseado no pacote computacional AMPAC (SEMICHEM, 2005). O procedimento semi-empírico foi adotado tendo em vista o elevado número de átomos envolvidos (178 no caso do complexo de inclusão e combinações usadas nos cálculos de caminho de reação). A minimização dos gradientes foi obtida empregando o algoritmo TRUSTG, com gradiente igual a 0,001. Parâmetros termodinâmicos foram obtidos pela inclusão das palavras-chave FORCE e THERMO na linha de comando.

Nos cálculos de caminho de reação (reaction path), visando obter alternativamente as estruturas dos complexos de inclusão, até 47 estruturas foram otimizadas, correspondendo às etapas do processo.

Todos os cálculos foram feitos para estruturas isoladas ou considerando-se associações entre uma molécula de fisetina e uma de β -CD.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Cálculos Teóricos

IV.1.1 Transferência Intramolecular de Próton da Fisetina no Estado Excitado

Geometricamente, a diferença entre a fisetina nos estados fundamental e excitado é bastante sutil e está localizada na região onde ocorre o equilíbrio entre a fisetina e seu tautômero. Essas estruturas apresentam uma diferença considerável nos seus momentos de dipolo, sendo estimados como 2,3890 e 5,7630 D para os estados fundamental (S_0) e excitado (S_1). Isto sugere a ocorrência de uma transição $S_0 \rightarrow S_1$ tipicamente π, π^* , o que é confirmado pela análise dos orbitais moleculares HOMO e LUMO envolvidos e pela força de oscilador, calculada por TD-DFT, empregando o funcional híbrido B3LYP, e o conjunto de bases 6-31G**.

Os cálculos teóricos também mostraram que no estado fundamental, a molécula de fisetina é totalmente planar (ângulo diedro entre os carbonos C(11)C(14)C(31)C(20) = 0,000°), mas, há uma alta barreira energética prevenindo o equilíbrio entre a fisetina e seu tautômero. No estado excitado a fisetina sofre uma alteração na sua densidade eletrônica. Para o tautômero, há um pequeno desvio dessa planaridade (ângulo diedro = -0,004°) em virtude da existência de um grupo carbonila próximo (C(11)O(12)), e seu momento de dipolo decresce para 1,8806 D. Por esta razão, no estado excitado, o equilíbrio entre a estrutura normal da fisetina e seu tautômero se torna mais factível devido à diminuição da barreira energética (Figura 2).

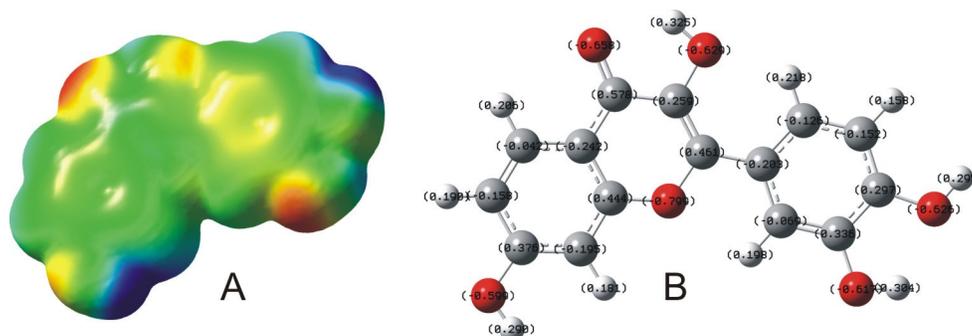


Figura 8. Densidade eletrônica da fisetina (A) e cargas de Mulliken (B).

IV.1.2 Formação do complexo entre a fisetina e a β -CD

O método semi-empírico SAM1 foi escolhido para descrever os sistemas maiores (β -CD e complexos de inclusão), por possuir um formalismo mais bem aprimorado do que seus predecessores (MNDO e AM1), empregando alguns atributos característicos dos métodos *ab initio* (SEMICHEM, 2005). O elevado número de átomos envolvidos, 178, levou a esta escolha. Os dados teóricos não levaram em consideração a possibilidade de interações entre as espécies envolvidas e o solvente.

O estudo da formação do complexo de inclusão levou em consideração, na otimização estrutural, a possibilidade de inserção da fisetina através do anel cromona

(A) ou via grupo fenila (B) (Figura 2). A inserção da fisetina foi feita de duas formas distintas: (i) pela “construção” e posterior otimização das estruturas de inclusão, e (ii) avaliando-se sua entrada na cavidade da β -CD, utilizando-se um procedimento de caminho de reação. Durante este último cálculo, até 47 estruturas foram otimizadas, correspondendo às etapas envolvidas na formação do complexo de inclusão. A fisetina desprotonada, simulando o pH aproximadamente 12, também foi calculada sob as mesmas condições citadas acima. Os parâmetros termodinâmicos teóricos foram determinados e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos para a complexação da fisetina com β -CD empregando o método semi-empírico SAM1

	Teórico (SAM1) (valores padrões a 25 °C)
	-48,95 (fenila)
ΔH (kJ.mol ⁻¹)	-44,43 (cromona)
	-68,41 (fenila, pH 12)
	-186 (fenila)
ΔS (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	-127 (cromona)
	-165 (fenila, pH 12)
	+6,5 a +18,2 (fenila)
ΔG_{25} (kJ.mol ⁻¹)	-6,6 (cromona)
	-19,3 (fenila, pH 12)

Os dados teóricos da Tabela 2 sugerem a coexistência de duas formas distintas do complexo de inclusão, através da cromona ou da fenila, com preferência via a cromona. No entanto, os cálculos mostram que quando a fisetina é inserida através do anel fenila, os prótons das hidroxilas 3' e 4' são capazes de formar ligações de hidrogênio intermoleculares com o átomo de O na posição 6 da molécula de β -CD, com comprimentos de ligação estimados em 1,81 e 1,74 Å, respectivamente. O oxigênio da hidroxila na posição 3' também é capaz de formar uma ligação de hidrogênio intermolecular com a β -CD, com comprimento de ligação estimado em 1,89 Å. Ainda, os

hidrogênios das hidroxilas 3' e 4' formam ligações intramoleculares com os oxigênios da hidroxila vizinha, com comprimentos de ligação estimados em 2,19 e 1,89 Å, respectivamente (Figura 9).

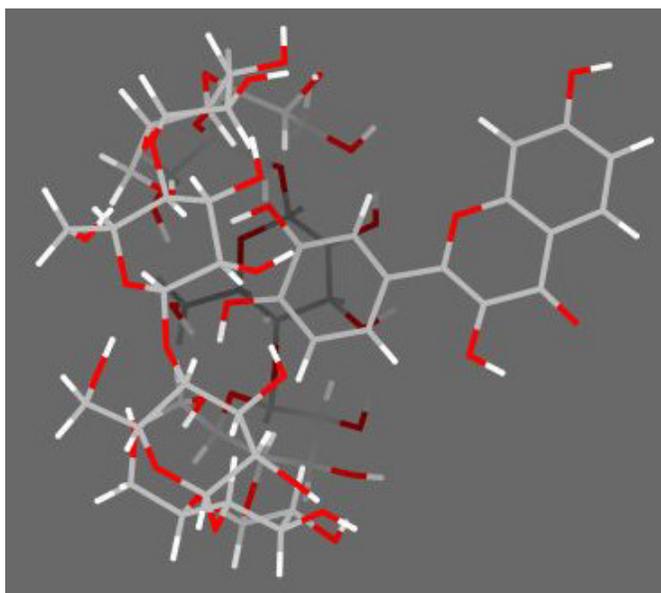


Figura 9. Dados da aplicação do modelo semi-empírico SAM1 no estudo da incorporação da fisetina em β -CD através do anel fenila.

A formação do complexo pela entrada da cromona (Figura 10) implica na formação de apenas uma única ligação de hidrogênio intermolecular com a β -CD, através do hidrogênio da hidroxila 7 com a hidroxila na posição 6 da β -CD, com comprimento de ligação estimado em 1,72 Å. Neste caso, os cálculos de caminho de reação sugerem duas estruturas de inclusão, Figura 10, separadas por uma barreira de energia de aproximadamente 12,2 kJ. A primeira apresenta duas ligações de hidrogênio (1,86 e 1,77 Å), e é mais estável (ΔH° é igual a -6933,55 kJ/mol), enquanto a outra apresenta apenas uma única ligação de hidrogênio (1,8 Å e $\Delta H^\circ = -6930,58$ kJ/mol). Há, entretanto, neste caminho de reação, várias barreiras de energia para a entrada da fisetina, resultado da formação de intermediários produzidos pelas ligações de hidrogênio entre a OH da posição 7 da cromona e grupos OH na

entrada da cavidade da β -CD, enquanto para a entrada pela fenila, os cálculos apontam para um único produto.

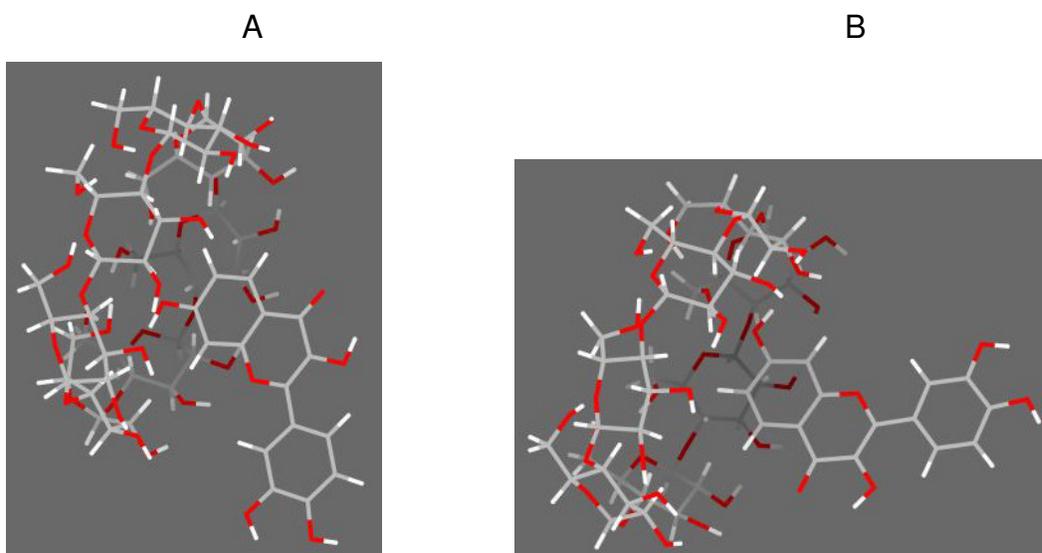


Figura 10. Dados da aplicação do modelo semi-empírico SAM1 no estudo da incorporação da fisetina em β -CD através da parte cromona (A) duas ligações de hidrogênio e (B) uma única ligação de hidrogênio.

Considerando apenas o número de ligações de hidrogênio formadas, espera-se que a inclusão seja, predominantemente, baseada na entrada do grupo fenila. Além deste fato, no estudo pelo método do caminho reacional, a entrada via o anel da cromona da molécula aponta para a formação de vários intermediários devido a ligação de hidrogênio entre a OH 7 e o grupo OH na entrada da cavidade da β -CD. Isto reduz a possibilidade da inclusão da fisetina via entrada da cromona. Por outro lado, para a entrada da fenila, os cálculos apontam para apenas um produto formado, sem intermediários. A partir de todos esses resultados acredita-se que a entrada preferencial seja através do anel da fenila, apesar da Tabela 2 indicar o oposto.

É válido mencionar que os comprimentos das ligações de hidrogênio estimados pelos cálculos teóricos são curtos. No entanto, em um trabalho recente, foi mostrado que a introdução de interações com o solvente nos cálculos tendem a aproximar os valores estimados teoricamente para os tipicamente atribuídos as ligações de hidrogênio (MACHADO *et al.*, 2005).

Uma avaliação da incorporação da fisetina duplamente desprotonada, aproximando condições encontradas quando o meio reacional se encontra a pH 12, mostra que a estrutura da β -CD é bastante distorcida, Figura 11 A, sendo que o ânion fenóxido da posição 3' do anel fenila compartilha um próton da β -CD, Figura 11 B.

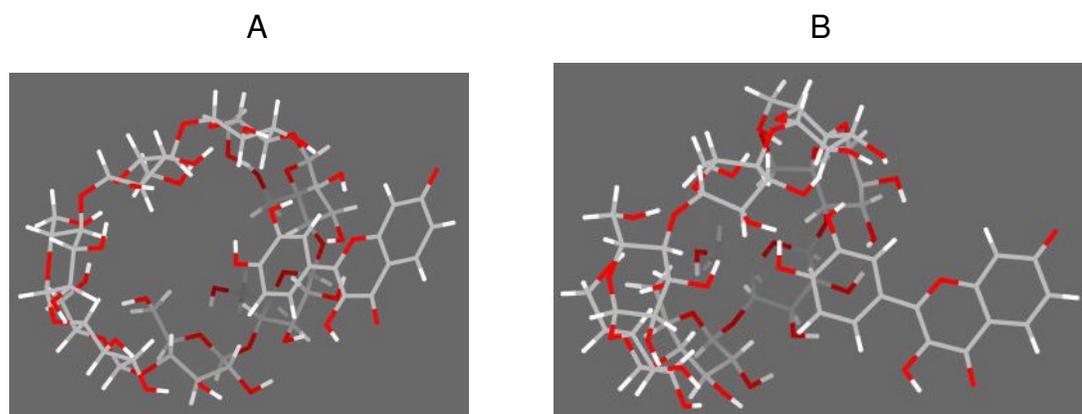


Figura 11. Dados de modelo semi-empírico SAM1 da incorporação da fisetina desprotonada em β -CD através do anel fenila. (A) vista superior (B) visão lateral.

No entanto, o valor de ΔG°_R para a inclusão via fenila (Tabela 2) sugere uma forte estabilização do sistema formado quando comparado com a fisetina neutra. A estrutura otimizada para o complexo mostra que há fortes interações entre o fenóxido e os grupos OH presentes na entrada da cavidade da β -CD, devido à formação de algumas ligações de hidrogênio, uma delas resultante do compartilhamento de um próton. Podem ser observadas duas típicas ligações de hidrogênio intermoleculares (ambas de 1,64 Å), uma ligação de hidrogênio intramolecular envolvendo o ânion fenóxido e o grupo OH vizinho por cima do grupo fenil (2,07 Å). Este grupo OH também interage com a β -CD através deste oxigênio, formando uma ligação de hidrogênio com o comprimento de 1,77 Å. Quando o próton é compartilhado, o comprimento da ligação C-H da β -CD aumenta para 1,14 Å, e o hidrogênio aparece como um átomo isolado compartilhado pela β -CD e pelo ânion fenóxido. A distância a partir do hidrogênio para o fenóxido é 1,90 Å.

É válido ressaltar que esses resultados foram obtidos a partir de cálculos para moléculas isoladas, na ausência de qualquer interação com as moléculas de solvente. Certamente, um estudo envolvendo “Simulated Annealing” para estimar as conformações mais estáveis para o complexo de inclusão, também incluindo a participação do solvente, poderia fornecer parâmetros termodinâmicos mais confiáveis. A limitação deste estudo está no alto custo computacional, para obtenção rápida de resultados que envolvam um grande número de átomos.

IV.2 Estudo da Fisetina

IV.2.1 Medidas Espectroscópicas da Fisetina em Diversos Solventes

Para a caracterização fotofísica da fisetina, um dos fatores para se considerar é sua sensibilidade ao solvente. Tanto solventes próticos (como os testados neste trabalho: água, metanol, etanol, butanol e glicerol) quanto apróticos (acetato de etila, acetonitrila, DMF, diclorometano, tetrahidrofurano e clorofórmio) oferecem condições distintas que interferem na fotofísica desta sonda. A seguir, são apresentados os espectros de absorção da fisetina, 20 $\mu\text{mol/L}$, em diversos solventes (Figura 12), bem como seus máximos de absorção e emissão (Tabelas 3 e 6).

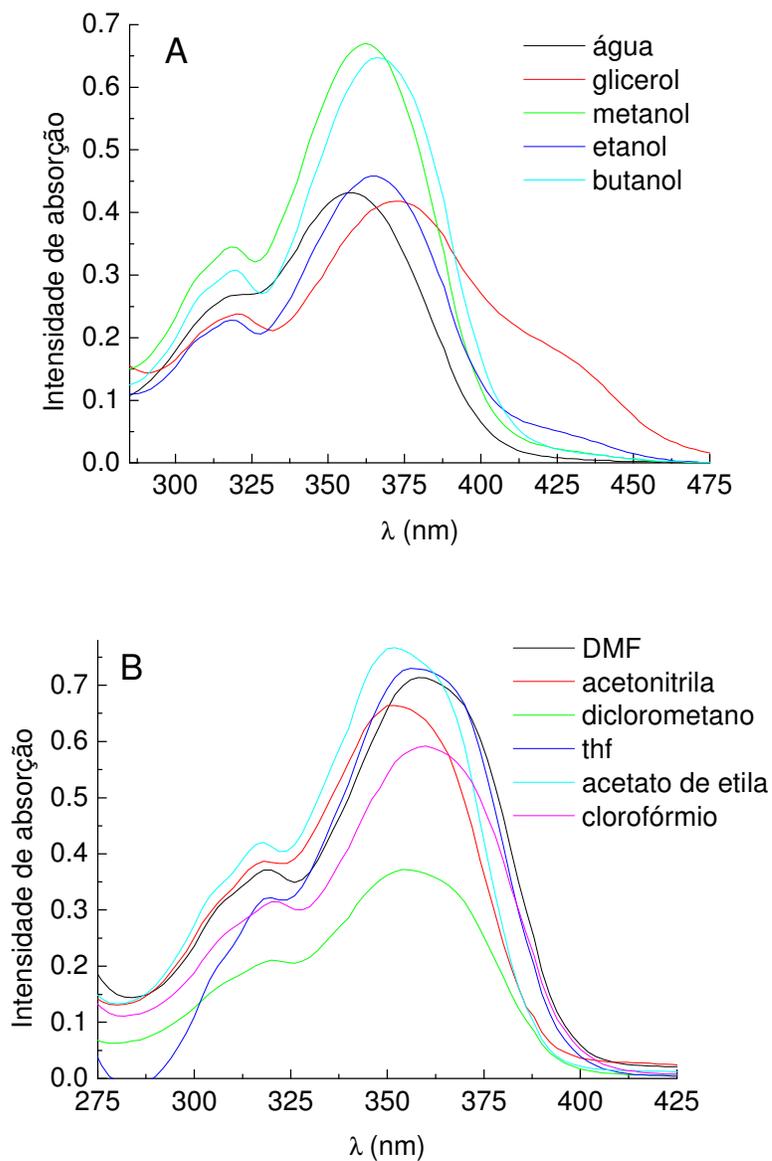


Figura 12. Espectros de absorção da fisetina em diversos solventes, próticos (A) e apróticos (B)

Tabela 3 - Comprimentos máximos de absorção e emissão de fluorescência da fisetina em diversos solventes de acordo com sua constante dielétrica (D)

Solvente	Constante dielétrica (D)	$\lambda_{\text{máx}}$ absorção (nm)		
Clorofórmio	4,8	250	320	360
Acetato de etila	6,0	254	317	352
Dimetilamina	6,3	-	326	428
THF	7,5	254	318	357
Diclorometano	9,1	247	320	356
Butanol	17,8	250	320	366
Etanol	24,3	250	318	365
Metanol	33,0	s	318	362
Acetonitrila	37,5	246	317	352
DMF	38,3	267	318	358
Glicerol	42,5	255	320	372
Água	80,0	248	318	357

(s = nesta região do espectro não foi possível determinar a absorção referente ao solvente)

Várias propriedades específicas dos solventes podem ajudar na interpretação dos resultados obtidos. No caso acima, a ordenação dos solventes foi feita com a utilização da constante dielétrica, uma vez que a idéia do contínuo dielétrico, proporcionado pela rede de solvatação ao redor da sonda fotofísica (fisetina), permite, inicialmente, compreender os efeitos elementares das interações soluto-solvente. Na Tabela 3, já é possível notar que o comportamento da fisetina varia conforme se alteram as condições do meio. Estas variações se mostram quanto ao deslocamento do comprimento de onda do máximo de absorção e quanto à intensidade da banda de absorção. A variação na intensidade está relacionada com a probabilidade de ocorrer a transição eletrônica entre os estados fundamental e excitado. Por sua vez, esta transição é dependente da eficiente solvatação dos níveis energéticos, favorecendo suas estabilizações. Outro ponto a ser mencionado é o fato da ausência de variação no

formato das bandas de absorção (com exceção do glicerol) sugerindo que a excitação ocorrerá a partir de estados eletrônicos similares.

A literatura descreve o comportamento de absorção de luz ultravioleta-visível da fisetina em alguns solventes, como o máximo de absorção em etanol em 365 nm (SYTNIK, GORMIN & KASHA, 1994); 358 nm em água, em metanol em 362 nm, 350 nm em acetonitrila e 351 nm em acetato de etila (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999). Os resultados encontrados no presente trabalho condizem com todos os valores descritos anteriormente.

Na Tabela 4, a seguir, são apresentados a área e o comprimento de onda máximo das bandas, que compõem a absorção da fisetina nos diferentes solventes estudados, identificados pela deconvolução (realizada no software Origin) de cada espectro de absorção.

Tabela 4 - Deconvolução das bandas da fisetina presentes no espectro de absorção de luz ultravioleta - visível

	Solvente	Número de picos	Banda 1		Banda 2		Banda 3		Banda 4	
			$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Área	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	área	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	área	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	área
Aprótico	Clorofórmio	2			318,8	16,44	363,7	24,37		
	Acetato de etila	3	316,9	8,16	317,4	12,81	357,5	28,58		
	THF	2			316,8	7,80	358,7	35,52		
	Diclorometano	2			318,9	10,57	360,3	14,33		
	Acetonitrila	2			318,6	19,92	357,8	23,41		
	DMF	2			315,7	17,36	362,5	31,54		
Prótico	Butanol	2			312,4	12,91	367,3	33,74		
	Etanol	3			310,1	8,12	365,2	25,46	428,5	1,44
	Metanol	3	313,2	1,93	314,5	18,22	364,6	30,36		
	Glicerol	3			312,0	10,94	371,0	23,19		
	Água	2			313,1	12,12	361,3	21,05		

Pode-se notar, na Tabela 4, que na região de 275 a 475 nm, alguns solventes apresentam três bandas de absorção (acetato de etila, etanol e metanol), enquanto os demais apresentam somente duas bandas de absorção. Tentou-se averiguar se há uma relação entre as áreas das bandas 2 e 3, mostrado na Tabela 5, porém não há nenhuma proporcionalidade entre elas.

Tabela 5 - Razão entre as áreas das bandas 3 e 2 de absorção da fisetina

	Solvente	Banda 3/Banda 2
Aprótico	Clorofórmio	1,48
	Acetato de etila	2,23
	THF	4,55
	Diclorometano	1,36
	Acetonitrila	1,18
	DMF	1,82
Prótico	Butanol	2,61
	Etanol	3,14
	Metanol	1,67
	Glicerol	2,12
	Água	1,74

A análise conjunta da Figura 12 e da Tabela 4 mostra que é possível sugerir ainda a coexistência de diferentes espécies derivadas da sonda em questão. No estado fundamental há uma grande barreira energética para a formação da espécie tautomérica, como mostrado nos cálculos teóricos da fisetina. Entretanto, devido à minimização desta barreira quando se excita a molécula, o tautômero é mais facilmente observado no estado excitado (GUZZO *et al.*, 2006).

Além disso, pelo menos dois efeitos podem ser enunciados. O primeiro diz respeito a um deslocamento hipsocrômico em relação à polaridade dos solventes próticos, exceto em glicerol que apresenta um deslocamento batocrômico em relação aos demais. Este comportamento pode estar relacionado à viscosidade deste solvente, quando comparado aos álcoois. A rigidez em uma solução permite uma melhor

definição das espécies presentes no meio, uma vez que afeta os equilíbrios existentes entre as diversas estruturas da fisetina.

Nos solventes apróticos, a tendência é deslocar os máximos de absorção para comprimentos de onda ainda menores que nos solventes próticos. Tais resultados evidenciam a necessidade de separação de dois efeitos principais, as interações específicas por meio de ligação de hidrogênio entre a sonda e solvente e o efeito provocado pela polaridade do meio.

É importante ressaltar que a fisetina, em função de sua estrutura hidroxilada, apresenta os seguintes equilíbrios químicos: tautômero \rightleftharpoons espécie neutra \rightleftharpoons formas desprotonadas. Deste modo, diferentes emissões podem ser obtidas ao excitar a sonda em diferentes comprimentos de onda.

Neste trabalho, foram feitos dois tipos de estudo. O primeiro investigou a emissão de fluorescência da fisetina nos vários solventes (Figura 13). O segundo foi, fixando-se um certo solvente, a determinação do espectro de emissão de fluorescência da fisetina, variando-se os comprimentos de onda de excitação. Isto foi realizado com o intuito de caracterizar as espécies derivadas da fisetina, a partir de sua interação com o meio. Os resultados ficam mais claros para a fisetina em glicerol, como pode ser visto na Figura 14.

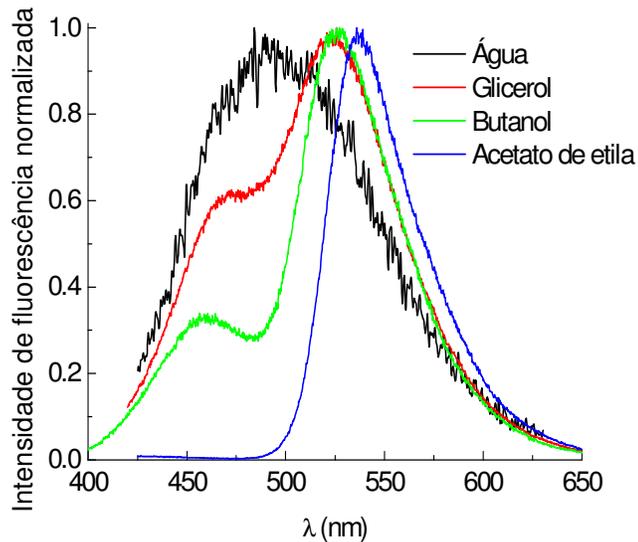


Figura 13. Espectro normalizado de emissão da fisetina, 20 $\mu\text{mol/L}$, em diferentes solventes, com $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$.

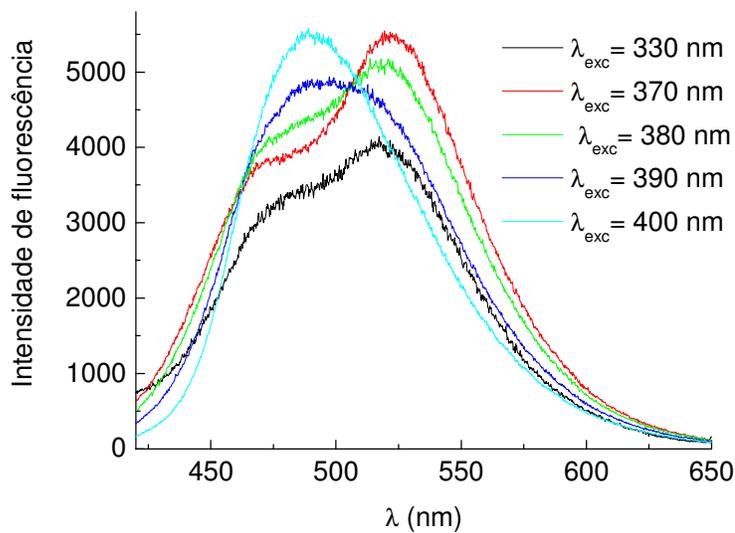


Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência da fisetina em glicerol, variando-se o comprimento de onda de excitação.

Tabela 6 - Comprimentos máximos de emissão de fluorescência da fisetina em diversos solventes de acordo com sua constante dielétrica (D)

Solvente	Constante dielétrica (D)	λ excitação (nm)	λ máx emissão (nm)	
Clorofórmio	4,8	320-390 ^a	440	526
Acetato de etila	6,0	330-380 ^a	n	536
Dimetilamina	6,3	370, 390 ^b	n	523, 543
THF	7,5	380, 400 ^b	448, 475	542
Diclorometano	9,1	330-400 ^a	435	530
Butanol	17,8	350-400 ^a	458	526
Etanol	24,3	380, 400 ^b	482, 486	524, n
Metanol	33,0	330-420 ^a	470	520
Acetonitrila	37,5	380, 400 ^b	475, 484	534, 528
DMF	38,3	390, 410 ^b	490	548, 562
Glicerol	42,5	380, 400 ^b	470, 490	522
Água	80,0	350-420 ^a	492	n

(a = em todo o intervalo de excitação não variou o λ máx de emissão; b = o primeiro λ de excitação corresponde ao primeiro λ máx emissão, idem para o segundo λ , para as duas colunas de λ máx emissão; n = não foi observada fluorescência com o λ de excitação correspondente)

Estas medidas em estado estacionário evidenciam que a fisetina apresenta um comportamento de emissão dual de fluorescência, sendo a primeira banda atribuída à forma normal e a última à ocorrência de transferência intramolecular de próton no estado excitado (ESIPT), sendo, portanto, a emissão do tautômero (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999; SYTNIK, GORMIN & KASHA, 1994).

A discussão dos resultados da Figura 13 e da Tabela 6 torna-se complexa, pois os valores máximos para a emissão de fluorescência da fisetina deste trabalho diferem um pouco do descrito na literatura. Em etanol os máximos evidenciados a 482 e 524 nm estão deslocados em relação aos relatados por Sytnik e colaboradores (1994) (463 e 530 nm) e por Guharay e colaboradores (1999) (476 e 532 nm). Em metanol observamos máximos de fluorescência em 470 e 520 nm, porém a literatura descreve em 481 e 527 nm (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999). Em acetonitrila, os

máximos deste trabalho localizam-se em 475 e 534 nm e na literatura em 426 e 536 nm (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999). Em acetato de etila há apenas uma banda em 536 nm, já na literatura há duas bandas relatadas em 414 e 538 nm (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999).

A comparação acima mostra que as alterações mais significativas dos comprimentos de onda máximos de emissão estão na fluorescência da forma normal, sendo a maior diferença de 49 nm para a fisetina em acetonitrila. A emissão da forma normal dependendo do solvente é um ombro da banda do tautômero (Figura 13). Como pode ser facilmente observado, a sobreposição das bandas pode ser um dos fatores que explica, de certa forma, a variação das medidas experimentais descritas neste trabalho com os valores já encontrados na literatura. Outro fator importante que pode ter contribuído é a presença de água nos solventes alterando a polaridade dos mesmos.

Tal justificativa é relevante, pois a alteração da polaridade do meio em que a fisetina está localizada ocasiona comportamentos interessantes. Na série de solventes estudados (enumerados em ordem crescente de polaridade) há uma tendência de deslocamento para maiores comprimentos de onda da fluorescência da forma normal da fisetina. Em butanol o máximo da emissão de fluorescência da estrutura normal da fisetina aparece em 458 nm, enquanto em água em 492 nm (Figura 13). Quando se separa a série em solventes próticos e apróticos, nota-se em água a sobreposição das bandas das espécies normal e tautomérica da fisetina, que gradualmente se transforma em emissão dual em glicerol, metanol, etanol e butanol, além dos apróticos capazes de formar ligação de hidrogênio com a sonda (DMF e acetonitrila). Por fim, nos solventes apróticos, como diclorometano, tetrahidrofurano, acetato de etila e clorofórmio, obtém-se somente emissão da forma tautomérica.¹

Assim, pode-se sugerir que na presença de ambientes hidrocarbônicos, como o acetato de etila, a fisetina não apresenta o comportamento de emissão dual e apenas a banda do tautômero é notada, o que indica que não há barreira para a transferência de próton. Portanto, a velocidade de transferência de próton da fisetina é extremamente

¹ Não são todos os solventes que estão mostrados na Figura 13.

rápida, quando comparada com a velocidade intrínseca de retorno ao estado fundamental (McMORROW & KASHA, 1984; STRANDJORD & BARBARA, 1985).

Nesses solventes apróticos, a ligação de hidrogênio intramolecular de flavonóides formada entre a hidroxila e a carbonila, Figura 2, resulta na formação de um anel quelato de cinco membros, o íon benzopirílio. Neste íon, a ligação é especialmente susceptível a perturbações de hidrogênio devido à sua fraca intensidade (McMORROW & KASHA, 1984; WOOLFE & THISTLETHWAITE, 1981). Decorrente disso, a banda de emissão de fluorescência é mais intensa e há um grande deslocamento de Stokes, entre os espectros de absorção e emissão da fisetina (McMORROW & KASHA, 1984).

Woolfe e Thistlethwaite (1981) em estudos de modelagem molecular sugeriram que em solventes próticos pode ser formado um complexo aparentemente estável pelo contato, envolvendo um anel quelato de sete membros, entre a 3-HF e o solvente. Analogia similar pode ser feita para a fisetina. As ligações de hidrogênio intermoleculares no complexo devem ser relativamente fortes, pois são curtas e mais lineares que em um anel quelato de cinco membros formado pela ligação de hidrogênio intramolecular. Além disso, os autores previram que os mecanismos de transferência dos prótons exibem diferentes energias de ativação, sendo estas maiores no anel quelato de cinco membros, Figura 15.

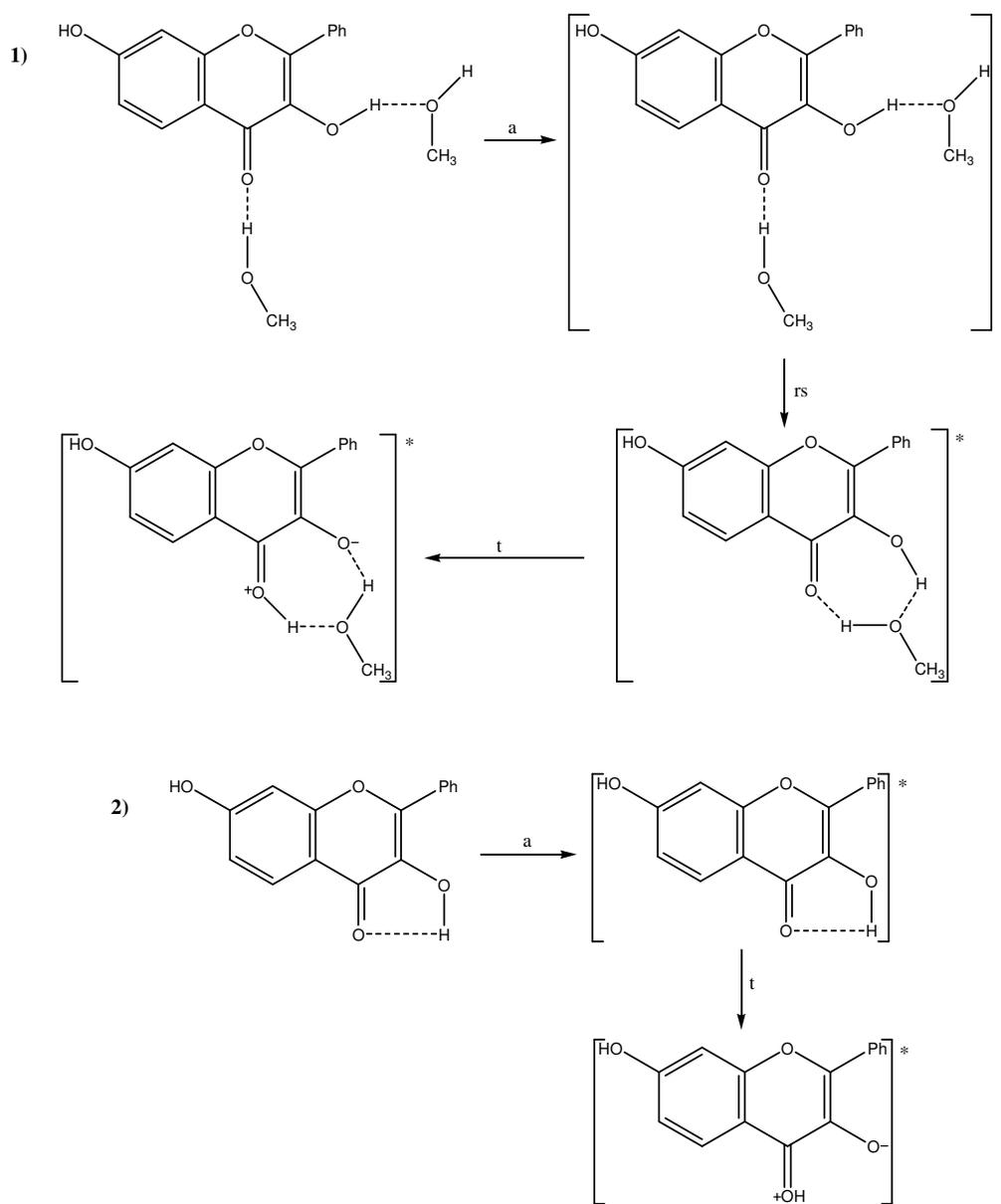


Figura 15. Mecanismo proposto para a transferência de próton da fisetina no estado excitado em (1) metanol e (2) solventes de hidrocarbonetos. A abreviatura usada indica os seguintes processos envolvidos: a = absorção, rs = reorientação do solvente, t = tautomerização. (WOOLFE & THISTLETHWAITE, 1981).

Os resultados expostos da dependência da fisetina em relação ao solvente concordam com as mudanças acentuadas no momento de dipolo (μ) entre os estados fundamental (S_0) e excitado singleto (S_1) (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999) confirmadas pelos cálculos teóricos apresentados nesta dissertação de

mestrado. Os valores de μ estimados são 2,3879 D e 5,7630 D para S_0 e S_1 , respectivamente, e para o tautômero de 1,8806 D (GUZZO *et al.*, 2006).

Em resumo, o comportamento de emissão dual de fluorescência da fisetina é observado tanto em solventes aceptores de ligação de hidrogênio (dioxano e acetonitrila), quanto em solventes doadores-aceptores de ligação de hidrogênio (metanol, butanol e 1-propanol) (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999), Figura 13.

Além dos efeitos espectrais, outras propriedades fotofísicas permitem caracterizar melhor o comportamento da sonda. O resultado experimental encontrado indica que o rendimento quântico de fluorescência do flavonóide em água ou em soluções alcoólicas é significativamente menor que em soluções de hidrocarbonetos. Neste caso, as rotas radiativas de desativação do estado excitado sofrem interferência por causa das interações por ligação de hidrogênio sonda/solvente.

A Figura 14 ilustra a variação do espectro de emissão da fisetina dependente do comprimento de onda da excitação. Uma hipótese para a interpretação desses resultados seria em termos da variação do ambiente que rodeia o soluto, conforme a mesma linha de raciocínio seguida anteriormente para ambientes próticos e apróticos, usando como exemplo o glicerol. Os primeiros ambientes (em comprimentos de onda de excitação menores) seriam parecidos com solventes hidrocarbônicos, no qual a fisetina estaria mais próxima de grupos alquila e hidroxila. Já com o aumento do comprimento de onda de excitação, o soluto estaria rodeado pelos grupamentos hidroxila predominantemente, então em um ambiente mais polar. Em adição à ligação de hidrogênio intramolecular da fisetina, tem-se a presença de ligações de hidrogênio intermoleculares com maior intensidade. Devido à alta viscosidade do glicerol (934 m(Pa.s)), este solvente atua como um meio rígido que impede a reorientação dipolar da gaiola do solvente ao redor do estado excitado do fluoróforo. Desta forma, alterando-se o comprimento de onda de excitação da sonda, evidencia-se a emissão somente da forma normal da fisetina ou intensifica-se sua emissão dual de fluorescência.

Em resumo, como exposto no decorrer do texto, há dois tipos de interações intermoleculares responsáveis pelas mudanças espectrais do fluoróforo em meio

solvatado. Primeiramente, uma interação universal decorrente da influência coletiva do solvente como meio dielétrico, que depende da constante dielétrica, ϵ_s , e do índice de refração, n . Em segundo, há as interações específicas em certos solventes, como a ligação de hidrogênio, complexos ou exciplexos, que são resultado das propriedades do solvente e do soluto (LAKOWICZ, 1999; REICHARDT, 1979; REICHARDT, 1988).

Neste sentido, pode-se tentar fazer uma correlação entre a medida de fluorescência da fisetina e alguns parâmetros característicos dos solventes. A escala de polaridade escolhida neste trabalho para analisar o efeito do solvente foi a polarizabilidade de orientação, Δf , que relaciona a constante dielétrica e o índice de refração:

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (12)$$

Construíram-se gráficos da área de fluorescência em função do parâmetro Δf (Figuras 16 e 17).

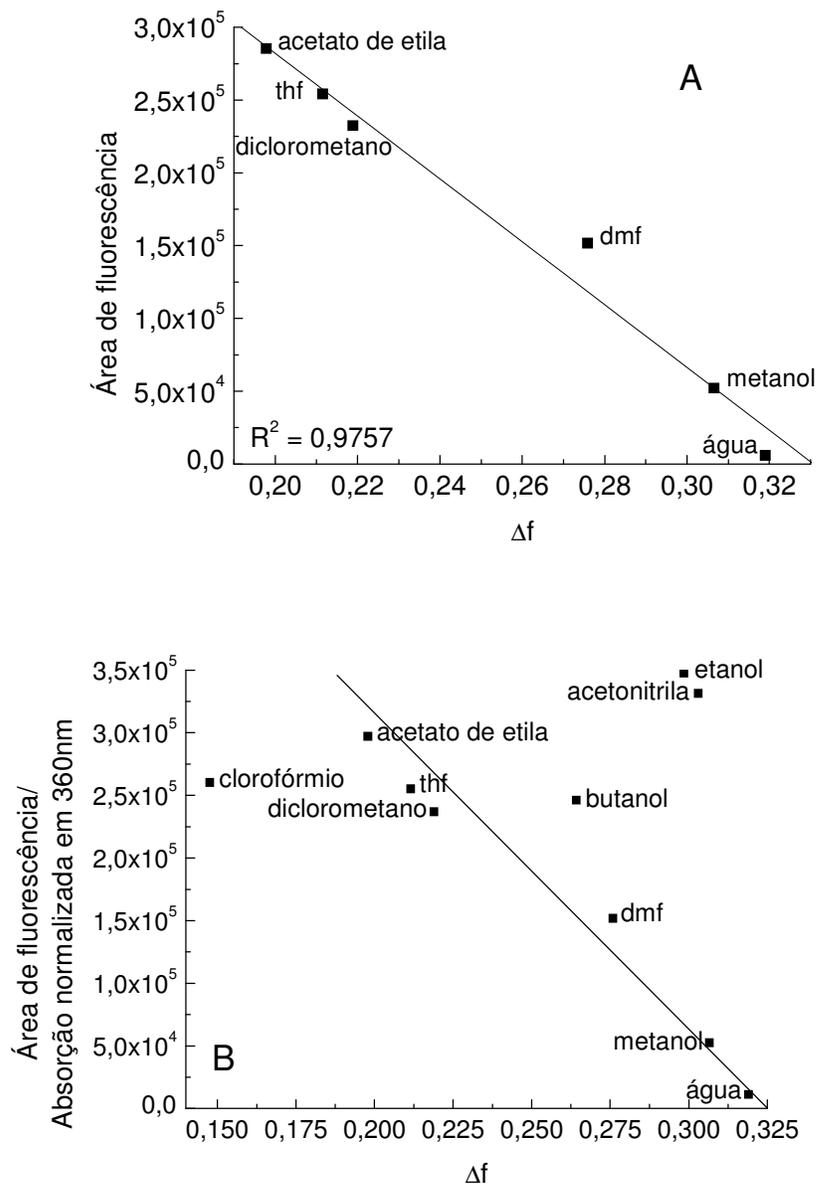


Figura 16. Gráficos da (A) área de fluorescência da fisetina e da (B) área de fluorescência sobre a absorção normalizada em 360 nm da fisetina versus a polarizabilidade do solvente.

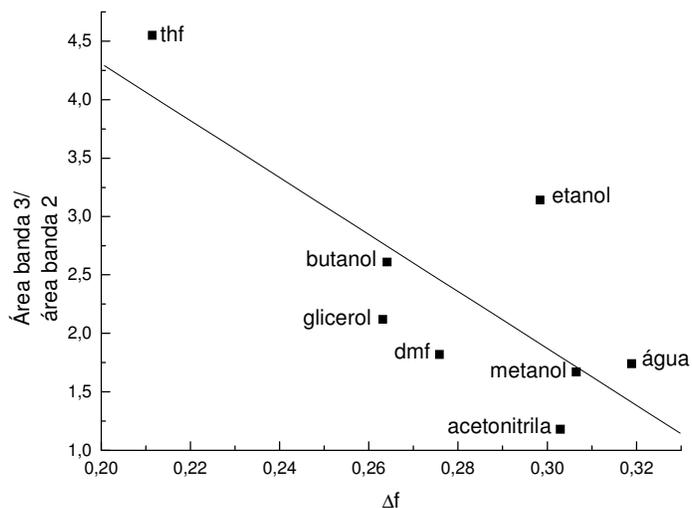


Figura 17. Gráfico da área de fluorescência da banda 3 sobre a da banda 2 da fisetina versus a polarizabilidade do solvente.

A Figura 16A mostra uma tendência de comportamento entre a área de emissão de fluorescência com a polarizabilidade do solvente. Considerando-se, inicialmente, a emissão de fluorescência como um todo, observa-se que há uma diminuição desta área, conforme a polarizabilidade do solvente aumenta. Se colocarmos todos os solventes investigados não se obtém uma boa correlação. Um dos fatores para não encontrarmos uma boa correlação entre a área de fluorescência e a polarizabilidade de todos os solventes discutidos na Tabela 6 é devido à presença de mais do que uma espécie fluorescente, de acordo com o solvente utilizado. Pode-se encontrar a emissão exclusiva da forma normal ou do tautômero e dependendo do solvente utilizado, a emissão da forma desprotonada da fisetina. Em virtude desta complexidade, tentou-se restringir a área de fluorescência emitida quando a amostra é excitada em 360 nm (Figura 16B) e analisar a razão entre as áreas de fluorescência das bandas 3 e 2 (Figura 17). Novamente, nota-se uma tendência da redução da intensidade de fluorescência quando se aumenta a polarizabilidade do solvente.

Uma nova tentativa para encontrar alguma correlação entre a fluorescência das espécies de fisetina e os solventes foi realizada considerando-se a viscosidade (Figura 18). Aumentando a rigidez do sistema como em glicerol, diminui-se a probabilidade de

retorno ao estado fundamental devido ao choque entre as moléculas. Por isso, há uma tendência em aumentar a intensidade de fluorescência conforme a viscosidade do solvente aumenta.

Se fossem utilizados outros parâmetros como o rendimento quântico da sonda, talvez obtivéssemos melhores correlações entre fluorescência e solventes. Todavia, os resultados apresentados confirmam a complexidade do sistema estudado, devido à influência do solvente nas diversas estruturas químicas da fisetina no estado excitado.

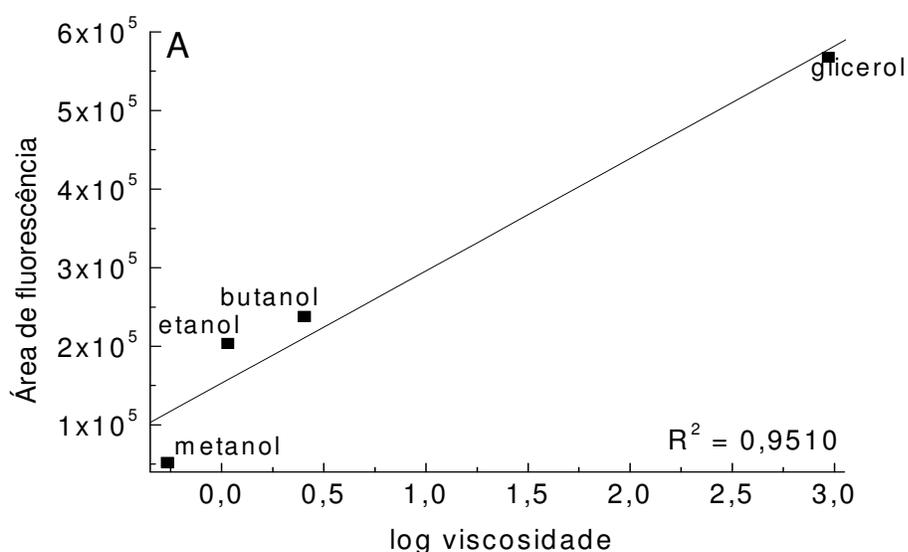


Figura 18. Gráfico da área de fluorescência da fisetina versus a viscosidade do solvente, (viscosidade = $m(Pa.s)$).

IV.2.2 Fluorescência Resolvida no Tempo da Fisetina em Diversos Solventes

Neste trabalho, realizou-se a análise do tempo de vida da fisetina em diversos solventes próticos e apróticos para adicionar informações sobre a dinâmica dessa sonda no estado excitado. As medidas foram realizadas em um equipamento de picossegundos, excitando-se a 305 (para a fisetina em água) ou 328 nm (para a fisetina nos demais solventes). Os tempos de decaimento da fisetina em diversos meios estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Componentes do tempo de vida no estado excitado da fisetina em diferentes solventes

Parâmetros	Clorofórmio	Acetato de etila	THF	Dicloro metano	Butanol
Constante dielétrica (D)	4,8	6,0	7,5	9,1	17,8
λ_{em} (nm)	526	510	542	528	525
τ (ps)	836 \pm 41	1264 \pm 15	1142 \pm 9	799 \pm 9	1687 \pm 28
χ^2	1,00	1,05	1,478	0,994	1,111
Resíduo (\pm)	6,9	6,5	10,1	5,1	8,9

Tabela 8 - Componentes do tempo de vida no estado excitado da fisetina em diferentes solventes

Parâmetros	Etanol	Metanol	Acetonitrila	DMF	Glicerol	Água
Constante dielétrica (D)	24,3	33	37,5	38,3	42,5	80
λ_{em} (nm)	480	510	533	550	521	510
τ_1 (ps)	1474 \pm 6	1514 \pm 50	745 \pm 20	981 \pm 21	1687 \pm 111	835 \pm 41
τ_2 (ps)					3149 \pm 44	
χ^2	1,132	1,006	0,978	1,455	1,100	1,00
Resíduo (\pm)	8,4	4,5	5,4	7,4	4,6	9,0
P_1 (%)					19,70	
P_2 (%)					80,30	

Os decaimentos cinéticos experimentais do tempo de vida junto com o perfil do instrumento e das curvas calculadas de ajuste dos pontos experimentais do decaimento cinético da fisetina em solução alcoólica e metanólica estão mostrados nas Figuras 19, 20 e 21. A obtenção da última curva (do ajuste dos resultados experimentais) é feita por um processo iterativo de reconvolução dos quadrados mínimos (χ^2) e usualmente gerada a partir do algoritmo de Marquardt (MARQUARDT, 1963; BOHNE, REDMOND & SCAIANO, 1991). Em outras palavras, a análise do decaimento cinético experimental do tempo de vida de um composto gera simultaneamente um gráfico da variação dos resíduos ao redor dos pontos experimentais.

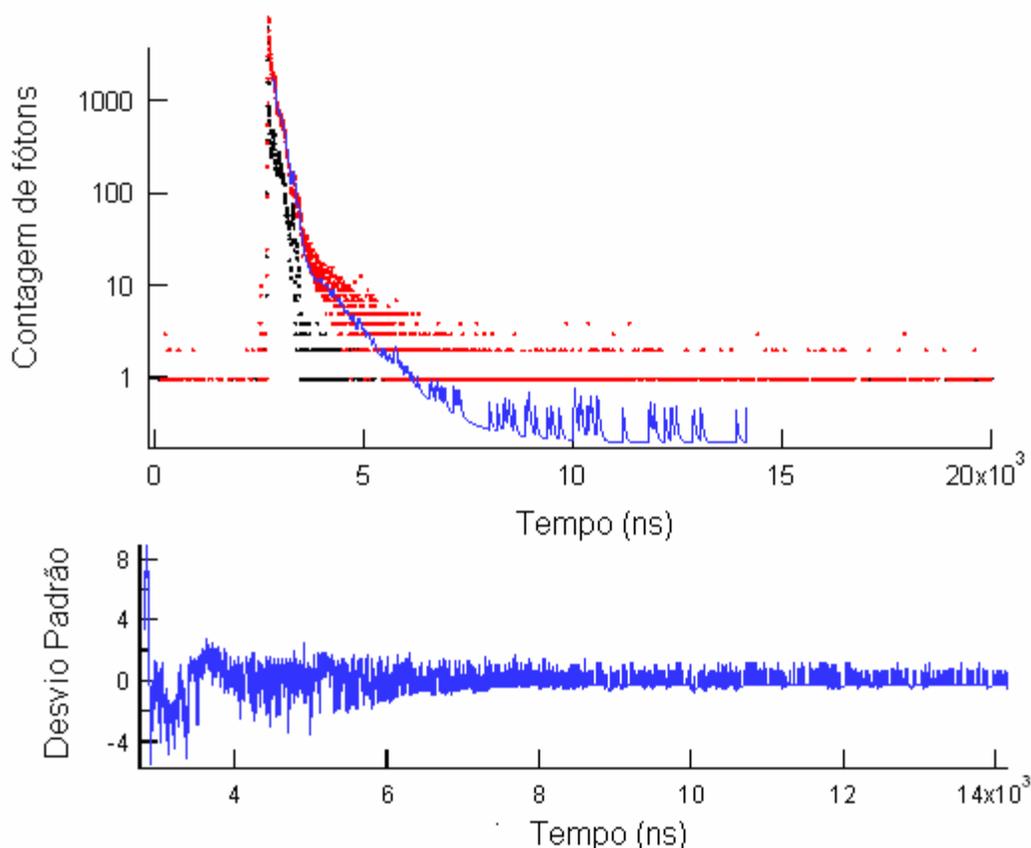


Figura 19. Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina $25 \mu\text{M}$ em solução aquosa. (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul, a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000. **O ajuste dos dados experimentais deste gráfico desconsiderou os primeiros pontos.**

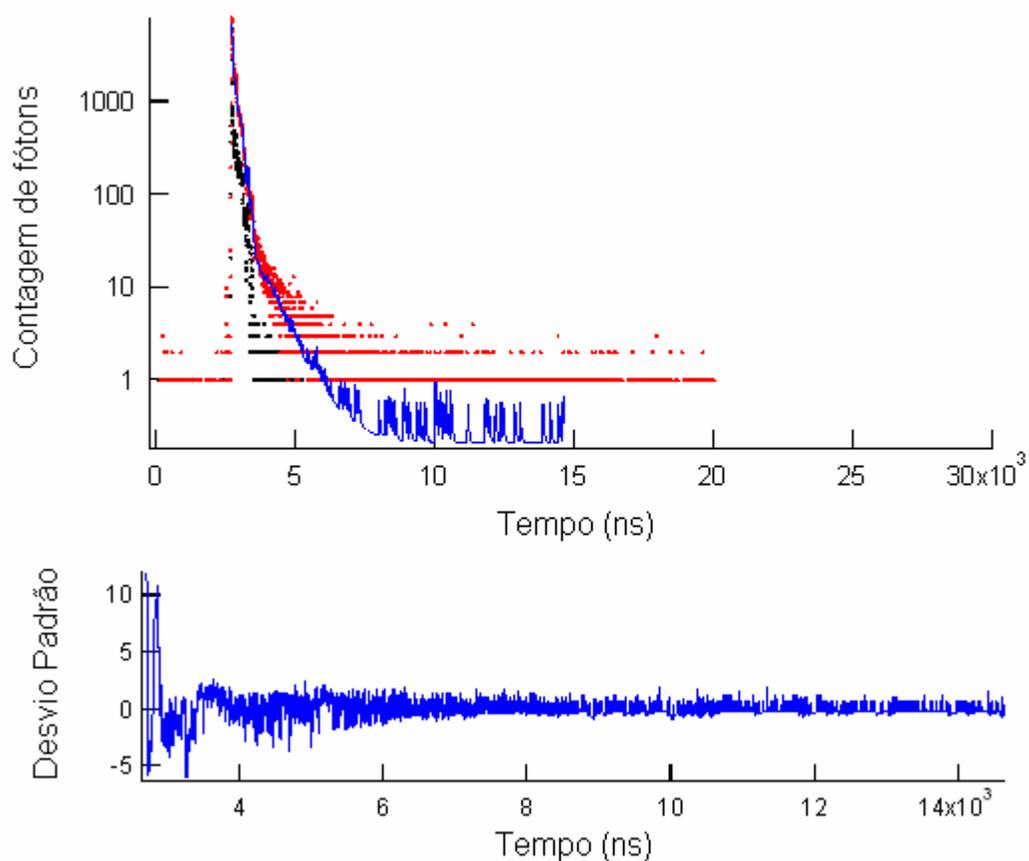


Figura 20. Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina 25 μM em solução aquosa. (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul, a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000. **O ajuste dos dados experimentais foi feito considerando todos os pontos experimentais.**

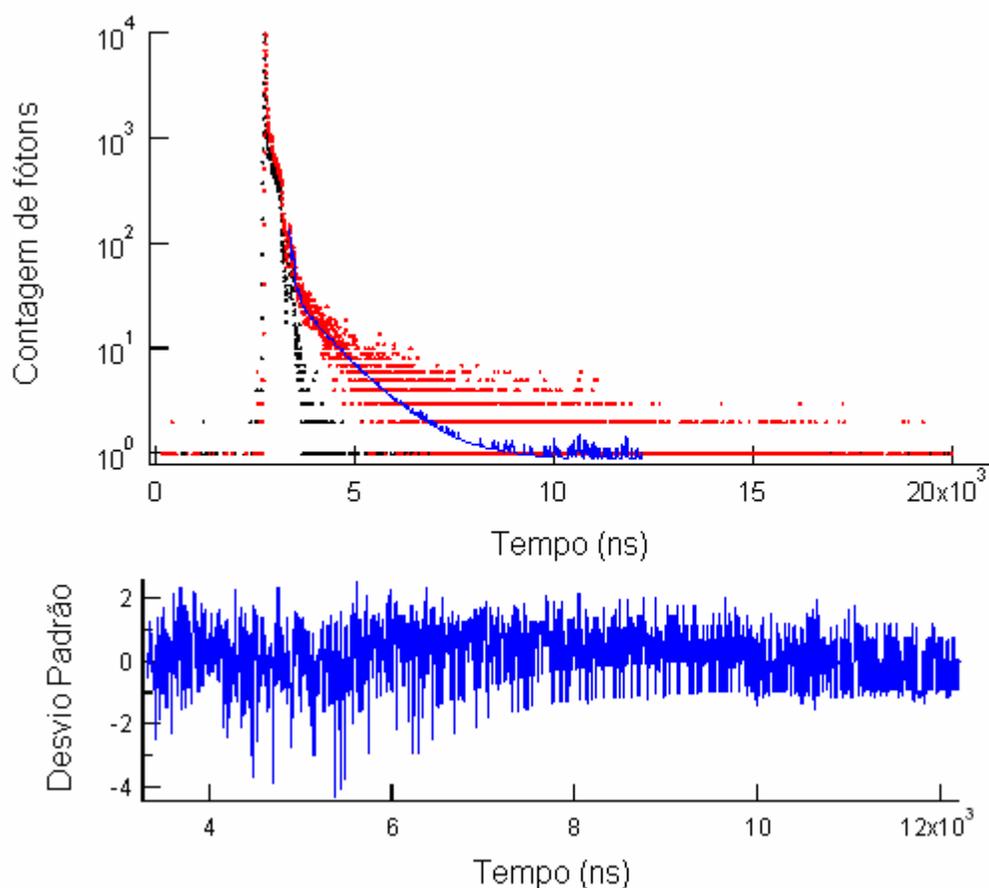


Figura 21. Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina $25 \mu\text{M}$ em metanol. (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul, a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000.

Pelas Figuras 19, 20 e 21, nota-se que a medida realizada para registro do decaimento cinético experimental do tempo de vida da fisetina em diversos solventes não fez a aquisição de uma contagem elevada de número de fótons, como o recomendado para a determinação precisa do valor experimental de tempo de vida (ao redor de $10^5 - 10^6$ no canal máximo) (BIRCH & IMHOF, 1991). O valor máximo fixado na época da realização deste experimento foi de 8000. Foram os primeiros resultados que obtivemos com este sistema e, como o equipamento localiza-se em outro laboratório não nos foi possível repetir constantemente a realização destas medidas. Por este motivo, temos a variação dos valores de tempo de vida observado para a fisetina na

presença de diferentes solventes, mostrados nas Tabelas 7 e 8. Na Figura 20 analisou-se o perfil completo de decaimento da fisetina em água e foi possível observar que a interferência é muito grande do sinal da lâmpada nos pontos acumulados no canal máximo da fotomultiplicadora. Outro fato que contribuiu para um registro indevido do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina em solução aquosa é o seu baixo rendimento quântico (GUZZO *et al.*, 2006). Isto dificultou a análise de χ^2 , por isso optamos em analisar os decaimentos como mostrado na Figura 19, desconsiderando pontos iniciais pertinentes ao canal máximo e que refletiriam somente o perfil do instrumento.

Desta forma, o melhor ajuste encontrado para analisar os decaimentos da fisetina nesses solventes foi bi-exponencial. No entanto, devido ao erro experimental acima, nesta análise encontramos tempos de vida menores que a resolução temporal do equipamento do Prof. Dr. Amando Ito (65 ps), refletindo o espalhamento do instrumento. Portanto, não apresentamos todos os valores de porcentagem de população no estado excitado de cada espécie.

A fluorescência resolvida no tempo mostra que a polaridade do solvente provoca perturbações na dinâmica da fisetina no estado excitado, como também visto para a fluorescência estática. Nos dados de fluorescência estática com excitação em 330 nm da fisetina nos solventes: clorofórmio, acetato de etila², diclorometano e metanol, mostrados no item IV.2.1, as bandas de emissão das estruturas normal e tautomérica aparecem na faixa de 435 a 470 e 520 a 536 nm, respectivamente. Portanto, neste experimento de fluorescência resolvida no tempo colheu-se a emissão de fluorescência no comprimento de onda de emissão do tautômero (Tabelas 7 e 8). Nesses solventes o τ varia entre 745 e 1687 ps. Nos solventes diclorometano, acetonitrila, DMF, água e clorofórmio, a fisetina apresenta tempos de vidas próximos, entre 745 e 981 ps. Em THF e acetato de etila, os tempos de vida são da ordem de 1200 ps. Os tempos mais longos encontrados para a fisetina (1474 a 1687 ps) são em butanol, etanol, metanol e glicerol.

² A emissão da forma normal da fisetina em acetato de etila é praticamente imperceptível na fluorescência estática.

Seria preciso analisar mais criteriosamente estes resultados. Porém, ainda é necessário repetir a realização deste experimento, deixando a aquisição dos fótons únicos por muito mais tempo para melhor definição do perfil do decaimento cinético do tempo de vida da sonda nestes micro-ambientes.

Provavelmente, a suposição sobre qual estrutura no estado excitado da fisetina é responsável por qual tempo de vida seria possível se houvessem dados a respeito da monitoração do comportamento dos tempos de vida da fisetina na faixa de comprimento de onda da forma normal. Esta monitoração não foi realizada porque a fisetina apresenta uma emissão relativamente baixa nessa faixa, que não foi detectada pelo equipamento utilizado.

A literatura (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999) descreve que a fisetina em etanol apresenta um decaimento bi-exponencial com dois tempos de vida de 0,32 e 3,04 ns, quando excitada em 370 nm, decorrentes dos dois tipos de complexos de ligação de hidrogênio com as moléculas do solvente, contribuindo para uma emissão tautomérica, além da forma normal. Guharay, Dennison e Sengupta (1999) ainda relataram que, apesar de terem feito uma suposição sobre uma possível interpretação para os resultados experimentais, serão necessários investigações mais detalhadas para confirmação desta hipótese. Além disso, neste trabalho, Guharay, Dennison e Sengupta (1999) descrevem que a resolução temporal do equipamento de fluorescência resolvida no tempo é da ordem de aproximadamente 1,2 a 1,4 ns. Por este motivo, cremos que os valores determinados por este trabalho de Mestrado tendem a ser mais confiáveis do que os anteriormente relatados.

IV.3 Estudo do Complexo de Inclusão Fisetina - β -CD

IV.3.1 Medidas Espectroscópicas dos Complexos

Foram realizadas medidas fotofísicas da fisetina em presença da β -CD em pHs ácido, neutro e básico, para determinar a constante de inclusão e o comportamento espectral de cada sistema. A fisetina é uma molécula polihidroxílica, por isso, é importante avaliar seu comportamento em função das alterações do pH do meio.

Confirmou-se que em meio ácido o comportamento de cada complexo é similar ao meio neutro, uma vez que os valores de pKa da fisetina são altos (JOVANOVIĆ *et al.*, 1994), Tabela 9, indicando que mesmo em meio neutro todas as hidroxilas já estão protonadas. Já em meio básico, com as hidroxilas desprotonadas, a fisetina apresenta uma mudança espectral muito significativa comparada aos meios ácido e neutro. As Figuras 22 e 23 mostram como a fisetina se comporta em função da concentração de β -CD (de zero a 12 mmol/L) nos espectros representativos, respectivamente, da absorção no UV-Vis e da emissão de fluorescência da fisetina com β -CD em meio neutro, ácido (A) e básico (B).

Tabela 9 - Valores de pKa de cada hidroxila da fisetina (JOVANOVIĆ *et al.*, 1994)

Posição da Hidroxila	pKa
3	-
3'	10,31
4'	13,20
7	8,87

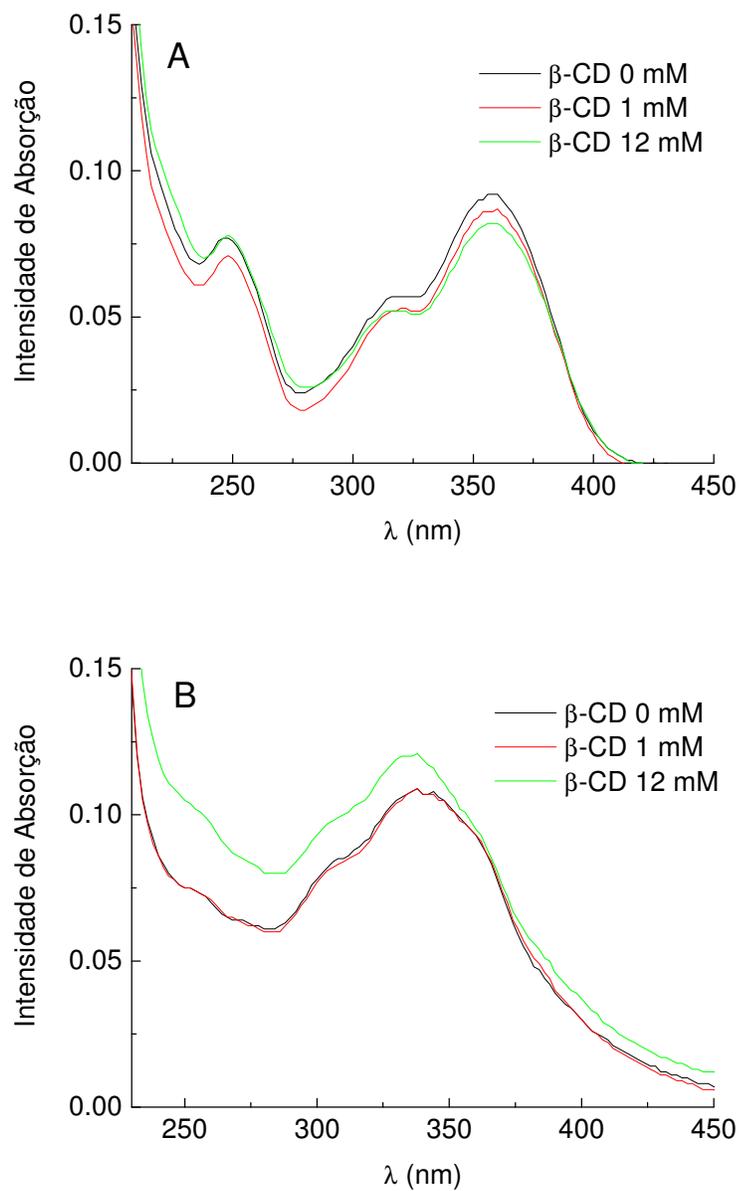


Figura 22. Espectros de absorção UV-Vis da fisetina $5 \mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\beta\text{-CD}$ em pHs 4,3 (A) e 11,5 (B).

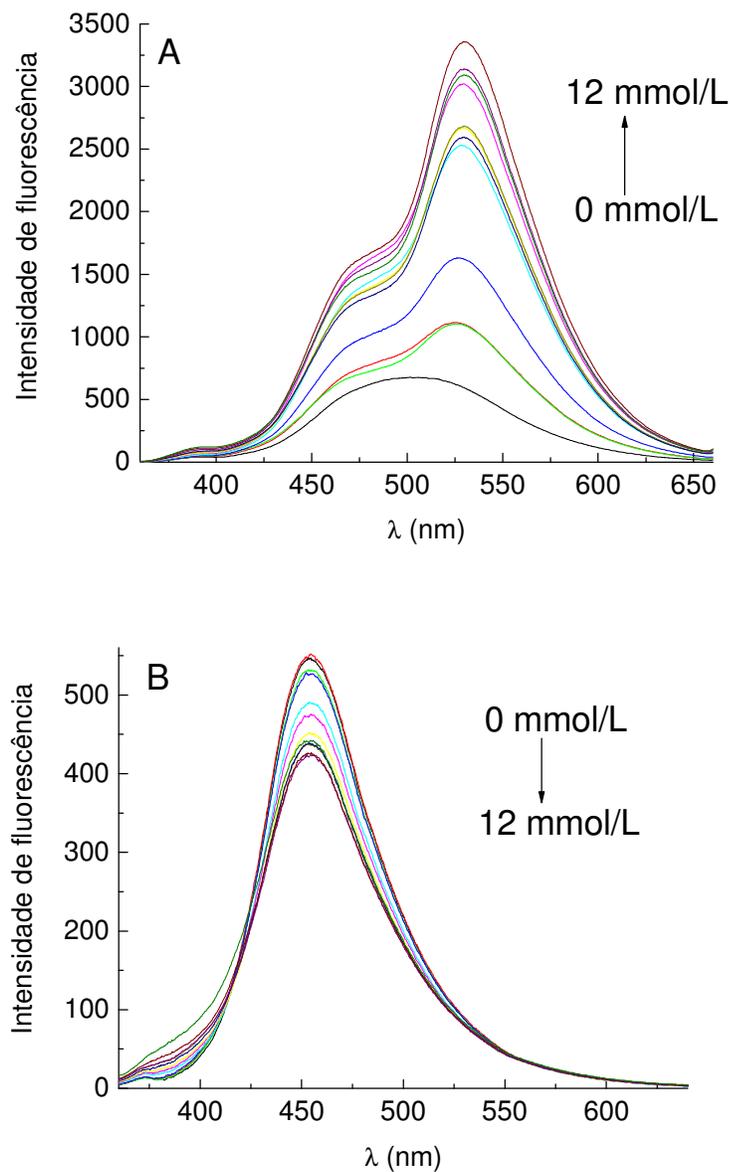


Figura 23. Espectro de emissão de fluorescência da fisetina 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\beta\text{-CD}$ em pHs (A) neutro e (B) 11,5, com $\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$.

A fisetina, em pH 4,3 ou 6,5, apresenta uma banda de emissão de fluorescência única e larga (Figura 23A) atribuída a forte sobreposição das emissões das formas normal e tautomérica, Figura 2 (GUHARAY, DENNISON & SENGUPTA, 1999).

Pela Figura 23A, nos meios neutro e ácido, a adição de β -CD provoca um aumento na intensidade de fluorescência da fisetina e seu comportamento de emissão dual se torna cada vez mais evidente. Isto indica que o aumento da concentração de β -CD promove a formação do complexo de inclusão com a fisetina (complexo hóspede-hospedeiro). A cavidade interna da CD pode atuar de diversas maneiras. Primeiramente, pode promover o comportamento de emissão dual devido ao seu ambiente hidrofóbico, cuja polaridade é diferente da solução aquosa e mais parecida com a de uma solução alcoólica (OKANO *et al.*, 2001). Além disso, pode proteger a desativação do estado excitado da molécula da fisetina promovida por colisões internas e colisões com as moléculas de água no interior da solução. Desta forma, a intensificação da emissão de fluorescência é observada juntamente com o aumento do rendimento quântico.

Em meio neutro, a fluorescência por transferência de próton da fisetina é predominante sobre a forma normal, onde $\lambda_{\text{máx}}$ do tautômero para o complexo com a β -CD é de 530 nm. A intensidade da banda da estrutura tautomérica para o complexo fisetina- β -CD é o dobro da banda da estrutura normal (Figura 23A).

A alteração do meio em que o complexo é formado ocasiona uma modificação no comportamento espectroscópico da fisetina. Em meio básico, conforme se aumenta a concentração de β -CD em solução obtém-se uma diminuição no sinal de emissão de fluorescência e apenas uma única banda é observada com $\lambda_{\text{máx}}$ em 455 nm. Devido à basicidade do meio, a banda pode ser atribuída a fisetina desprotonada e, portanto, a ESIPT não pode ocorrer. Além disso, a fluorescência é muito mais intensa sob condições ácidas ou neutras do que básicas. Em soluções básicas, Figura 23B, a interação entre a fisetina desprotonada e as moléculas do solvente é mais forte, aumentando a constante de velocidade para as conversões internas, fazendo destas a principal rota para a desativação do estado excitado. Por conseqüência disto, em condições básicas, a intensidade de fluorescência da fisetina decresce com o aumento da concentração de β -CD.

Os cálculos teóricos realizados para o complexo da fisetina desprotonada com a β -CD (GUZZO *et al.*, 2006) simulando uma condição de pH 12, mostraram uma

distorção na estrutura da β -CD e fortes interações entre o fenóxido e os grupos OH presentes na entrada da cavidade da β -CD. Estas interações diminuem a densidade eletrônica da fisetina e, então, a fluorescência da fisetina desprotonada é menor na presença de β -CD.

A partir destes espectros é possível calcular a constante de associação do estado fundamental da sonda com a CD (K), através do ajuste dos pontos experimentais do gráfico da variação do sinal obtido quando a solução contém somente a sonda e na presença desta mesma sonda e concentração variável de ciclodextrina em função da concentração da ciclodextrina. Emprega-se a equação de Benesi-Hildebrand (BENESI & HILDEBRAND, 1949) para ajustar os dados experimentais:

$$\Delta I = \frac{[Fis]_T \cdot \Delta x \cdot K \cdot [CD]}{1 + K \cdot [CD]} \quad (13)$$

Os comprimentos de ondas utilizados variaram na faixa de 250 a 400 nm nos experimentos de absorção no UV-Vis e de 420 a 580 nm para a fluorescência, nos diferentes pHs. Os melhores resultados foram obtidos pela técnica de emissão de fluorescência. O complexo fisetina- β -CD em ambos os meios apresentaram comportamento semelhante ao mostrado na Figura 24A, em todos os comprimentos de onda investigados.

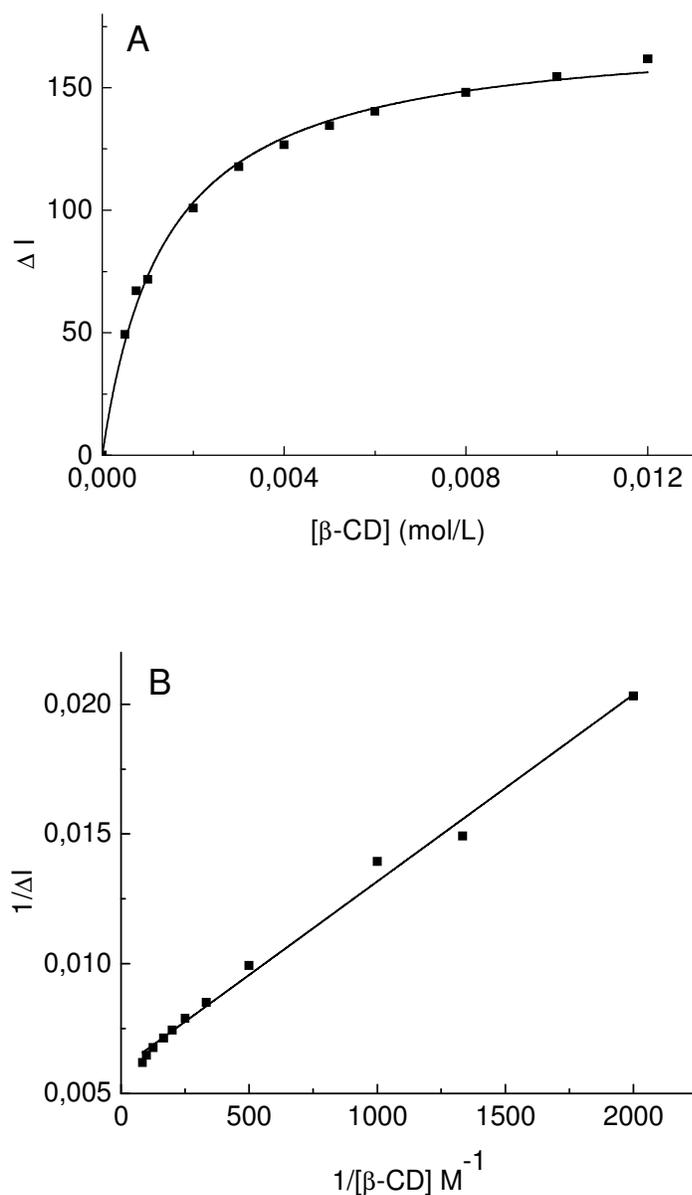


Figura 24. (A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da fisetina protonada em função da concentração de β -CD, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand para ajuste dos pontos experimentais. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$.

As análises feitas para os dados experimentais obtidos mostraram uma relação linear no gráfico do duplo inverso para ambos os complexos, apresentando coeficientes de correlação linear (R^2) maiores que 0,9935. Portanto, os resultados indicaram uma

provável estequiometria do complexo 1:1 (Fis:CD) para os ambientes ácidos, neutros e básicos. Também foi analisado o gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[CD]^2$ para averiguar a possibilidade de complexos de ordem maior (1:2), especialmente para as maiores concentrações de CD. Porém, o complexo fisetina- β -CD não apresentou um bom ajuste linear para este gráfico, descartando esta possibilidade.

Os valores de K obtidos estão mostrados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 - Constantes de inclusão dos complexos em diferentes pHs

	Diâmetro interno (nm)	K meio neutro/ ácido [(mol/L) ⁻¹]	K meio básico [(mol/L) ⁻¹]
β -CD	0,78	900 \pm 100	240 \pm 90

A constante de inclusão assim determinada para o complexo fisetina/ β -CD possui valor maior em meio neutro ou ácido (900 \pm 100 (mol/L)⁻¹) do que em meio básico (240 \pm 90 (mol/L)⁻¹) à 23 °C, como pode ser visto na Tabela 10, apesar de em ambos os espectros ocorrerem significativas alterações das intensidades de fluorescência. A eficiência da complexação entre cetonas aromáticas e CD é determinada pelo tamanho da molécula hóspede e da cavidade interna da CD (ATWOOD *et al.*, 1996). Em meio ácido, a fisetina apresenta uma constante de complexação similar à inclusão da xantona (MURPHY *et al.*, 1999) (1100 \pm 200 (mol/L)⁻¹) e da flavona (CHRISTOFF, OKANO & BOHNE, 2000) (1090 \pm 80 (mol/L)⁻¹) em β -CD. Já uma molécula menor como a cromona apresenta uma menor constante de complexação (240 \pm 40 (mol/L)⁻¹) (CHRISTOFF, OKANO & BOHNE, 2000).

O alto grau de interação em meio neutro ou ácido pode ser atribuído à dimensão da cavidade da β -CD, ideal para abrigar a molécula da fisetina na forma protonada. A menor interação em meio básico, com as hidroxilas desprotonadas da fisetina, é decorrente da melhor solubilização da fisetina em solução ao invés de se inserir na cavidade hidrofóbica da CD. Além disso, esses processos de equilíbrio são dinâmicos, permitindo ocorrer a entrada e a saída da molécula hóspede na CD.

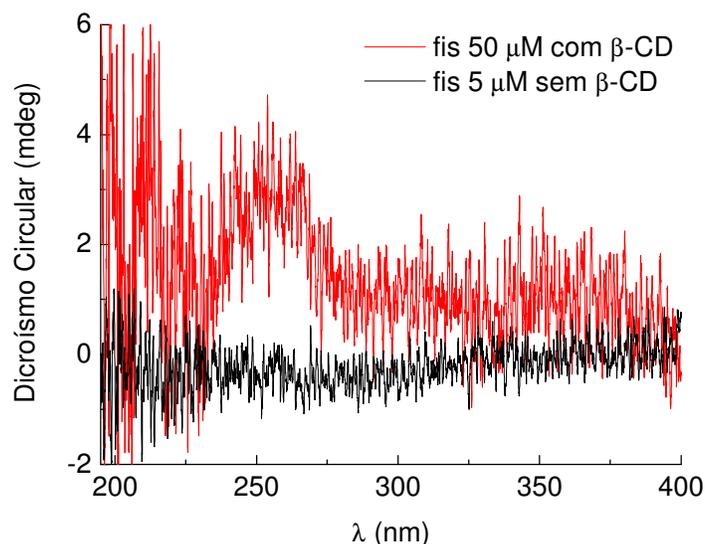


Figura 25. Espectro de dicroísmo circular da fisetina protonada nas concentrações 5 $\mu\text{mol/L}$ em solução aquosa (preto) e 50 $\mu\text{mol/L}$ na presença de $\beta\text{-CD}$ 12 mmol/L (vermelho).

O sinal induzido de dicroísmo circular (Figura 25) surge quando há a formação de um complexo entre a sonda e a ciclodextrina. Obteve-se sinal induzido para a $\beta\text{-CD}$. A molécula de fisetina é aquiral e não apresenta sinal de dicroísmo circular. O sinal e a intensidade do efeito Cotton revelam a orientação adotada pela molécula hóspede quando inserida na cavidade interna da CD (ATWOOD *et al.*, 1996). O sinal positivo, como visto na Figura 25, descreve que o momento de dipolo elétrico da fisetina coincide com o eixo de simetria da CD e condiz com os dados encontrados pelos cálculos teóricos realizados para o sistema fisetina- $\beta\text{-CD}$, onde há a possibilidade de inserção quer seja pela fenila como pela cromona.

Como os espectros de dicroísmo circular apresentavam grandes sinais de ruído não se calculou a constante de complexação pela equação de Benesi-Hildebrand. A técnica comprovou de forma qualitativa a existência do complexo fisetina- $\beta\text{-CD}$.

IV.3.2 Estudo da Solubilidade da Fisetina em CDs

Os flavonóides apresentam importantes propriedades farmacológicas, porém baixíssima solubilidade em água. Em decorrência deste fator limitante, existem muitos trabalhos na literatura que estudam o aumento da solubilidade destes em β -CD (TOMMASINI *et al.*, 2004). Esta alternativa mostra-se muito interessante para solucionar os problemas encontrados na administração de fármacos hidrofóbicos em água. Analisou-se a solubilidade da fisetina na β -CD de acordo com o método de Higuchi e Connors (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

Para o cálculo da concentração de fisetina em cada solução, determinaram-se, nos três comprimentos de onda de maior absorção ($\lambda = 248, 318$ e 360 nm), o coeficiente de absorvidade molar, ϵ , Tabela 11. Em seguida, determinou-se através da lei de Lambert-Beer a concentração de fisetina que cada concentração de CD conseguiu solubilizar.

Tabela 11 - Média dos valores do coeficiente molar ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$), ϵ , da fisetina em água

T (°C)	$\lambda = 248$ nm	$\lambda = 318$ nm	$\lambda = 360$ nm
15	19510	14742	24046
25	17461	13290	21426
35	18034	13827	22226
45	15149	11746	18597

Construiu-se um gráfico da concentração da fisetina em função da concentração de CD. Os diagramas representativos de solubilidade da fisetina em função da concentração de β -CD podem ser visto na Figura 26. Nestes diagramas há um

crescimento linear, evidenciando que o complexo forma-se numa razão de 1:1 mol/mol (ATWOOD *et al.*, 1996).

Para todas as temperaturas investigadas, 15, 25, 35 e 45 °C, a solubilidade da fisetina em meio aquoso contendo a β -CD aumenta com a temperatura.

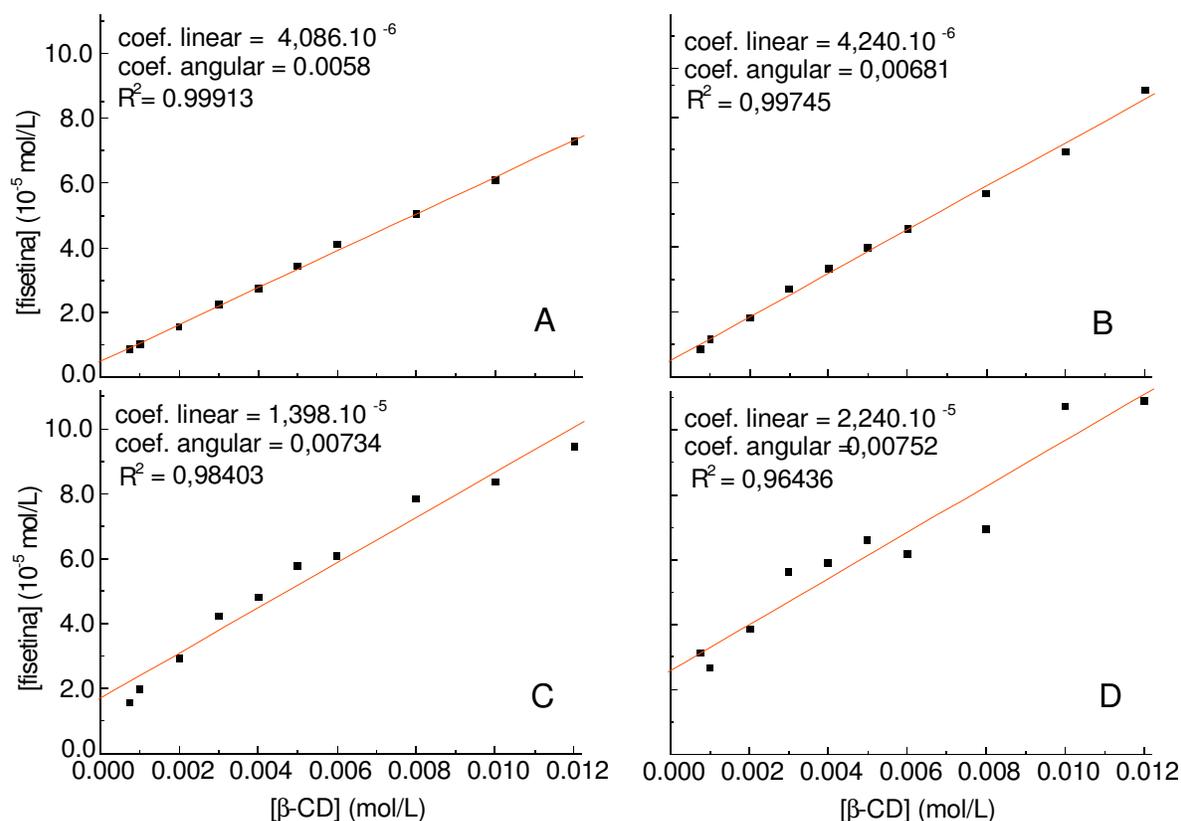


Figura 26. Diagrama de solubilidade da fisetina em β -CD a (A) 15, (B) 25, (C) 35 e (D) 45 °C, analisadas no comprimento de onda de 360 nm.

Por este método, independente do desvio da curva em concentração elevada de CD, pode-se calcular uma constante de formação aparente, K_c , que é útil para uma comparação entre as diferentes temperaturas analisadas. Esta constante é calculada na parte linear no diagrama de solubilidade seguindo a equação de Higuchi e Connors (HIGUCHI & CONNORS, 1965):

$$K_c = \frac{\text{coef.angular}}{\text{coef.linear}(1 - \text{coef.angular})} \quad (14)$$

As médias dos valores de K_c dos experimentos feitos em duplicata estão apresentadas na Tabela 12, a seguir. O resultado obtido não depende do comprimento de onda utilizado para a análise, a variação é muito pequena, por isso o valor apresentado é uma média do resultado nos três comprimentos de onda descritos acima.

Tabela 12 - Valores de K_c (L/mol) para o complexo fisetina- β -CD em diferentes temperaturas

Temperatura ($^{\circ}$ C)	K_c (mol/L) $^{-1}$
15	1000 \pm 120
25	860 \pm 70
35	510 \pm 30
45	360 \pm 30

Pela Tabela 12 nota-se que, para o complexo fisetina- β -CD, o aumento da temperatura provoca uma diminuição de K_c . A temperatura atua positivamente no grau final de solubilidade e de forma negativa na estabilidade do complexo (TOMMASINI *et al.*, 2004).

Este estudo também permite a obtenção de parâmetros termodinâmicos envolvendo o complexo. Através da forma integrada da equação de Van't Hoff pode-se calcular as variações de entalpia e entropia, dependentes da variação da constante de complexação com a temperatura.

$$\ln K_c = -\left(\frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT}\right) + \left(\frac{\Delta S^{\ddagger}}{R}\right) \quad (15)$$

O gráfico de Van't Hoff, Figura 27 abaixo, mostra um comportamento linear. Os parâmetros físico-químicos obtidos a partir do gráfico estão demonstrados na Tabela 13.

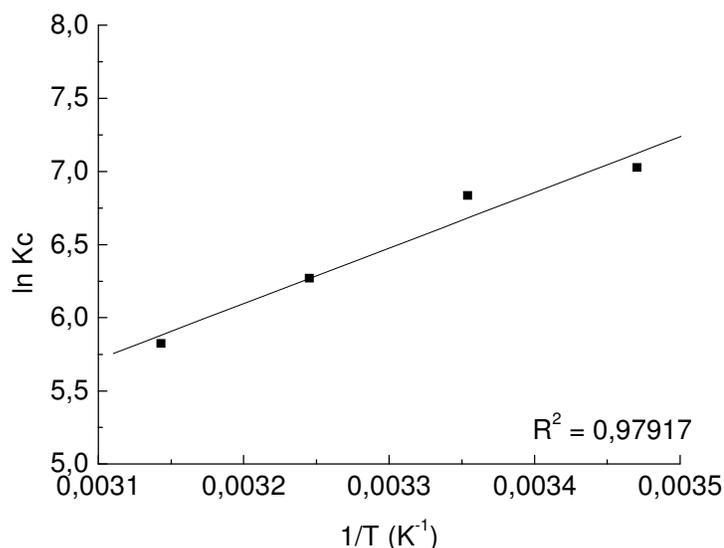


Figura 27. Gráfico de Van't Hoff, a 25 °C, no comprimento de onda de 360 nm, para o complexo fisetina- β -CD.

Tabela 13 - Valores termodinâmicos para o complexo fisetina- β -CD

Constante termodinâmica	β -CD
ΔH^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	-27 \pm 4
ΔS^\ddagger (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	-36 \pm 13
ΔG^\ddagger_{25} (kJ.mol ⁻¹)	-16,7 \pm 0,8

A inclusão de uma molécula na cavidade da CD leva em consideração a contribuição dos vários efeitos dependentes do hóspede e da CD. Estes efeitos são (ATWOOD *et al.*, 1996):

(i) a substituição de uma interação polar-apolar energeticamente não favorável entre a água incluída e a CD por uma interação apolar-apolar mais favorável entre a

hóspede e a cavidade da CD e a interação polar-polar entre a maior parte da água e as moléculas de água liberadas da cavidade;

(ii) as forças do anel da CD relaxam na complexação;

(iii) interações de van der Waals;

(iv) no caso de algumas moléculas hóspedes, ligações de hidrogênio entre o hóspede e o hospedeiro.

De acordo com os dados da Tabela 13, a entalpia, para o complexo fisetina- β -CD, apresenta valor negativo indicando que a interação entre o hóspede e o hospedeiro é exotérmica, o complexo dissocia-se com o aumento da temperatura. A entropia, também negativa, indica que a complexação diminui o grau de liberdade rotacional e translacional comparado com os constituintes livres, ocorrendo uma ordenação do sistema. O valor de entropia é pequeno porque há dois efeitos ocorrendo ao mesmo tempo, a perda de graus de liberdade rotacional e translacional do hóspede e do hospedeiro que ocorre após a complexação e, em contrapartida, há a liberação das moléculas de água que estavam ordenadas ao redor do flavonóide que provoca um aumento na entropia.

Embora uma interação hidrofóbica seja caracterizada por $\Delta H^{\circ} \cong 0$ e $\Delta S^{\circ} > 0$, as forças entálpicas e entrópicas se alteram. Os resultados encontrados não estão em total acordo com as esperadas interações hidrofóbicas clássicas. O processo exotérmico de complexação fisetina- β -CD é dirigido pela entalpia ($|\Delta H^{\circ}| > T \cdot |\Delta S^{\circ}|$), isto sugere que outras forças além das interações hidrofóbicas contribuem significativamente para a estabilização do complexo. Estes processos têm sido considerados como interações hidrofóbicas não-clássicas. (SHEHATTA, 2002)

A variação da energia livre foi calculada pela equação de Gibbs, considerando a temperatura de 25 °C. O valor negativo obtido de ΔG diz que o processo de complexação é espontâneo.

$$\Delta G^{\#}_{25} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (16)$$

Os parâmetros termodinâmicos obtidos teoricamente (Tabela 2) tendem a confirmar as tendências obtidas experimentalmente pela análise de solubilidade da fisetina quando incluída na β -CD. Por exemplo, a entropia calculada para a formação do complexo de inclusão com a β -CD são todas negativas, embora sejam significativamente maiores que as determinadas experimentalmente. Esta diferença é decorrente da não consideração das interações com o solvente nos cálculos teóricos.

IV.3.3 Anisotropia:

A anisotropia ou polarização permite conhecer a deslocalização angular média que ocorre no fluoróforo entre a absorção e a emissão dos fótons. Grandes valores de anisotropia do complexo fisetina-CD implicam numa menor rotação da sonda (rotações das cadeias laterais e do complexo, e das flexões na estrutura) durante o tempo que fica no estado excitado. (LAKOWICZ, 1999)

O experimento de anisotropia baseou-se na monitoração da mobilidade da fisetina quando complexada com a β -CD. Prepararam-se amostras da fisetina e dos complexos em tampão fosfato pH 4,4 e 11,4, a concentração da fisetina foi 25 μ mol/L e da β -CD de 0 até 10 mmol/L. O experimento foi realizado em duplicata. A Figura 28 mostra os gráficos da variação de anisotropia da fisetina em função da concentração da β -CD em pH ácido (4,4) e básico (11,4).

Em pH 4,4, a fisetina apresenta um valor de anisotropia de 0,2409 e quando complexada com β -CD 10 mM a anisotropia diminui para 0,2144, Figura 28. A explicação para obtenção de um valor menor de anisotropia, conforme se aumenta a concentração de β -CD, pode ser devida a grande exposição da fisetina à solução aquosa. Os cálculos teóricos mostraram que não há uma completa inclusão da fisetina dentro da cavidade interna da β -CD, tanto pelo grupamento fenila como pelo cromona. Conseqüentemente grande parte da fisetina complexada está em contato com a água,

mas não totalmente livre. Por isso, os valores de anisotropia da fisetina complexada com β -CD, em meio ácido, diminuem sucessivamente (Figura 28).

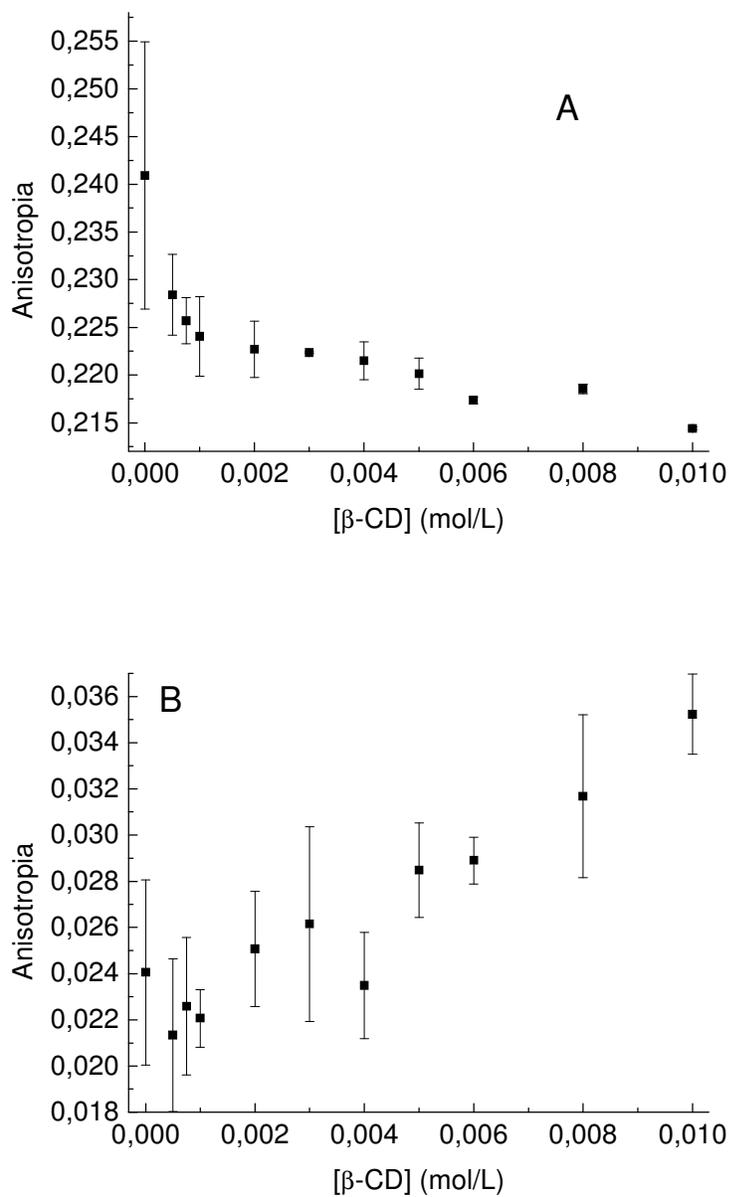


Figura 28. Gráficos de anisotropia da fisetina em função da concentração de β -CD em pH (A) 4,4 e (B) 11,4.

Em condições básicas, pH 11,4, a fisetina está desprotonada e, portanto, possui maior solubilidade (mobilidade) em água que a forma protonada, como pode ser observado pelo seu baixo valor de anisotropia no estado estacionário (0,02405). Além disso, notou-se um aumento da anisotropia conforme se aumentava a concentração de CD no meio (a fisetina em β -CD 10 mM possui anisotropia de 0,03523), neste caso a CD diminuiu a mobilidade da fisetina, ou seja, ocorreu uma restrição na relaxação rotacional da fisetina excitada na cavidade da CD e, portanto, há um indício de uma maior afinidade entre o complexo formado por CD e sonda. Os cálculos teóricos mostraram que nas condições de pH 12 há uma forte estabilização do complexo, muito mais efetiva que nas condições de pH neutro.

O trabalho de Banerjee e Sengupta (2006) mostra que após a formação do complexo com β -CD em solução aquosa, o valor de anisotropia da fisetina aumenta como observado nesta Dissertação de Mestrado em soluções básicas, mas de forma oposta ao meio ácido ou neutro. Os autores justificaram seu resultado como uma indicação que a fisetina está dentro da cavidade interna da β -CD, com a movimentação restrita e difusão rotacional reduzida.

IV.3.4 Fluorescência Resolvida no Tempo da Fisetina em β -CD

A técnica de fluorescência resolvida no tempo também foi utilizada para os complexos de CDs com a fisetina. As amostras foram excitadas em 305 nm no equipamento de picossegundos. As características do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina nas β -CDs estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Componentes do tempo de vida da fisetina e em presença de β -CD

Parâmetros	β -CD 1 mmol/L	β -CD 6 mmol/L	β -CD 12 mmol/L
λ emissão (nm)	510	510	510
τ (ps)	2035 \pm 38	2222 \pm 35	2572 \pm 35
χ^2	1,195	1,190	1,079
Resíduo (\pm)	6,7	7,7	5,0

Toda a discussão realizada no item “Fluorescência Resolvida no Tempo da Fisetina em Diversos Solventes” também é válida para o tempo de vida da fisetina na presença de CDs.

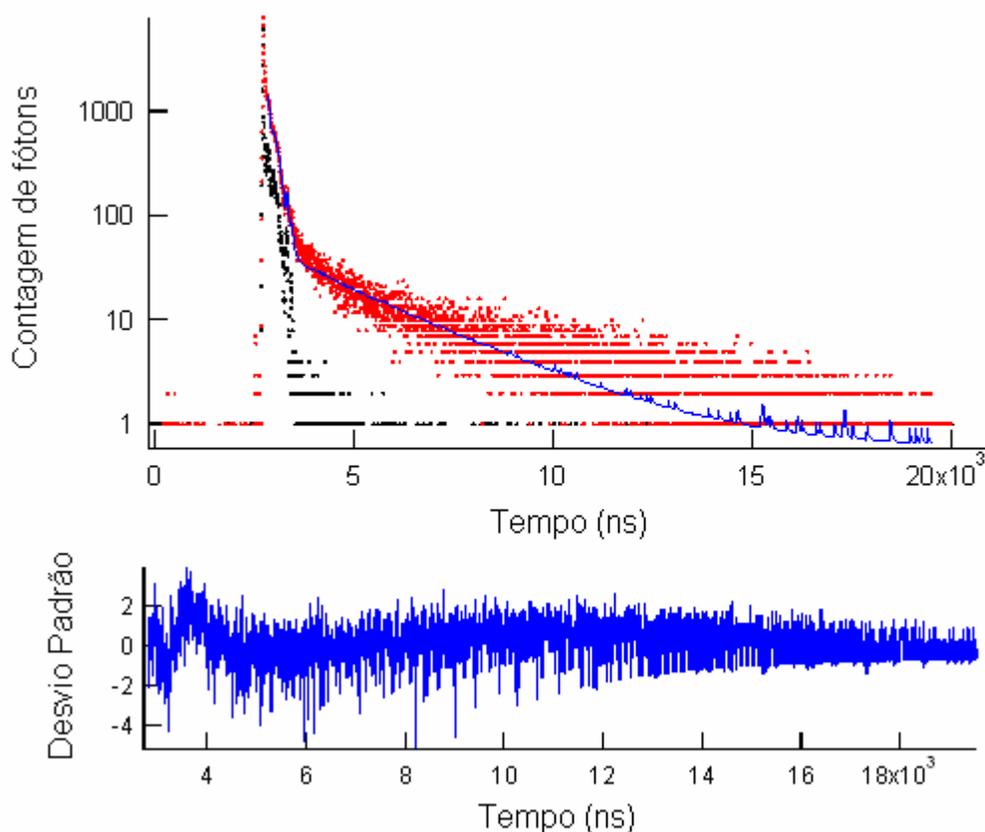


Figura 29. Gráfico ampliado do decaimento cinético do tempo de vida da fisetina $25 \mu\text{M}$ em solução aquosa de $\beta\text{-CD}$ 12 mM . (Perfil do instrumento em cor preta, decaimento cinético em vermelho e em azul a curva calculada de ajuste aos resultados experimentais). Número de fótons no canal máximo = 8000.

A fisetina na $\beta\text{-CD}$ apresenta tempos de vida que vão se tornando relativamente mais longos com o aumento da concentração de $\beta\text{-CD}$, Tabela 14. O τ para a concentração 1 mmol/L de $\beta\text{-CD}$ é 2035 ps e para 12 mmol/L é 2572 ps . Os tempos de vida mais próximos encontrados no estudo da fisetina em diversos solventes foi para o butanol e o glicerol de 1687 ps , este último apresenta um segundo tempo de vida de 3149 ps . Esta comparação ilustra mais uma vez o quanto que a CD apresenta uma característica alcoólica em sua cavidade interna.

A literatura (BANERJEE; SENGUPTA, 2006) apresenta dois tempos de vida para a fisetina em presença de $\beta\text{-CD}$ de $0,96$ e $3,36 \text{ ns}$, com excitação em 370 nm e emissão de fluorescência em 550 nm referentes a uma medida na escala de

nanossegundos em um equipamento da Edinburgh Instruments, com uma lâmpada de excitação de nitrogênio. Este equipamento, conforme descrito na literatura, possui uma resolução temporal de aproximadamente 1,2 a 1,4 ns. Desta forma, o tempo de 0,96 ps não pode ser atribuído a fisetina, abaixo da resolução do instrumento, muito menos a espécies diferentes de fisetina presente no solvente e complexada com a CDs.

Uma análise mais criteriosa destes valores será feita no grupo de pesquisa da Orientadora. Serão realizadas novas medidas experimentais que colem um maior número de fótons no canal máximo, diminuindo a interferência do perfil da lâmpada na análise destes decaimentos cinéticos de tempo de vida da fisetina.

IV.4 Estudo do Complexo de Inclusão Fisetina - γ -CD

IV.4.1 Medidas Espectroscópicas dos Complexos

Assim como para o complexo fisetina - β -CD, também foram realizadas medidas fotofísicas da fisetina em presença da γ -CD em pHs ácido, neutro e básico, para determinar a constante de inclusão e o comportamento espectral de cada sistema.

Nos meios ácido e neutro o comportamento do complexo fisetina - γ -CD é similar, pois os valores de pKa da fisetina são elevados (JOVANOVIĆ *et al.*, 1994). Em meio básico, com a ausência dos prótons das hidroxilas, a fisetina apresenta uma mudança espectral muito significativa comparada aos meios ácido e neutro. Nas Figuras 30 e 31 estão os espectros representativos da absorção UV-Vis e da emissão de fluorescência da fisetina com γ -CD em diferentes meios, respectivamente.

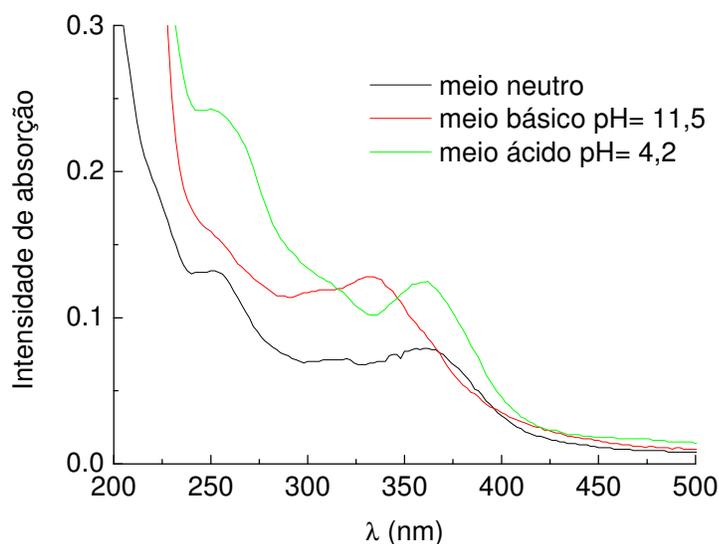


Figura 30. Espectro de absorção no UV-Vis da fisetina 5 μ mol/L em γ -CD 10 mM em pHs neutro, básico e ácido.

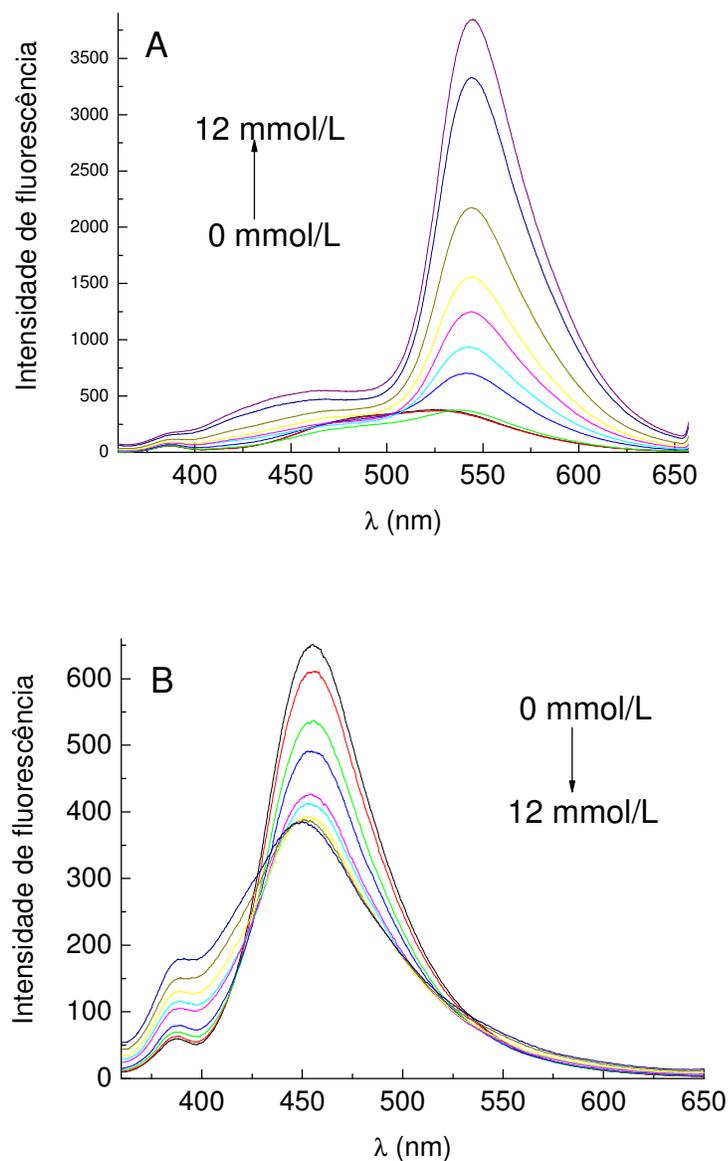


Figura 31. Espectros de emissão de fluorescência da fisetina $5 \mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de $\gamma\text{-CD}$ em pHs neutro (A) e 11,5 (B), com $\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$.

Pela Figura 31A, nos meios neutro e ácido, a adição de $\gamma\text{-CD}$ provoca um aumento na intensidade de fluorescência da fisetina e, gradualmente, salienta seu comportamento de emissão dual. Isto indica a formação do complexo de inclusão de $\gamma\text{-CD}$ com a fisetina. As CDs $\beta\text{-}$ e $\gamma\text{-}$ favorecem a fluorescência por transferência de próton

da fisetina em relação à fluorescência da espécie normal. No entanto, o $\lambda_{\text{máx}}$ da emissão tautomérica para o complexo com a γ -CD é de 545 nm e para fisetina - β -CD nota-se um deslocamento hipsocrômico de 15 nm ($\lambda_{\text{máx}} = 530$ nm). A razão entre as intensidades das bandas das estruturas normal e tautomérica também aponta como os complexos são diferentes, para o complexo fisetina- γ -CD esta razão é igual a 8, enquanto que para com a β -CD é de apenas 2, evidenciando como a γ -CD favorece mais a emissão do tautômero.

Em meio básico, Figura 31B, há uma alteração no comportamento espectroscópico da fisetina (apenas uma única banda, da fisetina desprotonada, é observada) e conforme se aumenta a concentração de γ -CD em solução obtém-se uma diminuição no sinal de emissão de fluorescência. O mesmo ocorre para o complexo fisetina - β -CD e ambos os $\lambda_{\text{máx}}$ aparecem em 455 nm. Novamente, a fluorescência é muito mais fraca sob condições básicas do que ácidas ou neutras.

Os resultados encontrados em meio básico para as duas CDs estudadas são similares. Desta forma pode-se esperar alguns resultados semelhantes de modelagem molecular para o complexo com a γ -CD como para o complexo com a β -CD. Os cálculos teóricos realizados para o complexo da fisetina desprotonada com a β -CD simulando uma condição de pH 12, mostraram uma distorção na estrutura da β -CD e fortes interações entre o fenóxido e os grupos OH presentes na entrada da cavidade da β -CD. Decorrente dos diferentes tamanhos das cavidades internas das duas CDs, espera-se que os resultados teóricos mostrem algumas diferenças. Uma delas pode ser uma interação mais fraca da γ -CD com a fisetina ou ainda que a inserção da sonda na γ -CD possa ocorrer de duas formas (através da cromona ou fenila) muito mais facilmente do que em β -CD. O estudo teórico da fisetina em γ -CD está sendo realizado pelo Prof. Dr. Antonio Eduardo Hora Machado e, infelizmente, ainda não temos os resultados finais, devido à complexidade do sistema.

A partir do emprego da equação de Benesi-Hildebrand (BENESI & HILDEBRAND, 1949) nestes espectros foi calculada a constante de associação do estado fundamental da sonda com o complexo formado (K). Os comprimentos de onda

utilizados variaram na faixa de 250 a 400 nm nos experimentos de absorção no UV-Vis e de 420 a 580 nm para a fluorescência, nos diferentes pHs. Os melhores resultados foram obtidos pela técnica de emissão de fluorescência. O complexo fisetina - γ -CD em meio básico mostrou comportamento semelhante ao mostrado na Figura 32A, em todos os comprimentos de onda investigados. A análise em meio neutro ou ácido do complexo fisetina - γ -CD foi possível somente na faixa de 430 a 475 nm, já na faixa de 540 a 550 nm não foi encontrado nenhum ajuste para a equação proposta.

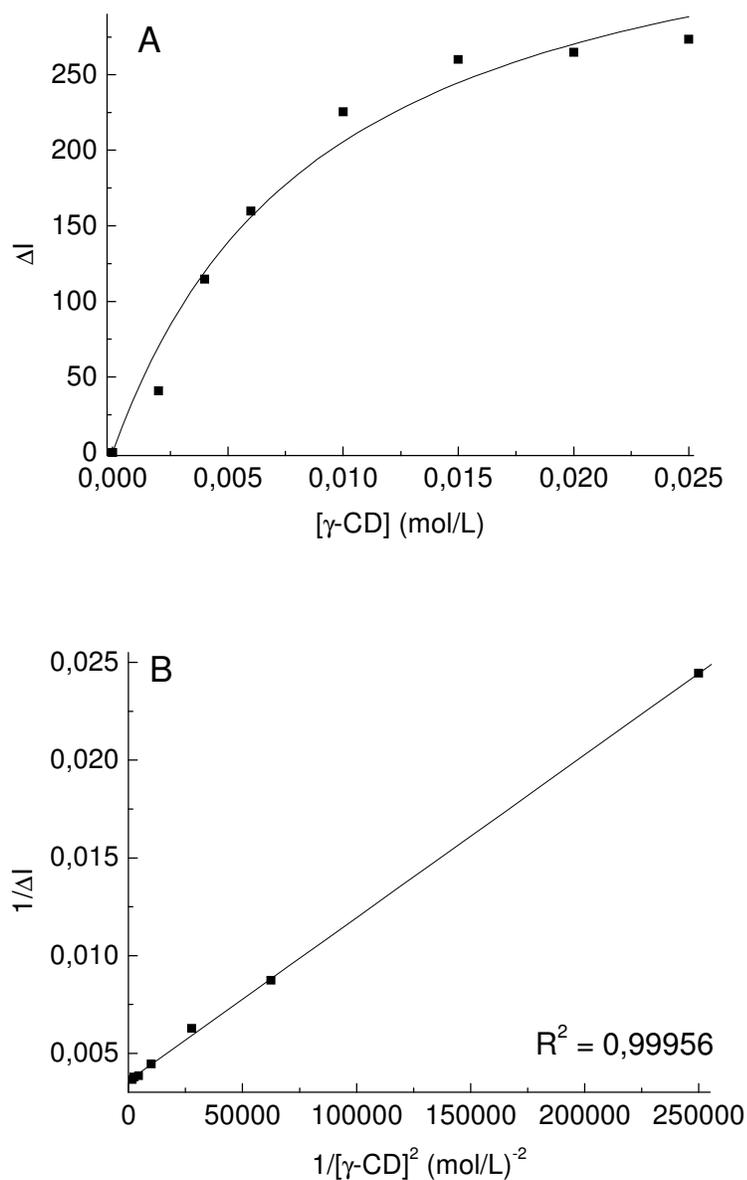


Figura 32. (A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da fisetina desprotonada em função da concentração de γ -CD, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\gamma\text{-CD}]^2$.

As análises no gráfico do duplo inverso para o complexo mostraram uma relação linear, os coeficientes de correlação linear (R^2) são maiores que 0,97 indicando uma provável estequiometria do complexo 1:1 (Fis: γ -CD) para os ambientes ácidos, neutros e básicos. Também foi analisado o gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\text{CD}]^2$ para

averiguar a existência de complexos de ordem maior (1:2). O complexo fisetina - γ -CD em meio básico mostrou melhor ajuste dos pontos experimentais e um coeficiente de correlação linear mais próximo de 1 neste gráfico, revelando um favorecimento do complexo fisetina - γ -CD na razão 1:2 mol/mol. Em meio neutro ou ácido não há uma clara distinção se esse complexo forma-se na razão 1:1 ou 1:2 mol/mol. Estes resultados experimentais evidenciam cada vez mais a diferença de complexação entre a fisetina e a β - e γ -CD. Estamos aguardando os resultados teóricos para melhor fundamentar este resultado experimental.

Os valores de K obtidos estão comparados na Tabela 15 abaixo.

Tabela 15 - Constantes de inclusão dos complexos em diferentes pHs

	Diâmetro interno (nm)	K meio neutro/ ácido [(mol/L) ⁻¹]	K meio básico [(mol/L) ⁻¹]
γ -CD	0,95	94 ± 30	130 ± 10

De acordo com a Tabela 15, a constante de inclusão para o complexo fisetina - γ -CD possui valor maior em meio básico (130 ± 10 (mol/L)⁻¹) do que em meio neutro ou ácido (94 ± 30 (mol/L)⁻¹), à 23 °C.

As análises feitas acima mostraram que a estequiometria do complexo é provavelmente de 1 fisetina para 2 γ -CD, então poderíamos recalculas as constantes de complexação com a versão não linearizada da equação de Benesi-Hildebrand (Eq. 17), que nos forneceria um tratamento mais adequado para complexos do tipo 1:2. (YANG & BOHNE, 1996)

$$\Delta I = \frac{[Fis]_T \Delta x \cdot K_2 \cdot [CD]^2}{1 + K_2 \cdot [CD]^2} \quad (17)$$

Comparando os valores de K entre γ - e β -CD, para a primeira CD obtiveram-se constantes de inclusão com valores bem menores àqueles encontrados para a segunda, para os meios neutro/ácido e básico, apesar de em ambos os espectros

ocorrerem significativas alterações das intensidades de fluorescência. O alto grau de interação pode ser atribuído à dimensão da cavidade da β -CD, sendo esta menor que a da γ -CD e ideal para abrigar a molécula da fisetina na forma protonada. Como o diâmetro interno da cavidade da γ -CD é maior, admite-se a possibilidade que a fisetina possa entrar e sair mais facilmente deste hospedeiro, tornando seu valor de K menor do que com β -CD. É importante ressaltar que a grande cavidade interna da γ -CD favorece a complexação com a fisetina em meio básico, pois o K neste meio foi determinado de forma mais precisa do que em meio neutro.

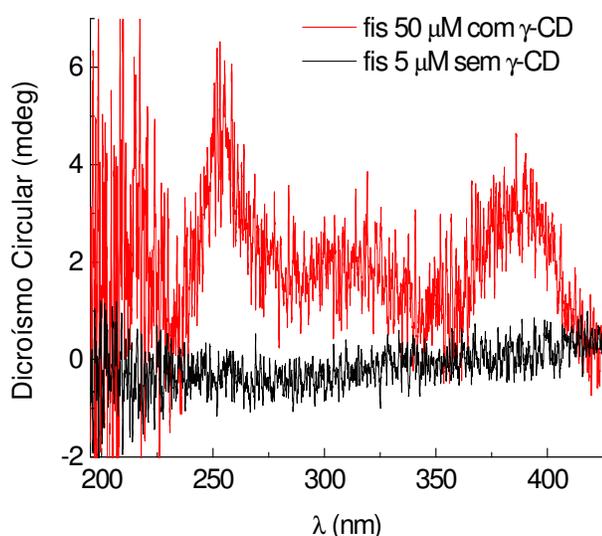


Figura 33. Espectro de dicroísmo circular da fisetina protonada nas concentrações 5 $\mu\text{mol/L}$ em solução aquosa (preto) e 50 $\mu\text{mol/L}$ na presença de γ -CD 30 mmol/L (vermelho).

A técnica de dicroísmo circular mostrou um sinal induzido para a fisetina quando inserida na γ -CD (Figura 33), comprovando a formação de um complexo entre a sonda e a ciclodextrina. O sinal positivo do efeito Cotton, como visto na Figura 33, descreve que o momento de dipolo elétrico da fisetina coincide com o eixo de simetria da CD. Resultado semelhante foi visualizado para o complexo fisetina - β -CD e os dados encontrados pelos cálculos teóricos realizados para este sistema mostraram a possibilidade de inserção quer seja pela fenila como pela cromona. Para o sistema

fisetina - γ -CD espera-se também a inserção por ambos os lados simultaneamente formando um complexo 1 fisetina para 2 γ -CD.

Pelos mesmos motivos expostos no estudo da complexação da fisetina com β -CD através dos espectros de dicroísmo circular, a existência do complexo fisetina- γ -CD foi comprovada de forma qualitativa por esta técnica.

IV.4.2 Estudo da Solubilidade da Fisetina em γ -CD

O estudo do diagrama de solubilidade também foi realizado para o complexo fisetina - γ -CD. O procedimento experimental utilizado foi o mesmo descrito para o complexo fisetina - β -CD.

Os diagramas da concentração da fisetina em função da concentração de γ -CD podem ser vistos na Figura 34. Nestes diagramas, para todas as temperaturas investigadas, há um crescimento linear da solubilidade da fisetina em função da concentração de γ -CD, evidenciando a possibilidade de formação do complexo numa razão de 1:1 mol/mol. Contudo, em todas as temperaturas estudadas há um desvio negativo da linearidade, indicando a formação de um sistema mais complexo, com proporção maior do hospedeiro (1:1 ou 1:2 mol/mol) ou, então, há uma alteração na interação sonda-solvente (ATWOOD *et al.*, 1996).

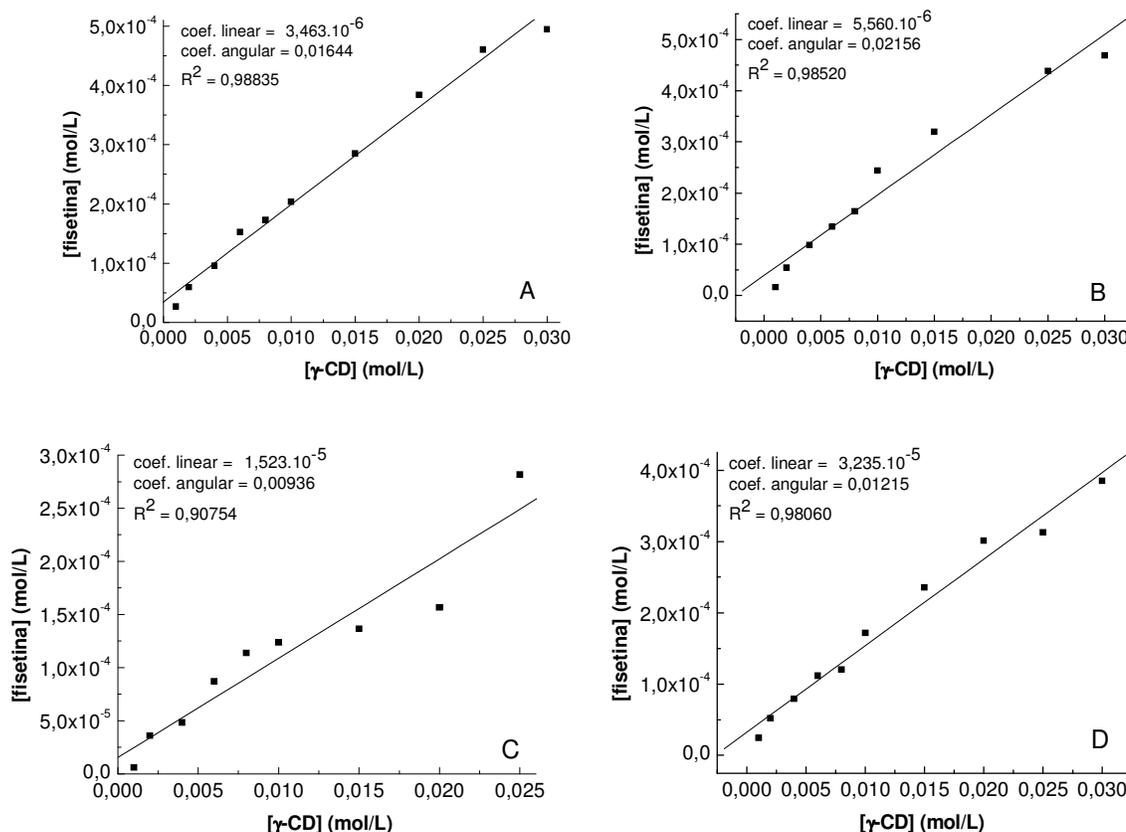


Figura 34. Diagramas de solubilidade da fisetina em γ -CD a (A) 15, (B) 25, (C) 35 e (D) 45 °C, analisados no comprimento de onda de 360 nm.

O método permitiu calcular a constante de formação aparente, K_c , independente do desvio da curva em concentração elevada de CD. A partir da equação de Higuchi e Connors (HIGUCHI & CONNORS, 1965), as constantes foram calculadas na parte linear no diagrama de solubilidade.

As médias dos valores de K_c dos experimentos feitos em duplicata estão apresentadas na Tabela 16, a seguir. O resultado obtido não depende do comprimento de onda utilizado para a análise, a variação é muito pequena, por isso o valor apresentado é uma média do resultado nos três comprimentos de onda descritos acima.

Tabela 16 - Valores de K_c para o complexo fisetina - γ -CD em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	γ -CD, K_c [(mol/L) ⁻¹]
15	330 ± 135
25	380 ± 60
35	415 ± 170
45	470 ± 75

Pela Tabela 16 nota-se que, para o complexo fisetina - γ -CD, K_c é proporcional à temperatura, fornecendo uma contribuição positiva para a estabilidade do complexo e para o grau final de solubilidade.

É interessante notar que a constante de complexação para a γ -CD é menor do que para a β -CD nas temperaturas de 15 e 25 °C (1000 ± 120 e 860 ± 70 (mol/L)⁻¹, respectivamente); com o aumento da temperatura os valores das constantes de complexação das duas CDs se aproximam (a 35 °C o K_c do complexo fisetina - β -CD é 510 ± 30 (mol/L)⁻¹ e a 45 °C é 360 ± 30 (mol/L)⁻¹). O favorecimento da complexação da fisetina com a β -CD na temperatura ambiente é decorrente provavelmente de dois fatores principais: (a) a β -CD é menos solúvel em meio aquoso do que a γ -CD, então aumenta a força motriz para complexar com a sonda; (b) a cavidade interna da β -CD é menor do que da γ -CD, o que aumenta as interações efetivas com o hóspede (El-BARGHOUTH *et al.*, 2005). É importante salientar que a constante de complexação para a γ -CD por esta metodologia é muito maior que a obtida pela equação de Benesi-Hildebrand em meio neutro a 23 °C, o que pode ser decorrente da análise ficar restrita à parte linear do gráfico em concentrações pequenas de γ -CD.

A estabilidade de inclusão da fisetina em ciclodextrinas segue a ordem β -CD > γ -CD > α -CD que afirma a importância da relação ajuste-tamanho entre o hóspede e o hospedeiro no processo de complexação (SHEHATTA, 2002). Este fato é comprovado pelo pequeno valor de K da γ -CD em relação à β -CD nas menores temperaturas estudadas, que indica interações fracas entre os componentes do complexo, ou seja, não há um bom ajuste. Se este estudo utilizasse uma β -CD com substituições alquílicas

nas cadeias laterais aumentaria a constante de complexação, pois provocaria uma intensificação nas forças de ligação da CD com o flavonóide.

Através da forma integrada da equação de Van't Hoff foram obtidos alguns parâmetros termodinâmicos envolvendo o complexo fisetina - γ -CD (variações de entalpia e entropia, dependentes da variação da constante de complexação com a temperatura).

O gráfico de Van't Hoff, Figura 35 abaixo, mostra um comportamento linear. Os parâmetros físico-químicos obtidos a partir do gráfico estão demonstrados na Tabela 17.

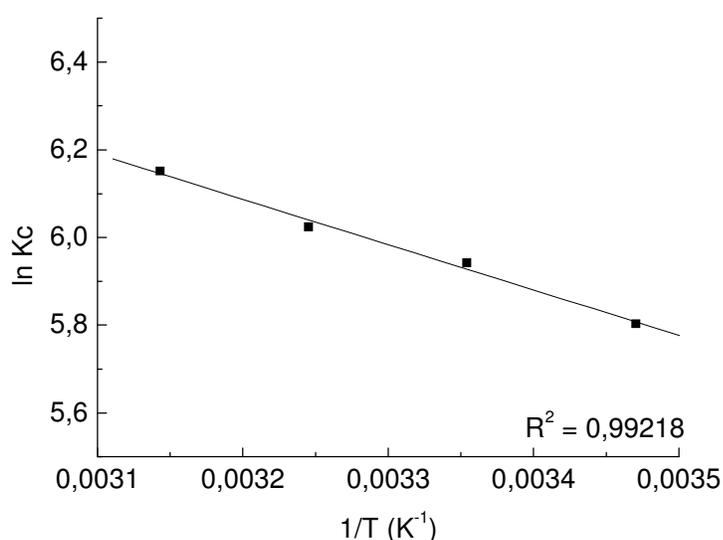


Figura 35. Gráfico de Van't Hoff, a 25 °C, no comprimento de onda de 360 nm, para o complexo fisetina - γ -CD.

Tabela 17 - Valores termodinâmicos para o complexo fisetina - γ -CD

Constante termodinâmica	γ -CD
ΔH^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	9 ± 0,5
ΔS^\ddagger (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	78 ± 2
ΔG^\ddagger_{25} (kJ.mol ⁻¹)	-14,7 ± 1

Segundo os dados da Tabela 17, para o complexo fisetina - γ -CD, a entalpia é positiva, portanto endotérmica, o complexo associa com o aumento da temperatura; e a entropia, também positiva, indica que a complexação não diminui os graus de liberdade rotacional e translacional comparado com os constituintes livres.

Os diferentes valores de ΔH e ΔS encontrados para os complexos fisetina - β -CD e fisetina - γ -CD indicam que o complexo fisetina - β -CD está mais rigidamente ligado com uma conseqüente estrutura restrita, enquanto que a formação do complexo fisetina - γ -CD está acompanhado de maior dessolvatação da fisetina e, portanto, uma favorável alteração na entropia (EI-BARGHOUTH *et al.*, 2005).

A variação da energia livre foi calculada, a temperatura ambiente, pela equação de Gibbs. O valor negativo obtido de ΔG mostra que o processo de complexação entre a fisetina e a γ -CD é espontâneo.

IV.4.3 Anisotropia

A avaliação da anisotropia do sistema fisetina - γ -CD monitorou a mobilidade da fisetina quando complexada com a γ -CD. Prepararam-se amostras da fisetina e dos complexos em tampão fosfato pH 4,4 e 11,4, a concentração da fisetina foi 25 μ mol/L e da γ -CD de 0 até 25 mmol/L. A Figura 36 mostra o gráfico da variação de anisotropia da fisetina em função da concentração da γ -CD em pH ácido (4,4) e básico (11,4).

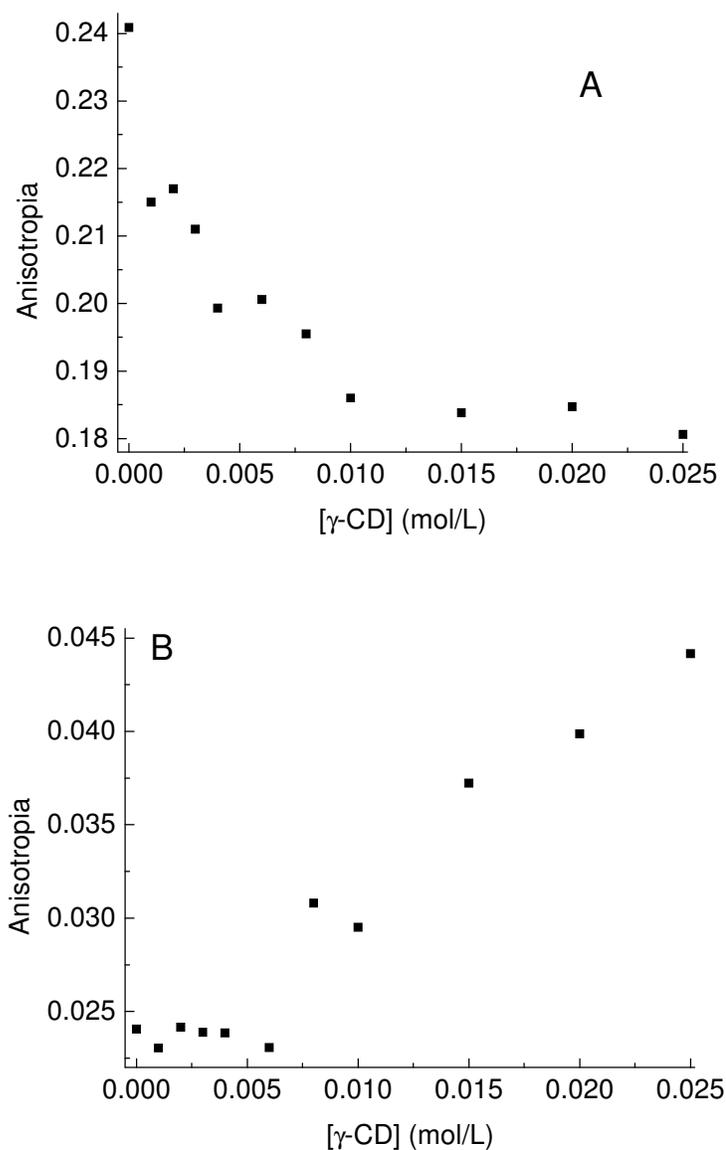


Figura 36. Gráficos de anisotropia da fisetina em função da concentração de γ -CD em pH (A) 4,4 e (B) 11,4.

Em pH 4,4, notou-se que conforme se aumenta a concentração da γ -CD em solução, diminui o valor de anisotropia encontrado para a fisetina. Este comportamento, apesar de ser semelhante ao observado para fisetina complexada com β -CD, pode ser explicado por outros motivos, diferentes ao já expostos para aquela CD. No caso da γ -CD, o complexo formado apresenta uma pequena constante de complexação. Além

disso, o resultado de anisotropia sugere um aumento da mobilidade da fisetina conforme se adicionava mais γ -CD. Conseqüentemente, este resultado comprova os valores obtidos de maior entropia deste sistema. Uma possibilidade é a formação de um complexo onde a fisetina possui grande mobilidade de entrar e sair rapidamente da γ -CD.

Em pH 11,4, a fisetina desprotonada possui um baixo valor de anisotropia no estado estacionário (0,02405), devido à sua grande mobilidade em água. Além disso, notou-se um aumento da anisotropia conforme se aumentava a concentração de γ -CD no meio (a fisetina em γ -CD 25 mM possui anisotropia de 0,04417), neste caso a CD diminuiu a mobilidade da fisetina, ou seja, ocorreu uma restrição na relaxação rotacional da fisetina excitada na cavidade da CD e, portanto, foi observada uma maior afinidade entre o complexo formado por CD e sonda. A γ -CD apresenta maior constante de complexação em meio básico do que ácido, o que confirma os resultados acima obtidos. Este experimento de anisotropia evidencia que em pH básico, aumentam-se as chances para a formação de um complexo mais estável de fisetina e γ -CD, como por exemplo, um complexo de estequiometria 1 fisetina : 2 γ -CD.

IV.5 RMN de ^1H da Fisetina e dos Complexos Fisetina - β - e γ -CDs

Medidas de RMN de ^1H em vários solventes e experimentos de NOESY foram efetuados no sentido de fornecer maiores subsídios à caracterização da fisetina e dos complexos de inclusão. Os resultados são apresentados nas Tabelas 18 e 19. Para efeito de comparação, também são apresentados os deslocamentos químicos obtidos na simulação teórica do espectro de RMN ^1H da fisetina.

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H , deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) da molécula fisetina em diferentes meios

Fisetina	$\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{g})$ (pD ~ 11,5) Amostra 1	$\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{g})$ (pD ~ 11,5) Amostra 2	Dados Teóricos ^a	CD_3OD
H6	6,74, dd, $J_{6,5} = 8,95$ $J_{6,8} = 2,27$	6,24, dd, ^b $J_{6,5} = 8,69$ $J_{6,8} = 2,38$	6,69	6,9-6,94, m
H5	7,83, d, $J_{5,6} = 8,95$	7,58, d, $J_{5,6} = 8,69$	7,91	8,00, d, $J_{5,6} = 8$
H8	6,65, d, $J_{8,6} = 2,23$	6,11, d, $J_{8,6} = 2,35$	6,03	6,9-6,94, m
H2'	7,65, d, $J_{2',6'} = 2,33$	7,31 – 7,29, m	7,16	7,79, d, $J_{2',6'} = 4$
H6'	7,60, dd, $J_{6',5'} = 8,35$ $J_{6',2'} = 2,36$	7,31 – 7,29, m	7,43	7,69, dd, $J_{6',5'} = 4$ $J_{6',2'} = 8$
H5'	6,82, d, $J_{5',6'} = 8,39$	6,65, d, $J_{5',6'} = 8,46$	6,42	6,9-6,94, m
OH7	n.o.	n. o. ^c	2,04	n. o.
OH3			3,33	
OH3'			2,34	
OH4'			1,33	

^a DFT MPW1PW91, com B3LYP/6-311G* GIAO para o cálculo da constante de blindagem do TMS); ^b d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipletto; ^c n.o.: sinal não observado.

Tabela 19 - Dados de deslocamento químico δ (ppm) de RMN de ^1H para fisetina, β - e γ -CD e complexos de fisetina e β - (γ -) CD em soluções de $\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{g})$

	Fisetina	β -CD	γ -CD	Complexo Fis - β -CD (12 mM Fis: 15 mM β -CD)	Complexo Fis - γ -CD (14 mM Fis: 18 mM γ -CD)
H6	6,24			6,23	6,23
H5	7,58			7,59	7,58
H8	6,11			6,12	6,10
H2'	7,31 – 7,29			7,31 – 7,29	7,31 – 7,29
H6'	7,31 – 7,29			7,31 – 7,29	7,31 – 7,29
H5'	6,65			6,63	6,65
H1		5,09	5,14	5,07	5,12
H2		3,67	3,68	3,64	3,66
H3		3,99	3,96	3,97	3,95
H4		3,61	3,62	3,58	3,60
H5		3,88	3,88	3,84	3,86
H6		3,91	3,90	3,87	3,88

A atribuição do espectro de RMN de ^1H de fisetina já foi publicada em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, em misturas de $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, em CD_3OD puro (RASKU; WÄHÄLÄ, 2000; AWAD *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004). Os dados da Tabela 18, neste último solvente, são completamente consistentes com os dados descritos anteriormente. Entretanto, para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que descreve o espectro de fisetina em soluções aquosas básicas.

Na Tabela 18 constam dados teóricos referentes à molécula neutra de fisetina. Eles apresentam boa concordância com os valores experimentais obtidos para a molécula neutra. O funcional MPW1PW91 tem sido aplicado com sucesso na descrição do espectro de RMN de diferentes moléculas (WIBERG *et al.*, 1999). O emprego de conjuntos de bases de elevada complexidade, como é o caso da 6-311G*, é uma das razões apontadas para essa boa convergência de resultados. Os cálculos para os

complexos de inclusão não foram bem sucedidos em virtude do tamanho dos sistemas a serem estudados, o que limitou o severamente o tipo de função de base empregada.

O objetivo de termos dados de RMN de ^1H em D_2O foi para comparar os deslocamentos químicos da fisetina livre e complexada. Porém, a baixíssima solubilidade de fisetina em soluções aquosas neutras não viabilizava a aquisição de dados de boa qualidade de RMN. Por este motivo, as medidas de RMN foram feitas em meio básico, obtidas dissolvendo as amostras em soluções de NaOD 30% / D_2O ou em D_2O que fora basificada através do borbulhamento de $\text{NH}_3(\text{g})$ (pD $\sim 11,5$). Experimentos de controle foram feitos para certificarmos qual o efeito da basicidade nos espectros de RMN de ^1H das β - e γ -CDs.

Em D_2O / NaOD 30%, foi observado um drástico alargamento dos sinais das CDs, impedindo qualquer tipo de atribuição satisfatória. Isto está de acordo com os resultados teóricos, que mostraram uma distorção da estrutura da β -CD em meio básico. O espectro de fisetina apresentou uma série de sinais na faixa de 5,5 a 8,0 ppm, de multiplicidade variável e graus de alargamento que não combinam com qualquer uma das possíveis espécies presentes em solução (fisetina, seu tautômero, fisetina desprotonada ou as formas de semi- e quinona). Estas observações permitiram concluir que a solução NaOD 30% / D_2O é inadequada para nossos propósitos.

Em D_2O alcalinizado com $\text{NH}_3(\text{g})$, o perfil do espectro de RMN de ^1H de fisetina é consistente com sistema de spin ABX, mostrando dois conjuntos de sinais correspondentes aos anéis A e B (Figura 2). Em ambos os casos, H5 (H5') aparece como um dubleto dividido pelo acoplamento com H6 (H6') que, por sua vez, aparece como um duplo dubleto, separado pelo forte acoplamento mencionado acima e um acoplamento de longa distância com H8 (H2') (Tabela 18, amostra 1). A discrepância dos valores de deslocamento químico observado para D_2O / $\text{NH}_3(\text{g})$, CD_3OD e modelagem molecular (calculados no vácuo) é devida aos efeitos do meio. Já a ausência dos sinais das hidroxilas, previstas no espectro teórico é devida à rápida troca destes prótons com o deutério em solução. A comparação entre os espectros de ^1H das β - e γ -CDs em D_2O puro e em D_2O borbulhado com $\text{NH}_3(\text{g})$ não exibiu diferenças significativas, Tabela 19.

Contudo, observa-se que as amostras de fisetina mudam com o decorrer do tempo. Desde a preparação das amostras até a aquisição dos espectros de RMN propriamente ditos, há uma diferença de aproximadamente 4 horas entre as amostras 1 e 2. Levando em consideração a tentativa de atribuição da amostra 2, pode-se ver que a maioria dos deslocamentos químicos estão deslocados para campos maiores, quando comparados com os valores descritos para a amostra 1. Sabe-se que grupos hidroxilas podem sofrer oxidação dependente do pH, resultando nas formas de semiquinona e quinonas do flavonóide, especialmente daqueles contendo substituintes 3',4'-dihidroxilados do tipo catecol no anel B (como a quercetina e fisetina) (AWAD *et al.*, 2001, 2002; JOVANOVIĆ *et al.*, 1994). Assim, uma possível explicação para as diferenças de deslocamentos químicos para as amostras 1 e 2 poderia ser a presença de diferentes espécies em solução: no primeiro caso seria observada a forma desprotonada de fisetina, enquanto no último, as suas formas de semiquinona/quinona.

Outra importante característica é a variação significativa dos valores da integração (I) dos sinais dos prótons H8, H6' e H2' (mais baixos do que os valores esperados de 1) e do modelo de multiplicidade dos sinais dos prótons H6' e H2', que coalescem em um multiplete na amostra 2. Foi descrita por Rasku e Wähälä (2000) a deuteração controlada nos anéis aromáticos de alguns flavonóides em soluções de D₂O / D₃PO₄.BF₃ e, no caso particular da fisetina, a ordem de troca de próton foi determinada como H8 > H6', H2', H5' >> H6, H5. Os autores também propõem a possibilidade de ocorrer processo de deuteração em meio básico, uma vez que o excesso de base é capaz de desprotonar os anéis aromáticos, embora em baixo rendimento. Assumindo que a deuteração de algumas posições nos anéis A e B pode ocorrer sob as condições experimentais deste trabalho, espera-se observar uma diminuição na intensidade dos prótons parcialmente substituídos. De fato, os valores para os sinais dos prótons H6, H5 e H5' são, respectivamente, 1,0, 1,0 e 0,96, porém para os sinais de prótons H8 e H6' + H2', são iguais a 0,25 e 1,2, sugerindo que a substituição deste último conjunto de prótons ocorre em alguma extensão e é coerente com a ordem de reatividade frente a deuteração relatada anteriormente (RASKU; WÄHÄLÄ, 2000). Obviamente, a deuteração relativa das posições 6' e 2' afetaria o

acoplamento dos prótons remanescentes, modificando a multiplicidade dos sinais observáveis. É válido mencionar que as condições básicas experimentais de RMN de ^1H utilizaram-se de concentrações elevadas de fisetina, da ordem de 1 mM, possibilitando todas estas alternativas de oxidação e troca de deutério. Os demais experimentos (fluorescência e anisotropia no estado estacionário) não utilizaram concentrações tão elevadas do flavonóide.

Foram feitas tentativas para sondar a presença do composto de inclusão de fisetina e β - (γ) CD em solução de D_2O / $\text{NH}_3(\text{g})$. Na presença de fisetina, os espectros de ambas as CDs não mostraram grande variação do deslocamento químico dos prótons internos H3 e H5. Na realidade, todos os sinais apresentaram valores de $\Delta\delta$ na faixa de 0,02 a 0,04 ppm e de 0,01 a 0,02 ppm para β - e γ -CD, respectivamente (Tabela 19). É válido notar que estes valores pequenos de $\Delta\delta$ não foram acompanhados por nenhum tipo de mudança do perfil espectral, como os observados para os prótons internos quando há a formação de compostos de inclusão (TOMA *et al.*, 2004; SCHNEIDER; HACKET; RÜDIGER, 1998). De forma análoga, os sinais de fisetina apresentaram uma média de valores de $\Delta\delta$ de 0,02 ppm.

Finalmente, foi feito um experimento de NOESY para misturas de fisetina e β - (γ) CDs e em nenhum caso foi possível observar alguma correlação esperada entre os prótons internos H3 e H5 e os prótons da sonda. Isto sugere que a formação do complexo de inclusão entre fisetina e ambas as CDs não ocorre em extensão significativa para detectada nas condições de RMN.

Em meio básico ($\text{pD} \sim 11,5$), considerando os valores de pK_a da fisetina (JOVANOVIC *et al.*, 1994), no mínimo dois grupos hidroxilas estão desprotonados, resultando em uma molécula fisetina carregada negativamente. Neste caso, a inclusão dentro da cavidade da CD é desfavorável e coerente com a constante de equilíbrio determinada experimentalmente através da equação de Benesi-Hildebrand (BENESI; HILDEBRAND, 1949) e resultados de modelagem molecular que prevê a inclusão de fisetina neutra na ausência de efeitos de solvatação.

IV.6 Estudo da 7-Hidroxiflavona

IV.6.1 Medidas Espectroscópicas da 7-HF em Diferentes pHs

O estudo da 7-hidroxiflavona (7-HF) iniciou-se para que pudéssemos comparar a complexação de diferentes flavonóides com as CDs. Em outras palavras, os resultados teóricos da complexação da fisetina com β -CD mostram que a inclusão da sonda pode ocorrer tanto pela parte cromona quanto pelo anel fenila do flavonóide. Assumimos que as hidroxilas 3' e 4' orientam a inclusão na β -CD pelo anel fenila da fisetina (GUZZO *et al.*, 2006). Entretanto, qual o tipo de complexo formado utilizando um outro flavonóide que não realize a ESIPT e que tenha o grupo fenila livre de substituintes, mas que mantenha na parte cromona uma hidroxila, eventualmente, para induzir a orientação do complexo por esta parte da molécula? Por estas considerações, foi escolhida a 7-HF.

Primeiramente, determinou-se o valor de pKa da hidroxila na posição 7 para comparar com o descrito na literatura. Utilizaram-se soluções ácidas de ácido sulfúrico e básicas de hidróxido de sódio para o ajuste do pH do meio e registraram-se os espectros de absorção, como pode ser visto na Figura 37. A concentração final da sonda foi 15 $\mu\text{mol/L}$.

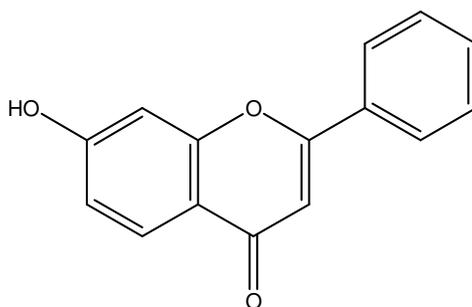


Figura 37. Estrutura da 7-HF.

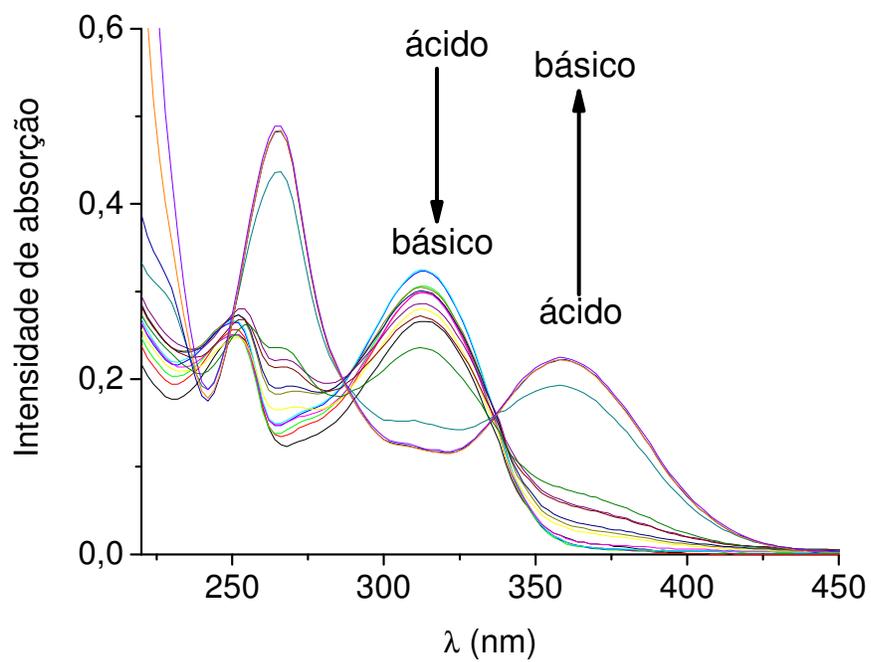


Figura 38. Espectro de absorção da 7-HF, 15 μ M, em diferentes pHs.

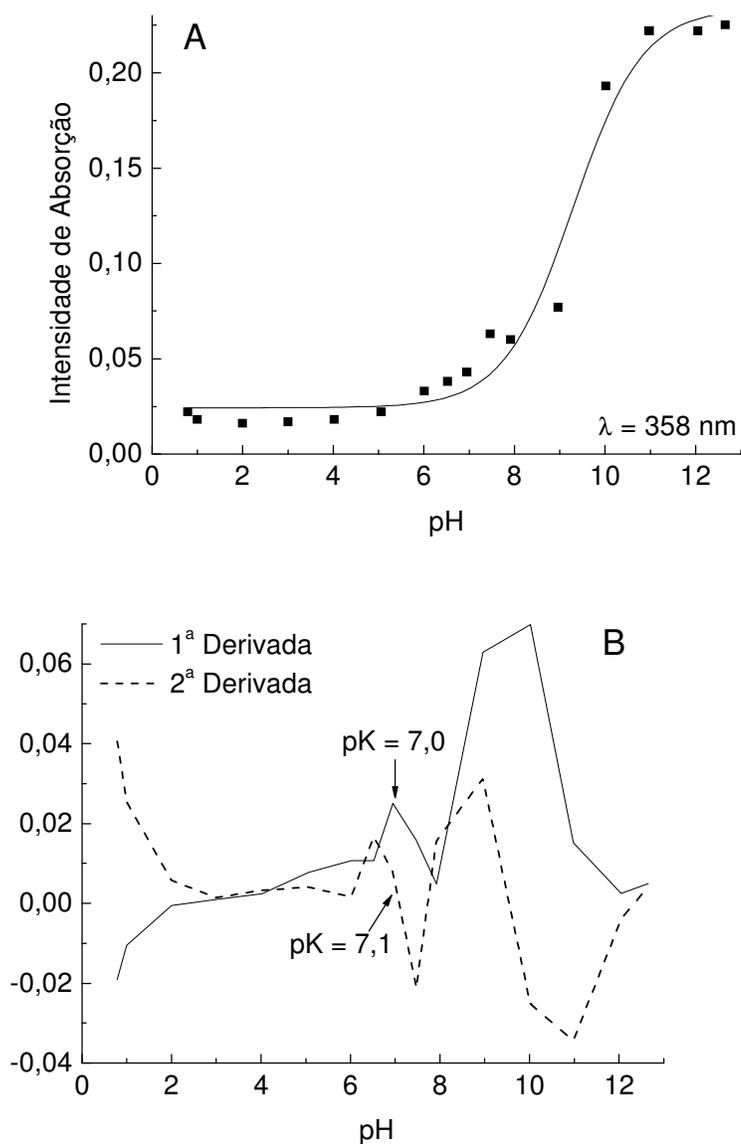


Figura 39. Gráficos da intensidade de absorção da 7-HF em função do pH (A) e da primeira e segunda derivadas do gráfico anterior (B).

De um modo geral, o ponto final da titulação pode ser detectado mais facilmente pelo exame da curva de titulação e suas primeira ($\Delta E/\Delta V$ contra V) e segunda derivadas ($\Delta^2 E/\Delta V^2$ contra V). Quando a porção ascendente da curva cresce claramente definida, pode-se estimar, aproximadamente, o ponto final que está a meio caminho do segmento ascendente da curva. Porém, é normalmente preferível utilizar

métodos analíticos (ou derivativos). O máximo da primeira derivada corresponde ao ponto de inflexão da curva de titulação, isto é, ao ponto final. A segunda derivada tem valor zero no ponto onde o coeficiente angular da primeira derivada é o máximo e também corresponde ao ponto final (VOGEL, 2002).

Encontrou-se, pela segunda derivada do gráfico da intensidade de absorção em função do pH, Figura 38B, o valor de pKa da 7-HF como 7,1. Este valor está muito próximo daquele determinado na literatura, 7,39 (SARKAR & SENGUPTA, 1989). A confirmação deste valor foi útil para determinar qual o pH mínimo para se trabalhar quando é desejada a desprotonação da hidroxila da 7-HF.

Com o valor de pKa de 7,1, observou-se, experimentalmente que em meio neutro, a hidroxila da 7-HF se desprotona e protona com facilidade o que acarreta em diferentes espécies da 7-HF em análise simultaneamente. Para manter a regularidade da presença de uma única espécie em estudo, foram escolhidas duas condições de meio com pH igual a 4,2 e 9,4.

Foram feitos estudos de complexação da 7-HF com β -CD e γ -CD em ambos pHs (ácido e básico), através de medidas de absorção de luz ultravioleta-visível, Figura 39 (7-HF- β -CD, pH ácido e básico). A partir da análise da absorção no UV-Vis da 7-HF em solução de β -CD em diferentes pHs, Figura 39, pode-se determinar quais os melhores comprimentos de onda para serem excitados no espectro de emissão de fluorescência estática, Figuras 40 (7-HF - β -CD) e 41 (7-HF/ γ -CD).

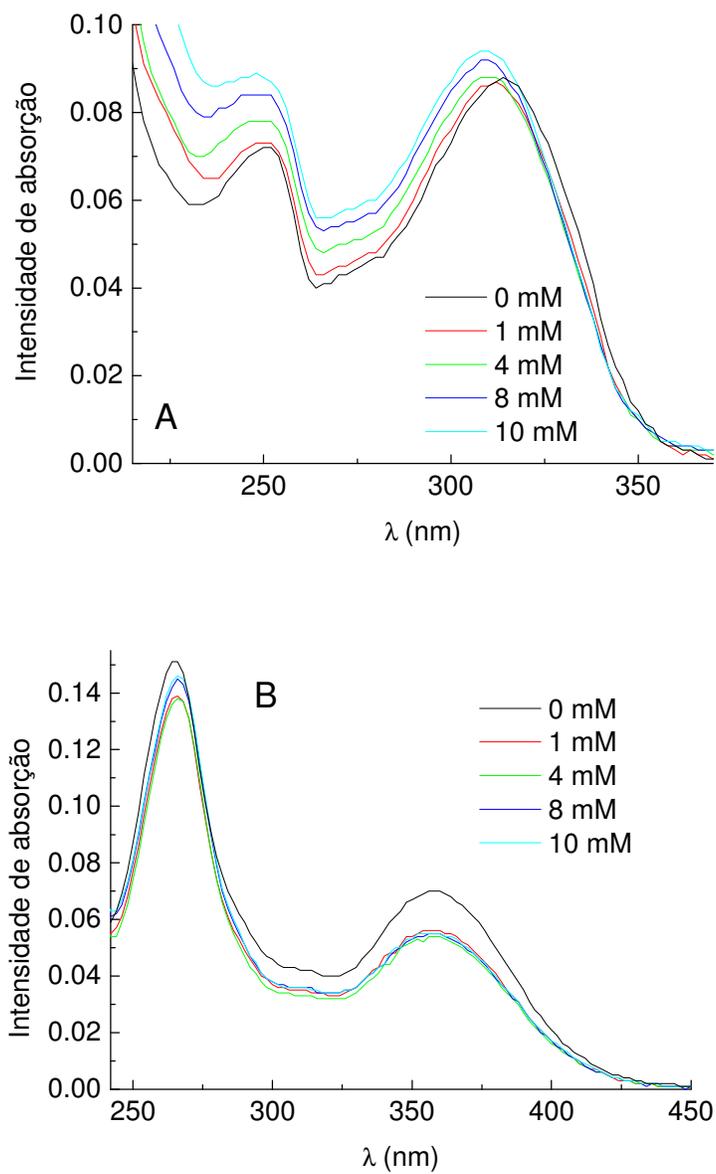


Figura 40. Espectros de absorção UV-Vis da 7-HF 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de β -CD em pHs 4,2 (A) e 9,4 (B).

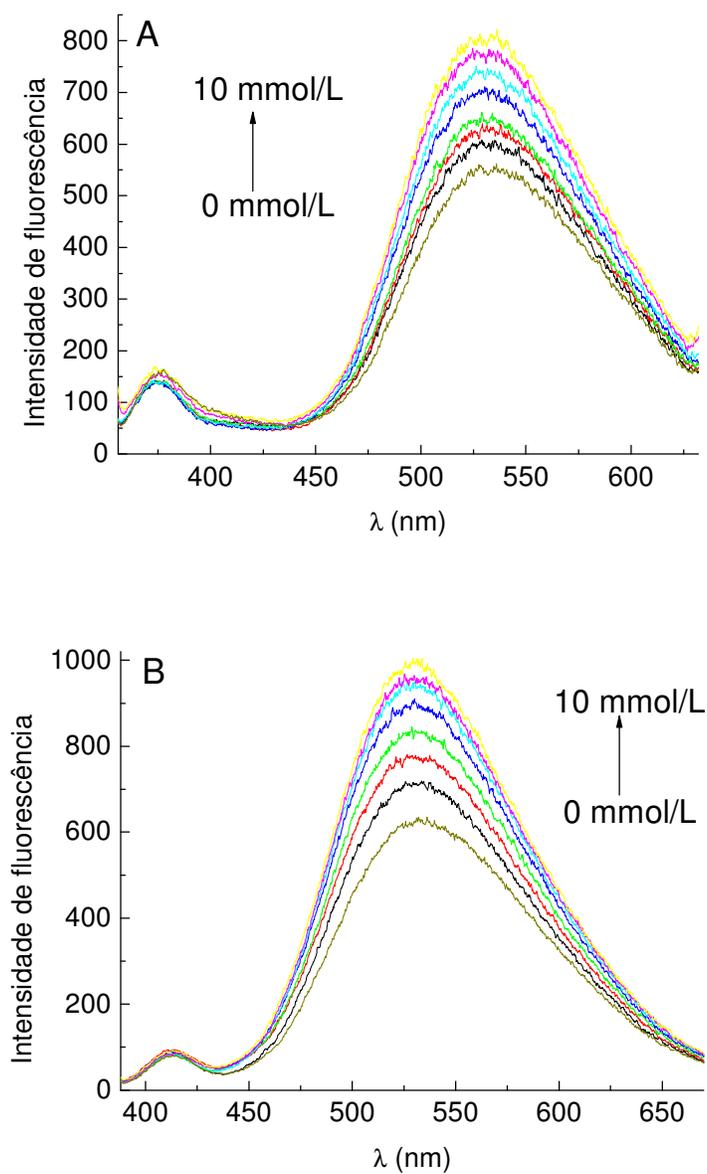


Figura 41. Espectros de emissão de fluorescência da 7-HF 5 $\mu\text{mol/L}$ em concentrações variáveis de β -CD em (A) $\text{pH} = 4,2$, com $\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$ e em (B) $\text{pH} = 9,4$, com $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$.

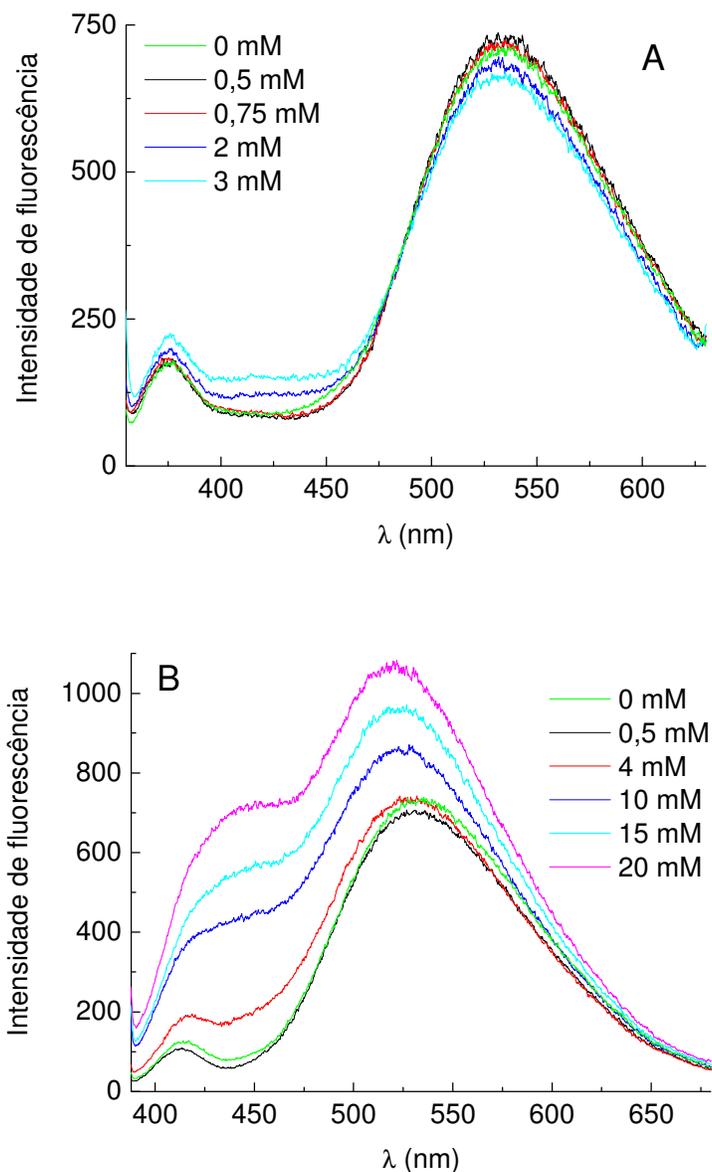


Figura 42. Espectro de emissão de fluorescência da 7-HF 5 μmol/L em concentrações variáveis de γ-CD em (A) pH = 4,2, com λexcitação = 330 nm e em (B) pH = 9,4, com λexcitação = 360 nm.

Nas Figuras 40 e 41, pode-se verificar o comportamento de emissão de fluorescência da 7-HF em água e em presença de β- e γ-CDs. Para a β-CD é claramente visualizado que o aumento gradual da concentração de CD favorece a emissão de fluorescência da 7-HF, o que indica que a CD promove a formação do

complexo de inclusão também com a 7-HF. Em γ -CD, o aumento gradual da concentração de CD provoca uma certa desordem no espectro de emissão de fluorescência. Apesar de ocorrer um aumento na intensidade de fluorescência não se observa uma proporcionalidade tão clara quanto com β -CD.

A alteração do pH do meio não acarretou em um deslocamento do comprimento de onda de máxima fluorescência da 7-HF, que aparece em 530 nm para a β -CD e em 533 nm para a γ -CD. A literatura apresenta o máximo de fluorescência da 7-HF em etanol-metanol (1:1) em 537 nm (SARKAR & SENGUPTA, 1989). A similaridade entre os máximos de emissão de fluorescência é decorrente da polaridade da cavidade interna da CD ser parecida com a de uma solução alcoólica (OKANO *et al.*, 2001).

Esta sonda mostrou-se distinta da fisetina em relação a ES IPT, pois nas condições até agora estudadas não foi observada qualquer transferência de próton no estado excitado. A velocidade de transferência de próton é fortemente dependente da distância para a transferência e quanto maior for esta distância no caso de uma transferência intermolecular, menor será a velocidade de transferência. (WOOLFE & THISTLETHWAITE, 1981)

A análise pela equação de Benesi-Hildebrand (BENESI & HILDEBRAND, 1949) dos dados encontrados na Figura 42 permitiu determinar a constante de complexação para 7-HF - β -CD nos meios ácido e básico, mostrados na Tabela 20. Não foi possível determinar a constante de complexação em presença de γ -CD, portanto, não houve a formação de um complexo estável nesse caso.

As análises no gráfico do duplo inverso para os dados experimentais obtidos mostraram uma relação linear para ambos os complexos, os coeficientes de correlação linear (R^2) são maiores que 0,9955 em meio básico e 0,9749 em meio ácido. Indicando uma provável estequiometria do complexo 1:1 (7-HF: β -CD) para os ambientes ácido e básico. Também foram analisados os gráficos $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]^2$ para averiguar a possibilidade de complexos de ordem maior (1:2), especialmente para as maiores concentrações de CD. Porém, o complexo 7HF: β -CD não apresentou um bom ajuste linear para este gráfico, descartando esta possibilidade.

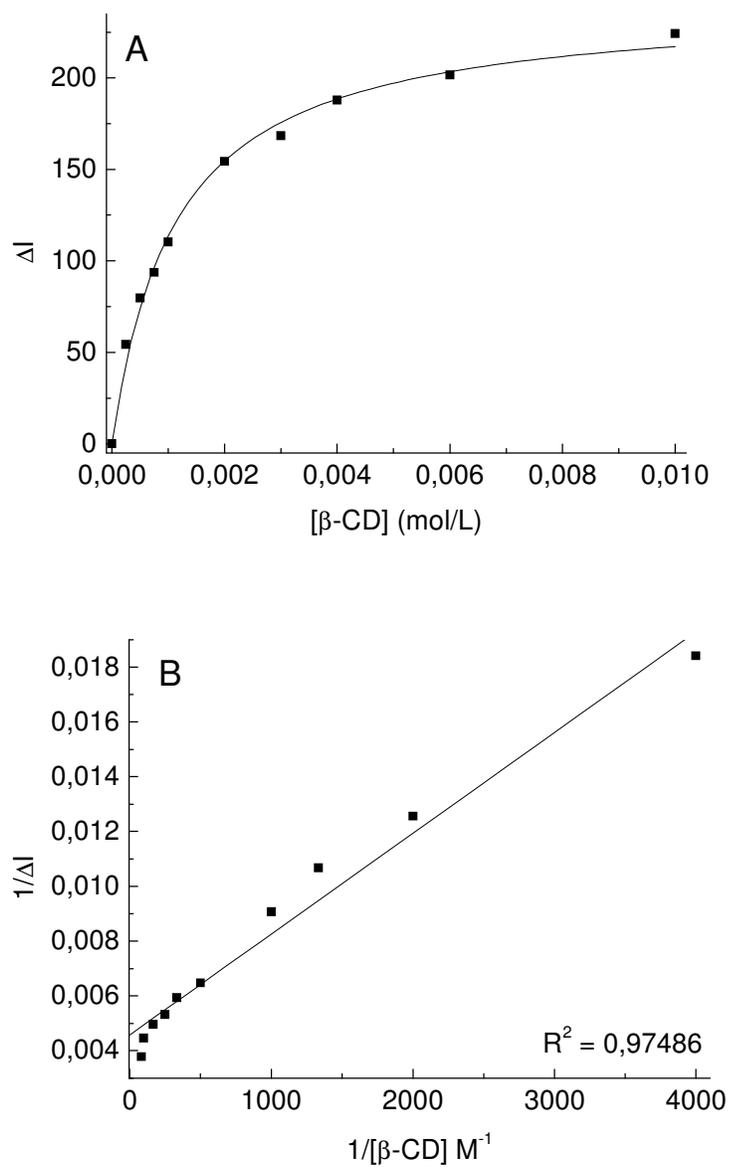


Figura 43. (A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da 7-HF protonada (pH 4,2) em função da concentração de β -CD, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$.

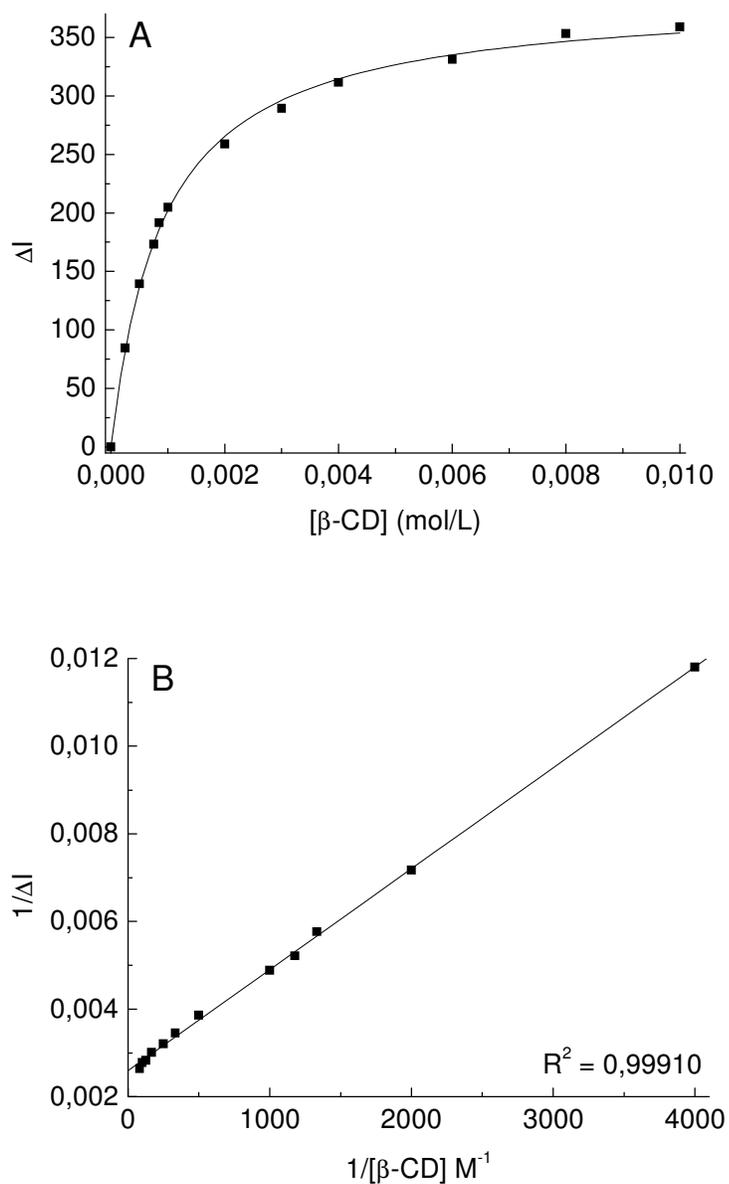


Figura 44. (A) Gráfico representativo da variação do sinal de fluorescência da 7-HF desprotonada (pH 9,4) em função da concentração de β -CD, empregando-se a equação de Benesi-Hildebrand. (B) Gráfico $1/\Delta I$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$.

Tabela 20 - Constantes de inclusão do complexo 7-HF - β -CD em diferentes pHs

Meio	K [(mol/L) ⁻¹]
Ácido	1430 ± 510
Básico	1220 ± 165

A 7-HF possui uma complexação muito mais efetiva com a β -CD que a fisetina, e, além disso, pode-se notar que não houve diferença significativa no valor da constante de complexação (levando-se em consideração o erro relativo das constantes) decorrente da alteração do pH do meio. A desprotonação da hidroxila na posição 7 não altera a formação do complexo, desta forma, pode-se induzir que a complexação ocorra, preferencialmente, pelo grupamento fenila.

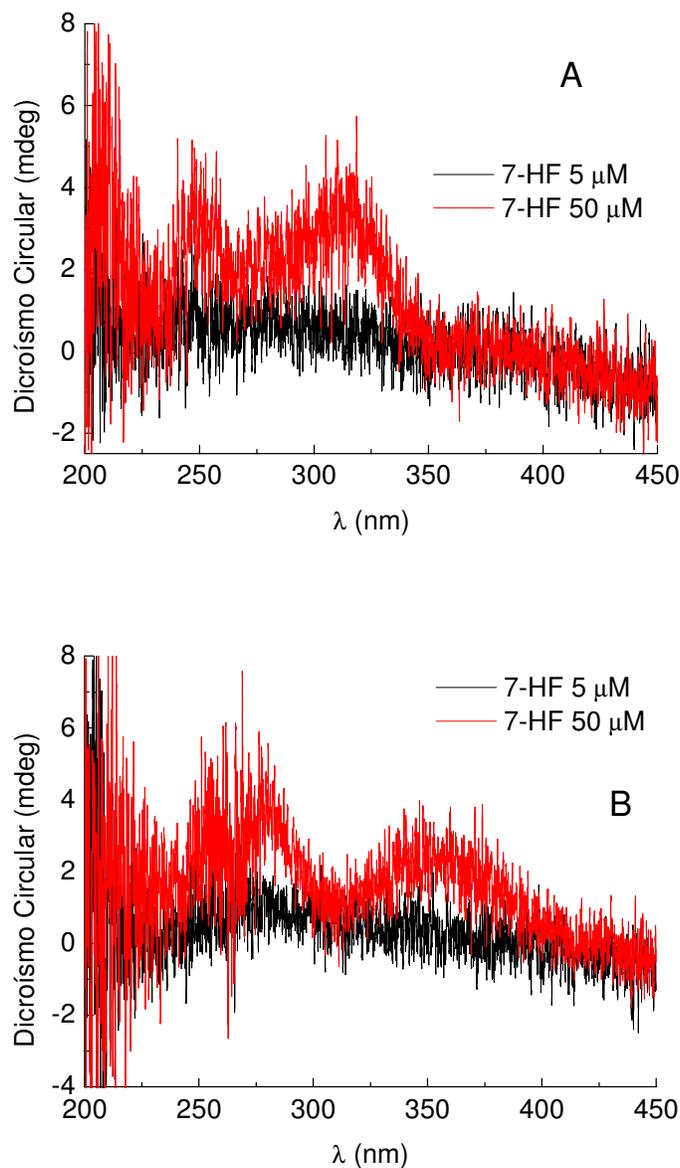


Figura 45. Espectro de dicroísmo circular da 7-HF nas concentrações 5 $\mu\text{mol/L}$ em solução aquosa (preto) e 50 $\mu\text{mol/L}$ na presença de $\beta\text{-CD}$ 10 mmol/L em pHs (A) 4,2 e (B) 9,4.

O complexo 7-HF - $\beta\text{-CD}$ mostrou um sinal induzido de dicroísmo circular positivo para ambos os pHs estudados, mostrado na Figura 44, confirmando a formação de um complexo entre a sonda e a ciclodextrina, sendo que o momento de dipolo elétrico da 7-HF coincide com o eixo de simetria da CD (ATWOOD *et al.*, 1996). Desta

forma, pode-se induzir que a estrutura da complexação é semelhante àquela estudada teoricamente para a fisetina com β -CD (GUZZO *et al.*, 2006).

V CONCLUSÃO

A fluorescência da fisetina é fortemente influenciada pela polaridade do solvente. Os solventes investigados neste trabalho mostram que a fisetina pode exibir apenas a emissão do tautômero ou da forma normal ou, ainda, uma mistura entre ambas as formas. Não se limitando a estas duas estruturas, pode haver uma desprotonação da sonda dependente do solvente. Neste sentido, foi difícil obter uma boa correlação entre os solventes empregados e a intensidade de emissão de fluorescência.

Há grande interesse no estudo dos complexos de inclusão de CDs. Do ponto de vista farmacêutico, diversos princípios ativos são constituídos por moléculas que apresentam baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, encontram dificuldade de administração no organismo humano. Por este motivo, a complexação de fármacos com as CDs melhoram sua solubilidade em água, a velocidade de dissolução, a estabilidade química e a biodisponibilidade. A eficiência de formação do complexo depende das estruturas do hóspede e do hospedeiro e da habilidade do fármaco alcançar e interagir com o alvo biológico

A localização da fisetina na cavidade interna das CDs favorece sua transferência de próton no estado excitado, formando o tautômero. Em formulações

farmacêuticas e estudos de terapia fotodinâmica, é interesse o questionamento sobre qual a espécie da fisetina que apresenta o maior potencial biológico para aplicações terapêuticas, considerando que o tautômero deve ser induzido na presença de CD e irradiação de luz.

A complexação da fisetina com a γ -CD é bastante distinta da β -CD devido ao tamanho da cavidade interna. O complexo fisetina - β -CD forma-se na ordem de 1:1 e em meio ácido ou neutro sua estabilidade é muito maior que em meio básico. Os cálculos teóricos realizados mostraram que a inserção da fisetina na β -CD ocorre preferencialmente pelo anel fenila. Já a γ -CD mostra indícios da formação de um complexo com a sonda mais estável em meio básico, com uma estequiometria de 1:2 (sonda: γ -CD).

Neste trabalho, a molécula de fisetina foi descrita pela primeira vez em meio básico pela técnica de RMN de ^1H . Essas medidas mostraram que, na condição básica, a fisetina degrada com o passar do tempo. Além disso, o meio básico não favoreceu o estudo da complexação com a β -CD por RMN de ^1H , pois ocorreram distorções significativas da estrutura da CD, comprovadas por cálculos teóricos realizados na fase gasosa.

O segundo flavonóide estudado, a 7-HF, apresentou uma complexação mais efetiva com a β -CD do que a fisetina e não é dependente do pH do meio. Pelos valores de constante de equilíbrio obtidas, presume-se que a orientação da 7-HF dentro da β -CD ocorra através do grupo fenila de sua estrutura.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameer-Beg, S.; Ormson, S. M.; Brown, R. G.; Matousek, P.; Towrie, M.; Nibbering, E. T. J.; Foggi, P.; Neuwahl, F. V. R. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3709.
- *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; 1 ed.; Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; Macnicol, D. D.; Vögtle, F., Eds.; Pergamon, 1996; Vol. 3.
- Awad, H. M.; Boersma, M. G.; Boeren, S.; Bladeren, P. J.; Vervoort, J.; Rietjens, I. M. C. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 398.
- Awad, H. M.; Boersma, M. G.; Boeren, S.; Bladeren, P. J.; Vervoort, J.; Rietjens, I. M. C. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 343.
- Banerjee, A.; Sengupta, P. K. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *424*, 379–386.
- Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703.
- Birch, D. J. S.; Imhof, R. E. Time-Domain Fluorescence Spectroscopy Using Time-Correlated Single-Photon Counting. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J., Ed.; Plenum Press, 1991; Vol. 1; pp 1.

- Bohne, C.; Redmond, R. W.; Scaiano, J. C. Use of Photophysical Techniques in the Study of Organized Assemblies. In *Photochemistry in Organized and Constrained Media*; Ramamurthy, V., Ed.; VCH Publishers: New York, 1991; pp 79.
- Calabrò, M. L.; Tommasini, S.; Donato, P.; Raneri, D.; Stancanelli, R.; Ficarra, P.; Ficarra, R.; Costa, C.; Catania, S.; Rustichelli, C.; Gamberini, G. *J. Pharm. Biomed. Analysis* **2004**, *35*, 365.
- Campbell, J. D.; Dwek, R. A. *Biological Spectroscopy*; The Benjamin/ Cummings Publishing Company: New York, 1998.
- Christoff, M.; Okano, L. T.; Bohne, C. *J. Photochem. Photobiol., A* **2000**, *134*, 169–176.
- Del Valle, E. M. M. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 1033–1046.
- Ei-Barghouthi, M. I.; Masoud, N. A.; Ai-Kafawein, J. K.; Zughul, M. B.; Badwan, A. *A. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *15*.
- Eiro, M. J.; Heinonen, M. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7461.
- Falkovskaia, E.; Sengupta, P. K.; Kasha, M. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *297*, 109.
- *Flavonoids and Bioflavonoids*; Farkas, L.; Gábor, M.; Kállay, F., Eds.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1985, pp 466.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burante, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V.

G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03; Revision B.05 ed.; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, 2003.

- Gilbert, A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*; Blackwell Scientific: Oxford, 1991.
- Guharay, J.; Dennison, S. M.; Sengupta, P. K. *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, *55*, 1091.
- Guzzo, M. R.; Uemi, M.; Donate, P. M.; Nikolaou, S.; Machado, A. E. H.; Okano, L. T. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 10545.
- Haiyun, D.; Jianbin, C.; Guomei, Z.; Shaomin, S.; Jinhao, P. *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 3421.
- Harborne, J. B.; Baxter, H. *Handbook of Natural Flavonoids*; Wiley: Chichester, 1999.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481.
- Higuchi, T.; Connors, K. A. *Phase Solubility Techniques in Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* New York, 1965.
- Jovanovic, S. V.; Steeden, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simicg, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846.
- Kasha, M. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1986**, *82*, 2379.
- Kleinman, M. H.; Bohne, C. Use of Photophysical Probes to Study Dynamic Processes in Supramolecular Structures. In *Molecular and Supramolecular*

Photochemistry; Ramamurthy, V., Schanze, K. S., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1997; Vol. 1; pp 391.

- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2 ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 1999.
- Lee, J.-C.; Lee, K.-Y.; Kim, J.; Na, C.-S.; Jung, N.-C.; Chung, G.-H.; Jang, Y.-S. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 1383.
- Looker, J. H.; Hanneman, W. W. *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 1237.
- Machado, A. E. H.; Rodrigues, L. M.; Gupta, S.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Silva, A. M. S. *J. Mol. Struct* **2005**, *738*, 239.
- Mandal, P. K.; Samanta, A. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6334.
- Marquardt, D. W. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, *11*, 431.
- McCarroll, M. E.; Billiot, F. H.; Warner, M. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3173.
- McMillin, D. R. *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 7.
- McMorrow, D.; Kasha, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5134.
- McMorrow, D.; Kasha, M. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 2235.
- McPhail, D. B.; Hartley, R. C.; Gardner, P. T.; Duthie, G. G. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1684.
- Mukai, K.; Oka, W.; Watanabe, K.; Egawa, Y.; Nagaoka, S. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3746.
- Murphy, R. S.; Barros, T. C.; Mayer, B.; Marconi, G.; Bohne, C. *Langmuir* **2000**, *16*, 8780.

- Okano, L. T.; Barros, T. C.; Chou, D. T. H.; Bennet, A. J.; Bohne, C. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2122.
- Pérez-Martínez, J. I.; Ginés, J. M.; Morillo, E.; Moyano, J. R. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 171–178.
- Rasku, S.; Wařhařlař, K. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 913–916.
- Reichardt, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1979**, *18*, 98.
- Reichardt, C. *Solvents and Solvents Effects in Organic Chemistry*, 2 ed.; Ed. Weinhein: Cambridge, 1988.
- Sarkar, M.; Sengupta, P. K. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **1989**, *48*, 175.
- Schneider, H.; Hacket, F.; Ruřdiger, V. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755.
- Schwartz, B. J.; Peteanu, L. A.; Harris, C. B. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3591.
- Semichem, I., USA. AMPAC with Graphical User Interface; Version 8.16.1 ed. Shawnee Mission, 2005.
- Sengupta, B.; Banerjee, A.; Sengupta, P. K. *FEBS Letters* **2004**, *570*, 77.
- Sengupta, P. K.; Kasha, M. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *68*, 382.
- Shehatta, I. *Monatshefte für Chemie* **2002**, *133*, 1239.
- Shynkar, V. V.; Mély, Y.; Duportail, G.; Piémont, E.; Klymchenko, A. S.; Demchenko, A. P. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9522.
- Strandjord, A. J. G.; Barbara, P. F. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 2355.
- Strandjord, A. J. G.; Smith, D. E.; Barbara, P. F. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 2362.
- Sytnik, A.; Gormin, D.; Kasha, M. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1994**, *91*, 11968.

- Toma, S. H.; Uemi, M.; Nikolaou, S.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N.; Toma, H. E. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 3521.
- Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P. *J. Pharm. Biomed. Analysis* **2004**, *35*, 379.
- Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; The Benjamin/Cummings, 1978.
- Vogel, A. I. *Análise Química Quantitativa*, 6 ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2002.
- Wiberg, R. K. B.; Hammer, J. D.; Zilm, K. W.; Cheeseman, J. R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6394
- Wolfbeis, O. S.; Knierzinger, A.; Schipfer, R. *J. Photochem.* **1983**, *21*, 67.
- Woolfe, G. J.; Thistlethwaite, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6916.
- Xu, Y.; McCarroll, M. E. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8144.
- Yang, H.; Bohne, C. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 14533.
- Zhang, X.; Gramlich, G.; Wang, X.; Nau, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 254.
- Zhu, A.; Wang, B.; White, J. O.; Drickamer, H. G. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 895.