



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Diana da Costa Dias

**INTERAÇÃO DE CICLODEXTRINAS E  
SURFACTANTES COM O PEPTÍDEO  
GLICIL-L-FENILALANINA**

**VOLUME 1**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, área de especialização em Química Avançada e Industrial orientada pela Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro e pela Doutora Maria Luísa Dias Ramos e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Julho de 2020

# **INTERAÇÃO DE CICLODEXTRINAS E SURFACTANTES COM O PEPTÍDEO GLICIL-L-FENILALANINA**

Diana da Costa Dias

Dissertação do Projeto Científico do 2º ano do Curso de Mestrado em Química, área de especialização em Química Avançada e Industrial, realizado sob Orientação Científica da Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro e da Doutora Maria Luísa Dias Ramos e apresentado ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.



**UNIVERSIDADE D  
COIMBRA**

Julho de 2020

# Agradecimentos

Quero, desde já, agradecer a todos os que me acompanharam neste percurso da minha vida e que estiveram presentes, de uma ou outra forma, para que conseguisse chegar aonde cheguei.

Ao Diogo que foi, e é, o meu pilar em todos os momentos. Não existe ninguém como tu. Por todo o amor, carinho e ajuda que me deste e que tanto precisei. Por estares lá, por existires e por nunca desistires de mim, mesmo quando até eu parecia estar a desistir. Devo-te tudo. Amo-te.

À Professora Doutora Ana Ribeiro que está desde o início do meu percurso académico a orientar-me e que sempre depositou uma enorme confiança em mim e no meu trabalho, permitindo-me crescer académica e pessoalmente. Obrigada por tudo!

À Professora Doutora Luísa Ramos que tive o prazer de conhecer para este projeto e que se tornou uma amiga que me abriu as portas para uma área que me era distante, por toda a orientação e transmissão de conhecimentos.

Ao Doutor João Pina por toda a disponibilidade e ajuda, contribuindo para o meu enriquecimento académico. À Doutora Licínia Simões pela contribuição a nível da química computacional.

Ao Professor Doutor Victor Lobo um muitíssimo obrigado por todo o carinho e disponibilidade que desde sempre ofereceu.

Ao Professor Doutor Artur Valente, meu professor na Licenciatura e Mestrado, agradeço todos os conhecimentos transmitidos em áreas científicas conexas com este trabalho. Ao Professor Doutor Derek Leaiest pela ajuda na interpretação dos dados de difusão. Ao Professor Doutor Miguel Estesó por toda a ajuda na publicação do artigo.

À Doutora Marisa Barros e à Doutora Cecília Santos pelas palavras, carinho e força que me deram ao longo deste ano.

Ao meu Guru da Química um enorme obrigado. Tive o privilégio de o conhecer no meu primeiro ano e foi o meu anjo da guarda até ao final do meu percurso. Não existem palavras suficientes para lhe agradecer.

À minha Mãe e ao meu Pai por todo o vosso suor para que conseguisse concluir esta etapa da minha vida. Obrigada por toda a paciência e por todas as lágrimas que me tiveram de limpar. Deram-me tudo. Ao meu Irmão por acreditar que consigo fazer sempre melhor.

Ao meu Avô, que é o meu orgulho. Por todas as histórias que me conta e todas as distrações valiosas que me dá. Obrigada por, com 93 anos, ainda mostrares interesse no meu percurso e tentares entender o meu curso e aquilo que faço.

À Rita, à Carla e à Adelaide obrigada! Por todo o apoio emocional, por todos os apontamentos e por todo o acompanhamento ao longo destes anos. Foi um percurso lindo e adorei ter-vos do meu lado.

À Susana por seres o meu apoio sempre que preciso e que, mesmo longe, estiveste sempre perto.

Aos amigos do Cantinho, um brinde!

E, como não podia faltar, aos meus animais que me ajudam a ser como sou e que têm um papel fundamental na minha vida. É um amor inexplicável.

# Índice

<b>ÍNDICE</b> .....	III
<b>ABREVIATURAS</b> .....	V
<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 PEPTÍDEOS .....	3
1.1.1 A glicil-L-fenilalanina .....	3
1.2 A QUÍMICA SUPRAMOLECULAR .....	4
1.2.1 Química <i>host-guest</i> .....	5
1.2.2 Ciclodextrinas .....	5
1.2.2.1 $\beta$ -ciclodextrina .....	7
1.3 AGENTES TENSIOATIVOS .....	8
1.3.1 Dodecilsulfato de sódio (SDS) .....	11
<b>CAPÍTULO II - EXPERIMENTAL</b> .....	13
2.1 REAGENTES .....	14
2.2 METODOLOGIA E PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES .....	14
2.2.1 Medidas de coeficientes de difusão mútua ( <i>Método de dispersão de Taylor</i> ) .....	14
2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	17
2.2.3 Espectroscopia de fluorescência .....	19
2.2.4 Estudos computacionais.....	19
<b>CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>SISTEMA GLICIL-L-FENILALANINA + <math>\beta</math>-CICLODEXTRINA</b> .....	22
3.1 Método de dispersão de Taylor .....	22
3.1.1 Difusão em sistemas binários: medição e sua interpretação .....	23
3.1.2 Difusão em sistemas ternários: medição e sua interpretação .....	25
3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	31
3.2.1 Espectros RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	31
3.2.2 Espectro 2D-RMN de NOESY .....	35
3.2.3 Gráfico de Job .....	36
3.3 Espectroscopia de fluorescência .....	40
3.4 Estudos computacionais.....	43
3.4.1 Estudos DFT .....	43
3.4.2 Estudos TD-DFT.....	45

SISTEMA GLICIL-L-FENILALANINA + DODECILSULFATO DE SÓDIO .....	48
3.5 Método de dispersão de Taylor .....	48
3.5.1 Difusão de SDS em sistemas binários: bibliografia .....	48
3.5.2 Difusão em sistemas ternários: medição e sua interpretação .....	49
3.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	53
3.6.1 Espectros RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e de $^{23}\text{Na}$ .....	53
3.6.2 Gráfico de Job .....	59
3.7 Espectroscopia de fluorescência .....	64
<b>CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>76</b>

## Abreviaturas

CMC	Concentração micelar crítica
$c$	Concentração de uma substância
$D$	Coefficientes de difusão mútua
DFT	Teoria dos funcionais da densidade
PCM	Meio contínuo polarizável
pH	Potencial de hidrogénio iónico
pH*	Potencial de deutério iónico
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
T	Temperatura
$t$	Tempo
TD-DFT	Teoria dos funcionais da densidade dependente do tempo
TMS	Tetrametilsilano
u.a.	Unidades arbitrárias
2D-NOESY	Espectro bidimensional de efeito <i>overhauser</i> nuclear
$\delta$	Desvio químico
$\sigma_d$	Termo diamagnético
$\sigma_p$	Termo paramagnético

## Resumo

Esta dissertação de Mestrado em Química tem como objetivo principal o estudo estrutural da interação de ciclodextrinas e surfactantes com o peptídeo glicil-L-fenilalanina. Quer as ciclodextrinas, quer os surfactantes são profusamente utilizados em formulações farmacêuticas e agroquímicas com o objetivo de melhorar a eficiência do princípio ativo.

Os estudos centram-se no estudo comparativo da interação do peptídeo glicil-L-fenilalanina (Gly-L-Phe) com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e dodecilsulfato de sódio (SDS).

Para ambos os sistemas (peptídeo/ciclodextrina e peptídeo/surfactante), pretende-se a determinação dos locais de interação dos peptídeos com as respectivas moléculas de aditivo, as alterações conformacionais e as respectivas constantes de associação e sua relação com a hidrofobicidade do peptídeo. Adicionalmente, este projeto tem também como objetivo a compreensão da química-física de fenómenos de transporte desses sistemas multicomponente. Assim, propomos um estudo experimental e computacional abrangente da difusão mútua isotérmica do peptídeo e transportadores isolados e do peptídeo em combinação com moléculas transportadoras (ciclodextrinas e surfactantes), visando avaliar *in situ* constantes de ligação termodinâmicas para possíveis complexos peptídeo / transportadores e fornecer informações abrangentes detalhadas tanto de ordem cinética como termodinâmica para esses sistemas com interesse biológico.

As técnicas experimentais utilizadas foram o estudo da difusão mútua multicomponente pelo método de dispersão de Taylor; a espectroscopia de RMN uni- e bidimensional de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e, adicionalmente, a espectroscopia de RMN de  $^{23}\text{Na}$ , em paralelo com o estudo da espectroscopia de absorção de UV/Vis, espectroscopia de fluorescência e estudos teóricos computacionais.

## Abstract

The objective of this project for my Master's thesis in Chemistry is the structural study of the interaction of cyclodextrins and surfactants with the peptide glycyl-L-phenylalanine. Both cyclodextrins and surfactants are commonly used in pharmaceutical and agrochemical formulations in order to improve the efficiency of the active ingredient.

The studies have been focused on the comparative study of the interaction of the peptide glycyl-L-phenylalanine (Gly-L-Phe) with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and sodium dodecyl sulfate (SDS).

For both systems (peptide / cyclodextrin and peptide / surfactant), it is intended to determine the sites of interaction of the peptides with the respective additive molecule, the conformational changes and the respective association constants and their relationship with the hydrophobicity of the peptide. Additionally, this project also has in view the understanding of the physical-chemistry of transport phenomena of these multicomponent systems. With this, we propose a comprehensive experimental and computational study of the isothermal mutual diffusion of the peptide and isolated transporters and of the peptide in combination with the carrier molecules (cyclodextrins and surfactants), aiming to evaluate *in situ* thermodynamic binding constants for possible peptide / carrier complexes and provide comprehensive and detailed information on both kinetics and thermodynamic details for these systems of biological interest.

The experimental techniques used are the study of multicomponent mutual diffusion by Taylor dispersion; the  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopy and, in addition, the  $^{23}\text{Na}$ NMR spectroscopy; in parallel, we also used UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopy; and complemented by DFT and TD-DFT studies.

# Capítulo I

---

---

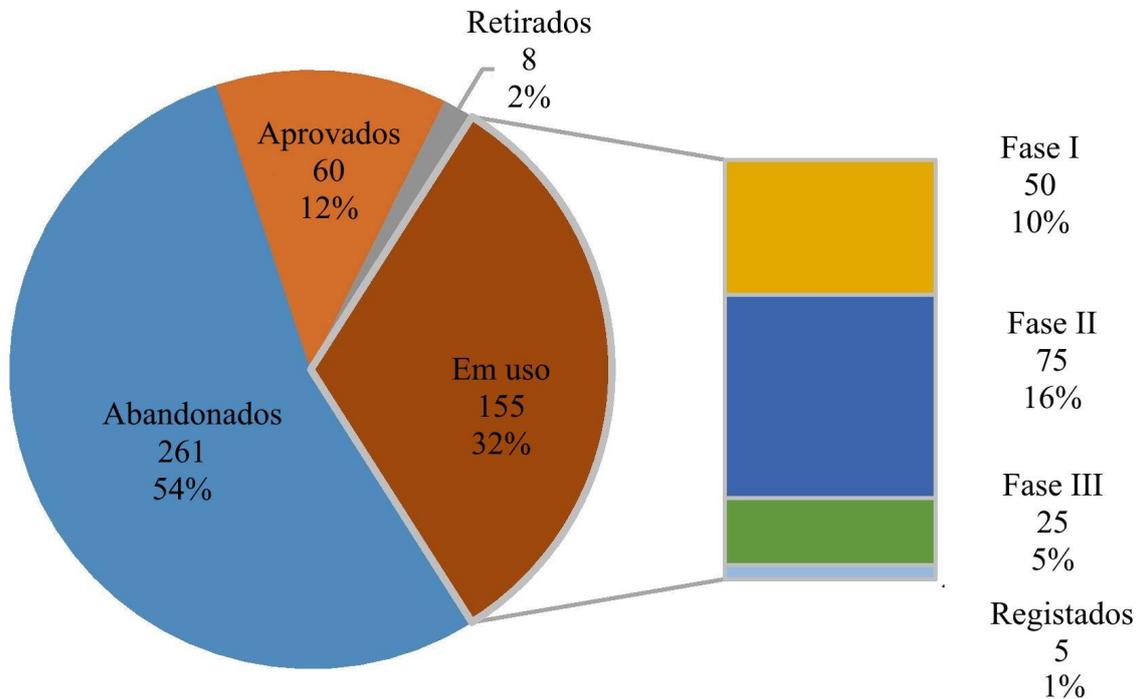
Introdução

---

---

A utilização de peptídeos terapêuticos na indústria farmacêutica aumentou sustentadamente devido à ampla gama de atividade e especificidade que estes apresentam e, geralmente, com baixa toxicidade e rápida metabolização [1].

A terapêutica peptídica tem desempenhado um papel fundamental na prática médica desde o advento da insulinoterapia na década de 1920 e os peptídeos continuam a entrar no desenvolvimento clínico em ritmo constante [1].



**Figura 1.1** – Utilização de peptídeos terapêuticos (adaptado de [1]).

É expectável uma crescente atividade na síntese de novos medicamentos à base de peptídeos, como resultado dos avanços na área da biotecnologia. Decorrente deste interesse, é necessário estabelecer conhecimentos do comportamento de peptídeos terapêuticos em solução aquosa e na presença de diferentes agentes transportadores, com particular relevância para a sua constante de associação [2].

Neste trabalho estudaram-se interações de um dipeptídeo, a glicil-L-fenilalanina, com dois tipos de transportadores: um composto supramolecular,  $\beta$ -ciclodextrina, e um agente tensioativo, dodecilsulfato de sódio.

## 1.1 Peptídeos

Os peptídeos consistem em cadeias de aminoácidos ligadas entre si através de ligações peptídicas (ligações amida), formando um grupo heterogêneo de compostos devido ao elevado número de aminoácidos naturais diferentes que se encontram na sua composição e ao tamanho da cadeia dos resíduos. Na nomenclatura, são adicionados prefixos aos peptídeos consoante o seu número de aminoácidos, como di-, tri- ou tetra-peptídeo. O termo “oligopeptídeo” refere-se a peptídeos com 10 ou menos aminoácidos enquanto que o termo “polipeptídeo” se refere a peptídeos com pesos moleculares mais altos. O ponto de transição de polipeptídeo para proteína não está exatamente definido, embora se comecem a considerar proteínas com pelo menos cem resíduos [2].

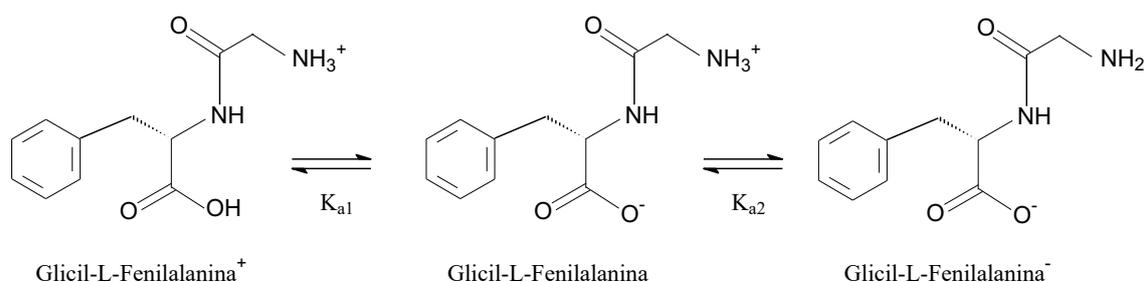
Uma das possíveis aplicações dos peptídeos é na síntese de estruturas orgânicas metálicas biocompatíveis e não-tóxicas (*MOF's*). Os peptídeos possuem “locais ativos” onde os catiões metálicos se podem ligar para formar diferentes *MOF's* [3]. A capacidade de complexação dos dipeptídeos com os iões metálicos permite o melhor entendimento de processos de hidrólise de proteínas [4] e remoção de iões metálicos em águas residuais [5]. Outro tipo de utilização, é sob a forma de substrato para encapsular e libertar fármacos, atuando como âncoras entre o transportador e o fármaco [5].

### 1.1.1 A glicil-L-fenilalanina

A glicil-L-fenilalanina (Gly-L-Phe) é um dipeptídeo que tem na sua composição dois aminoácidos diferentes, a glicina e o resíduo de L-fenilalanina. A sua fórmula molecular é  $C_{11}H_{14}N_2O_3$  e tem um peso molecular de 222,24 ( $g\ mol^{-1}$ ). Encontra-se referenciada nos sistemas americano e europeu como CAS 3321-03-7 e EC 222-027-9, respetivamente.

Este dipeptídeo é resultante do produto incompleto da digestão ou catabolismo proteico. É sabido que alguns dipeptídeos apresentam efeitos fisiológicos ou de sinalização celular, sendo que a maioria são simples intermediários de vida curta a caminho de vias específicas de degradação de aminoácidos após proteólise adicional. Este dipeptídeo ainda não foi identificado em biofluidos ou tecidos humanos sendo, por isso, classificado como um metabolito “esperado” [6].

As características dos aminoácidos influenciam a sua protonação e desprotonação, pois encontram-se em solução sob a forma zwitteriônica, que tanto pode aceitar como doar prótons [7]. No Esquema 1.1, encontram-se representadas as várias formas protonadas da Gly-L-Phe em função do pH. Como se pode verificar, a pH baixo a Gly-L-Phe encontra-se protonada ( $\text{CO}_2\text{H}$  e  $\text{NH}_3^+$ ), a pH intermediário sob a forma zwitteriônica e a pH elevado encontra-se desprotonada ( $\text{CO}_2^-$  e  $\text{NH}_2$ ). Os valores de  $\text{pK}_{a1}$  e  $\text{pK}_{a2}$  são 3,23 e 8,11, respetivamente [8].



**Esquema 1.1** – Representação esquemática das várias formas protonadas da glicil-L-fenilalanina em função do pH, a pH baixo, intermédio e elevado, respetivamente.

## 1.2 A química supramolecular

A química molecular – a química da ligação covalente – preocupa-se em descobrir e dominar as regras que conduzem as estruturas, propriedades e transformações de espécies moleculares. A química supramolecular foi definida por Jean-Marie Lehn, que recebeu o Prémio Nobel em 1987 [9], e pode ser definida como "a química para além da molécula", com sistemas químicos organizados de maior complexidade que resultam da associação de duas ou mais espécies químicas que interatuam através de forças intermoleculares não-covalentes, tais como, interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, ligações de hidrogénio e interações de *Van der Waals*. Como é sabido, este tipo de forças são bastante fracas, mas como são estabelecidas em elevado número para um mesmo sistema, formam-se alterações nas propriedades dos constituintes dessa mesma associação [10, 11].

O trabalho na química supramolecular moderna abrange, não só sistemas de inclusão (*host-guest*), como também dispositivos e máquinas moleculares, reconhecimento molecular – como auto-agregação (*self-assembly*) e auto-organização

(*self-organisation*) – e tem interfaces com o aparecimento de matéria complexa e nanoquímica. É importante sublinhar que as reações de *self-assembly* e de *self-organisation* dependem apenas das informações intrínsecas, contidas na estrutura dos componentes moleculares [12].

A formação de complexos supramoleculares contendo peptídeos é de elevada importância, pois estes complexos podem ser aplicados em diversas áreas como, por exemplo, catálise [13] e utilização como sensores [14]. A interação da Gly-L-Phe com os diferentes macrociclos já foi relatada em estudos de interação entre *p*-sulfonato de sódio calix[4]areno : Gly-L-Phe que levaram à formação de um complexo 1 : 1 com uma constante de associação de  $K = 1698 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Nesse estudo, também se verificou que um aumento no tamanho do anel do macrociclo levava a uma constante de associação de  $1905 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Esta pequena mudança sugere que a interação do grupo fenil com o anel do macrociclo não desempenha o papel principal no processo de complexação [15].

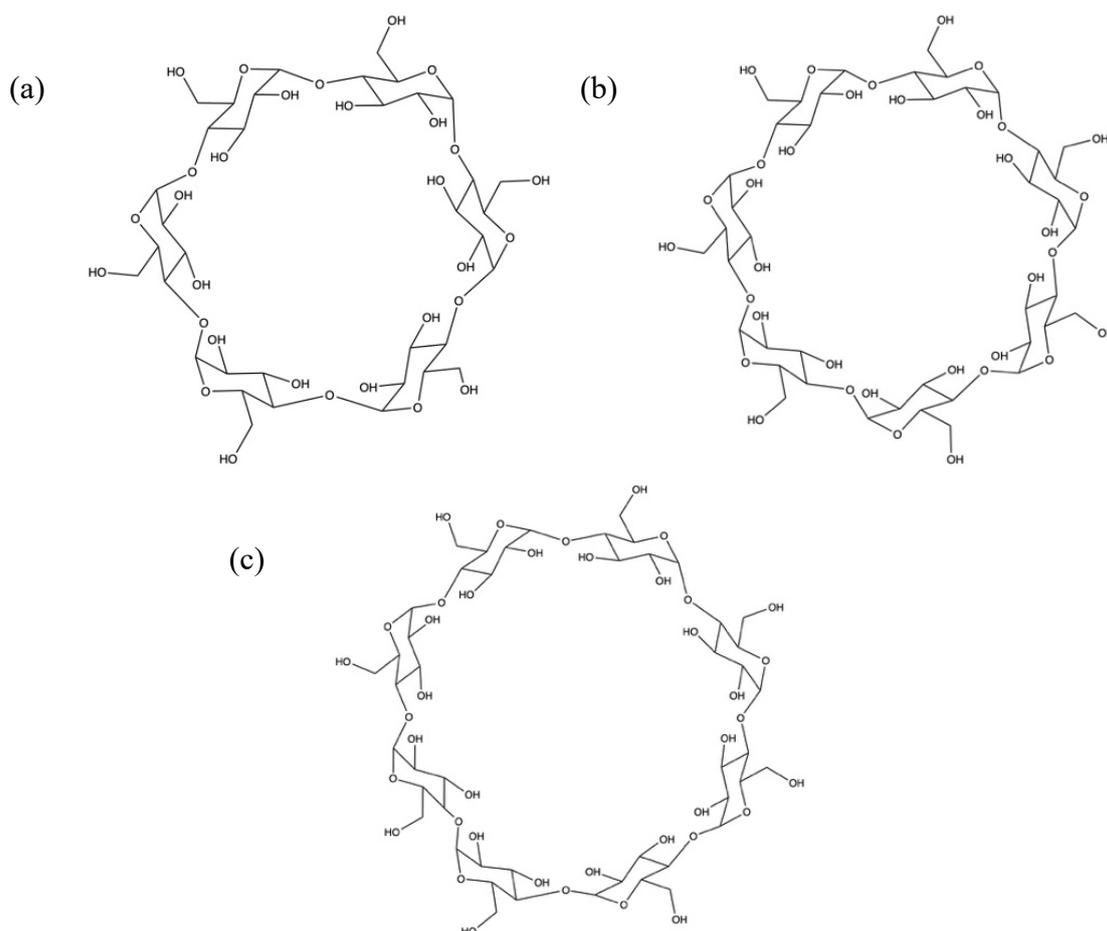
### 1.2.1 Química *host-guest*

A química *host-guest* é uma face da química supramolecular. Reporta-se a duas ou mais moléculas, o *host* (espécie hospedeira) e o *guest* (espécie incluída), que estão envolvidas em interações não covalentes para formar um complexo supramolecular. De acordo com Cram [16], o componente *host* é uma molécula ou ião cujos locais de ligação convergem no complexo, enquanto que o componente *guest* (sendo o mais pequeno entre os dois), é qualquer molécula ou ião cujos locais de ligação divergem no complexo. Este tipo de complexação gera, usualmente, diferenças de comportamento significativas que podem ser vistas como vantagens no processo farmacêutico, tal como o aumento da solubilidade em água. Posteriormente, o *guest* pode sair para um meio para o qual tenha mais afinidade, algo que não acontece com as ligações covalentes. Esta saída pode ser modulada pela cinética de libertação, algo que é aplicado, por exemplo, a perfumes para manterem o cheiro durante mais tempo [17].

### 1.2.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por seis, sete ou oito unidades de  $\alpha$ -glucopiranosose, para  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -ciclodextrinas (as mais comuns),

respetivamente (Figura 1.2). As ciclodextrinas são solúveis em água e insolúveis na maior parte dos solventes orgânicos, contudo a sua solubilidade aumenta com o aumento da temperatura [18]. Como consequência do seu arranjo espacial, a sua cavidade é relativamente hidrofóbica enquanto a superfície externa é hidrofílica. Devido a esse caráter não polar relativo da cavidade em comparação com o exterior polar, as CDs podem formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas como, por exemplo, as que contêm grupos aromáticos, predominantemente devido a interações hidrofóbicas [19, 20].



**Figura 1.2** – Representação esquemática dos oligossacarídeos cíclicos  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina, respetivamente (a), (b) e (c).

As CDs apresentam uma estrutura de cone truncado com cavidades internas que variam entre 5 a 8 Å. As ligações carbono / oxigénio no anel apontam para o interior formando uma cavidade hidrofóbica. Os pares de eletrões não-ligantes das ligações glicosídicas encontram-se direcionados para o interior da cavidade, gerando uma alta

densidade de elétrons, conferindo-lhe um carácter básico de Lewis. Os grupos hidroxilo primários e secundários localizam-se nas arestas estreitas e largas, respetivamente, do cone truncado. Como resultado do arranjo espacial dos grupos funcionais nas moléculas de ciclodextrina, a cavidade apresenta um carácter relativamente hidrofóbico, enquanto as superfícies externas são hidrofílicas [19]. É devido à sua estrutura e cavidade hidrofóbica que as CDs formam compostos de inclusão com uma extensa variedade de moléculas. A única característica, aparente, dos *guests* é possuírem uma dimensão que permita que entrem, parcial ou totalmente, na cavidade das CDs [11].

É possível formar complexos de inclusão com diferentes estequiometrias, sendo as mais comuns 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1 e 2 : 2 (complexo CD : espécie incluída), dependendo do tamanho e das características estruturais do complexo em relação à cavidade da espécie incluída [11]. A ligação é cooperativa e ocorre se o número de locais de ligação de uma macromolécula que são ocupados por um tipo específico de ligando é uma função não linear da concentração desse ligando. Isso pode ser devido, por exemplo, a uma afinidade que depende da quantidade de ligando que se encontra ligado. A cooperatividade pode ser positiva (supralinear) ou negativa (infralinear), sendo observada nas proteínas, mas os ácidos nucleicos também a podem apresentar. A ligação cooperativa demonstrou ser o mecanismo subjacente a uma grande variedade de processos bioquímicos e fisiológicos [21].

### 1.2.1.1 $\beta$ -ciclodextrina

A fórmula molecular da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) é  $C_{42}H_{70}O_{35}$  e tem um peso molecular de 1134,98 ( $g\ mol^{-1}$ ). Encontra-se referenciada nos sistemas americano e europeu como CAS 7585-39-9 e EC 231-493-2, respetivamente.

Entre os diferentes tipos de ciclodextrinas, a  $\beta$ -ciclodextrina é uma das mais utilizadas, devido à sua relativa facilidade de síntese, ao seu baixo custo e, também, ao tamanho da cavidade interna na qual um elevado número de moléculas é inserida. No entanto, a  $\beta$ -CD apresenta uma grande desvantagem perante as  $\alpha$ - e  $\gamma$ -CDs, uma baixa solubilidade em água. Esta característica é frequentemente discutida em termos da força de ligação das moléculas no estado cristalino e da ligação intramolecular do hidrogénio no anel da  $\beta$ -CD, impedindo a formação de ligações de hidrogénio com as moléculas de água circundantes [19]. Isto deve-se ao facto de a  $\beta$ -CD, nos grupos hidroxilo C2 e C3,

das unidades adjacentes  $\alpha$ -D-glucopiranosil se orientarem de maneira a terem uma interação máxima entre si, comparativamente com as outras CDs. O anel da  $\alpha$ -CD é mais tenso, o que resulta em grupos hidroxilo mais distantes, permitindo-lhes uma maior interação com a água, proporcionando uma maior solubilidade. No caso da  $\gamma$ -CD, o anel é menos tenso do que os das  $\alpha$ - e  $\beta$ -CDs, o que provoca uma menor interação dos grupos hidroxilo entre si e uma maior interação com a água [18].

No laboratório da Doutora Ana Ribeiro, foram medidos coeficientes de difusão mútua ternários de  $\beta$ -CD e espécies incluídas a 298,15 K. No ano de 2009, os coeficientes de difusão mútua ternários de  $\beta$ -CD e cafeína [22]; e em 2015, de soluções aquosas de  $\beta$ -CD com um fármaco, a levodopa, onde, complementarmente, foram realizados os espectros RMN de  $^1\text{H}$  [23]. Os coeficientes de difusão foram medidos com vista a uma melhor compreensão da estrutura e comportamento termodinâmico das espécies em solução.

### 1.3 Agentes tensioativos

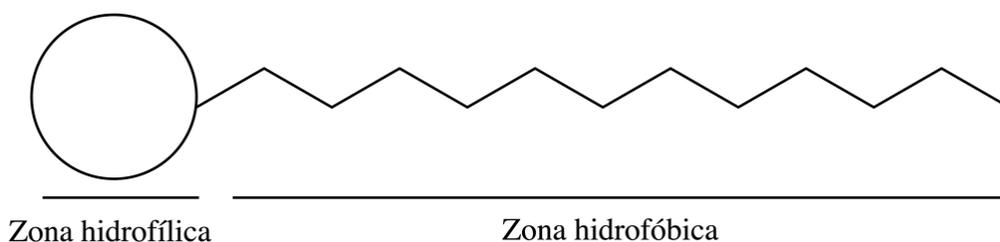
A palavra surfactante refere-se a um agente ativo de superfície (tensioativo), e significa, literalmente, ativo numa superfície. Estes compostos químicos reduzem a tensão superficial quando adicionados a um solvente ou solução. Quanto maior for o empacotamento das moléculas da interface, maior será a redução da tensão na superfície, o que significa que os surfactantes são estabilizadores de interfaces [24]. O termo interface denota um limite entre duas fases imiscíveis; o termo superfície indica que uma das fases é um gás. Os surfactantes podem adsorver em cinco interfaces diferentes: sólido – vapor; sólido – líquido; sólido – sólido; líquido – vapor; líquido – líquido, sendo as mais comuns as que envolvem uma fase líquida (água, no caso de sistemas aquosos) [25].

Na Tabela 1.1 encontram-se alguns exemplos de interfaces que envolvem uma interface líquida [25].

**Tabela 1.1** – Exemplos de interfaces, envolvendo uma fase líquida (adaptado de [25]).

Interface	Tipo de sistema	Exemplo de produto
Sólido – Líquido	Suspensão	Tinta
Líquido – Líquido	Emulsão	Leite, nata
Líquido – Vapor	Espuma	Creme de barbear

As moléculas de surfactante são substâncias anfífilas, ou seja, apresentam, pelo menos duas partes: uma que é solúvel num determinado fluido (parte liófila) e outra insolúvel para esse mesmo fluido (parte liófoba). Para soluções aquosas, referimo-nos como partes hidrofílica e hidrofóbica, respetivamente. Refere-se a parte hidrofílica como o grupo principal, a “cabeça” polar, que corresponde a grupos químicos fortemente polares ou carregados; e a parte hidrofóbica, comumente designada por “cauda”, é integrada por uma ou mais cadeias hidrocarbonadas, lineares ou ramificadas, saturadas ou insaturadas, com um comprimento entre os 8 e 20 átomos de carbono, podendo ser alifática, aromática ou uma conjugação das duas [24]. As moléculas anfífilas apresentam duas propriedades muito importantes: auto-agregação (formação de micelas) e adsorção a interfaces e superfícies. A Figura 1.3 representa, esquematicamente, uma molécula de surfactante. Para a forma micelar, o grupo hidrofóbico do surfactante é direcionado para o interior do aglomerado e a “cabeça” polar é direcionada para o solvente também polar [25]. É necessário considerar a estrutura química e a carga associada às partes hidrofílicas das moléculas de surfactante. Podem dividir-se em quatro classes: catiónicos, aniónicos, não-iónicos e zwitteriónicos [26].

**Figura 1.3** – Representação esquemática de uma molécula de surfactante.

Quando em solução, a parte hidrofílica da molécula de surfactante é fortemente ligada às moléculas de solvente, o que faz com que as forças de repulsão entre as partes hidrofóbica e solvente se tornem pouco significantes. Assim sendo, as moléculas na superfície e no interior alinham-se de forma a que a parte hidrofílica fique virada para o

solvente e a parte hidrofóbica o mais afastada possível. Assim, os monómeros de surfactante no interior da solução vão agrupar-se e formar agregados de forma esférica, cilíndrica ou lamelar. As micelas, por sua vez, não são as únicas estruturas constituintes em solução surgindo, também, micelas invertidas (agregados de moléculas de surfactante em meio apolar, formando micelas com as “cabeças” polares orientadas para o interior e “caudas” para o exterior [25, 27]); membranas ou bicamadas (duas monocamadas de moléculas paralelas com as cadeias carbonadas orientadas umas para as outras [25]); vesículas (surfactantes de bicamadas com duas fases aquosas distintas, uma no centro e outra no exterior [28]); ou microemulsões bicontínuas (dispersões termodinamicamente estáveis de óleo e água [29]). As vesículas e as micelas podem, ainda, formar estruturas cilíndricas [24].

O grupo polar dos surfactantes é o grupo determinante das propriedades físico-químicas de um surfactante, embora estes também dependam do comprimento da cadeia carbonada, das suas ramificações e da posição do grupo polar ligado à cadeia hidrocarbonada [24]. Ao medir as diferentes propriedades físico-químicas das soluções aquosas de um surfactante, que é suficientemente polar para ser solúvel em água até uma concentração relativamente alta, é possível encontrar algumas peculiaridades para um surfactante iónico. Por exemplo, a tensão superficial, assim como a pressão osmótica, assumem um valor aproximadamente constante, enquanto a auto-difusão (*self-diffusion*) começa a diminuir. Isto sugere que há uma mudança de uma solução que contém moléculas ou iões de surfactantes simples, i.e., unímeros, para uma solução onde o surfactante se comporta cada vez mais como um estado *self-assembled* ou *self-associated* [25].

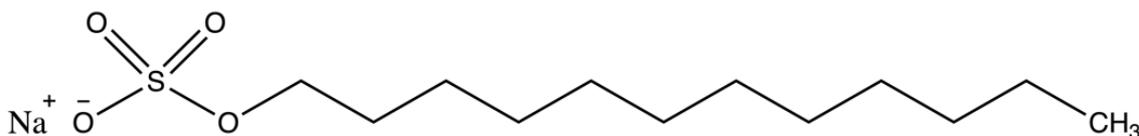
Como antes referido, outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de os unímeros em solução formarem agregados – as micelas. A formação das micelas, micelização, é um mecanismo alternativo à adsorção nas interfaces, que remove os grupos hidrofóbicos do contacto com a água, reduzindo a energia livre do sistema. Os surfactantes autoagregam-se de forma espontânea, quando não pode haver mais unímeros à superfície, atingindo um equilíbrio entre os unímeros que se encontram à superfície e em solução. Este processo é de elevada relevância pois as moléculas de surfactante têm diferentes comportamentos na forma micelar e na forma de unímeros livres em solução. As micelas são formadas em concentrações baixas de surfactante em água. A concentração para a qual as micelas se começam a formar é denominada de concentração micelar crítica (CMC) [25]. As formas mais comuns de medir a CMC é através da tensão

superficial, da solubilização de um composto que outrora era insolúvel ou através da condutividade (para moléculas anfifílicas iónicas). Depois de se atingir a CMC, começa a haver formação de micelas.

### 1.3.1 Dodecilsulfato de sódio (SDS)

As propriedades de moléculas anfifílicas, tais como a adsorção a interfaces, *self-assembly*, formação micelar, etc., desempenham um importante papel em aplicações industriais, alterando as suas funções biológicas, podendo ser utilizadas como fármacos, detergentes, cosmética, etc. Ao variar a estrutura molecular dos surfactantes e outras condições (presença de sais, pH, temperatura, entre outros), altera-se a CMC e outras propriedades do sistema [26].

O dodecilsulfato de sódio (SDS ou NaDS) é um surfactante aniónico pertencente aos surfactantes de alquilsulfatos. É um composto orgânico sintético (sal) que apresenta uma estrutura anfifílica composta por um grupo organossulfato aniónico (cadeia da cauda com doze átomos de carbono) ligado a um grupo sulfato [26]. A sua fórmula química é representada por  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$  e tem uma massa molecular igual a 288,38 ( $\text{g mol}^{-1}$ ) (Figura 1.4). Encontra-se referenciada nos sistemas americano e europeu como CAS 151-21-3 e EC 205-788-1, respetivamente.



**Figura 1.4** – Representação de uma molécula de dodecilsulfato de sódio (SDS).

Os surfactantes aniónicos são considerados a maior classe de surfactantes e não são, geralmente, compatíveis com os surfactantes catiónicos (apesar de existirem algumas exceções). Os grupos polares são o carboxilato, sulfonato e fosfato. Estes surfactantes são sensíveis à água dura, i.e., água que contém uma quantidade elevada de sais dissolvidos, particularmente de cálcio e magnésio.

O SDS é amplamente utilizado a nível industrial e, também, em diversos estudos devido às suas propriedades físico-químicas, podendo ser encontrado em produtos de

utilização diária, tais como, pastas de dentes, detergentes, etc. Assim sendo, considera-se que o SDS pode funcionar como agente de limpeza emulsificador.

Existem algumas técnicas que permitem o cálculo da CMC, entre elas, as medidas de auto-difusão e difusão mútua [30], RMN e espectroscopia de fluorescência. É sabido que a CMC diminui drasticamente com o aumento do comprimento da cadeia alquílica do surfactante [25]. O valor da concentração micelar crítica para o SDS é  $8,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  [31].

Neste mesmo laboratório, foram medidos coeficientes de difusão mútua ternários de SDS e espécies incluídas a 298,15 K. Em 2001, os coeficientes de difusão mútua ternários de SDS e sucrose [32]; e em 2005, relativos à interação de SDS com um polímero, utilizando-se a técnica de espectroscopia de RMN e espectroscopia de fluorescência [33].

# Capítulo II

---

---

Experimental

---

---

Neste capítulo é feita uma descrição dos reagentes e equipamentos que foram utilizados para a realização das atividades experimentais que integram este trabalho.

## 2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram a glicil-L-fenilalanina (Gly-L-Phe) ( $\geq 99\%$ ), a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) ( $> 97\%$ ) e o dodecilsulfato de sódio (SDS) (98,5%), todos eles em estado sólido. Estes reagentes foram fornecidos pela *Sigma-Aldrich*. As soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura Tipo I, produzida localmente (*Millipore* mod. Direct Q® 3UV-R, 18,2  $\Omega$  m a 298,15 K). No sistema Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD, para a obtenção dos espectros de RMN, foram preparadas soluções em D<sub>2</sub>O (0,999, *Aldrich*) ou soluções em H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O (30%) de Gly-L-Phe e  $\beta$ -CD, assim como soluções de Gly-L-Phe na presença de  $\beta$ -CD. Para o sistema Gly-L-Phe + SDS, preparam-se soluções em D<sub>2</sub>O de Gly-L-Phe e de SDS, assim como soluções de Gly-L-Phe na presença de SDS.

## 2.2 Metodologia e preparação das soluções

Nos procedimentos experimentais deste trabalho foram utilizadas quatro técnicas analíticas: o método de dispersão de Taylor, a espectroscopia de RMN, a espectroscopia de fluorescência e os estudos computacionais.

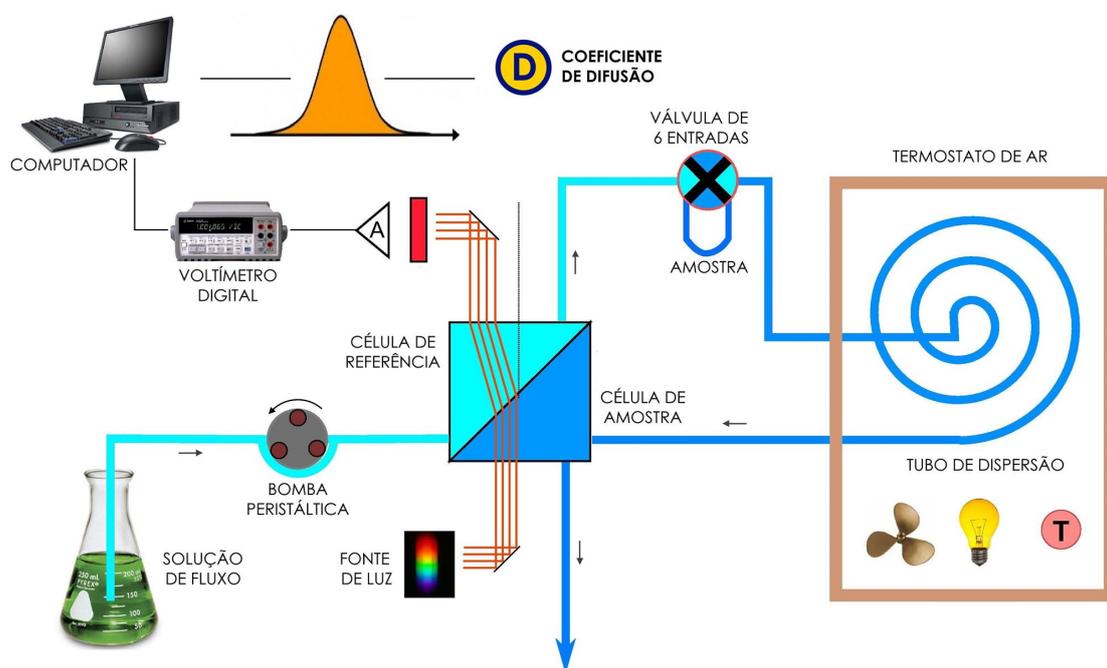
### 2.2.1 Medidas de coeficientes de difusão mútua (Método de dispersão de Taylor)

Foram preparadas diversas soluções aquosas de  $\beta$ -CD e Gly-L-Phe (com as concentrações que se indicam nas tabelas do Capítulo III) utilizando água ultra-pura Tipo I, conforme antes referido. Para cada experiência de difusão de sistemas binários foi necessária a preparação de duas soluções – a solução de fluxo e a solução de injeção – e, no caso da difusão para sistemas ternários, foi necessária a preparação de três soluções diferentes – a solução de fluxo e duas soluções de injeção.

Todo o material de vidro (Classe A) foi cuidadosamente lavado e enxaguado com duas passagens de água destilada e uma passagem com água ultra-pura Tipo I. O material foi seco em estufa a 50 °C e arrefecido em local protegido.

O método de dispersão de Taylor para a medição de coeficientes de difusão fundamenta-se na dispersão de amostras de solução injetadas num fluxo laminar de solvente puro (ou soluções de diferente composição), que se movimentam num longo tubo capilar cilíndrico.

A instalação encontra-se representada na Figura 2.1. Um fluxo de  $0,23 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  (de solvente puro ou solução) é gerado por uma bomba peristáltica de precisão (*Gilson* model Minipuls 3). Uma válvula de injeção de seis entradas (*Rheodyne* model 5020) foi utilizada para introduzir amostras de  $0,063 \text{ cm}^3$  de solução no fluxo laminar. O tubo de dispersão (*VFW*, *teflon*, comprimento  $(3279,9 \pm 0,1) \text{ cm}$  e raio interno  $(0,0322 \pm 0,0003) \text{ cm}$  é mantido à temperatura de  $(25,00 \pm 0,01) \text{ °C}$  num termostato de ar [34].



**Figura 2.1** – Esquema funcional do sistema de dispersão de Taylor (Fonte: Luís Veríssimo).

No extremo distal do tubo é instalado um refratómetro diferencial (*Waters* mod. 2410) para monitorização da dispersão. O detetor gera tensões,  $V(t)$ , que são medidas em intervalos de 15 segundos com um voltímetro digital (*Agilent* mod. 34401A). Para cada medida são tomadas cinco leituras de  $V(t)$ . Os valores extremos, maior e menor, são

desprezados, sendo feita a média dos três valores intermédios que é guardada no sistema informático.

Antes de cada experiência, foi realizada uma limpeza do sistema e passagem de água até estabilizar a linha de base. De seguida é bombeada a solução de fluxo até estabilizar, novamente, a linha de base.

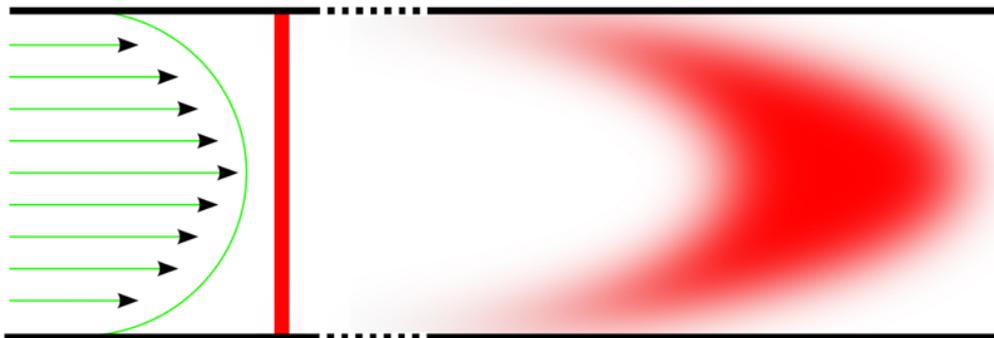
De seguida, insere-se uma seringa de 3 mL para encher o *loop* da amostra com a solução que será dispersa. É de extrema importância que, durante este período de tempo em que se efetua a injeção, esteja certificado que não se encontra nenhuma bolha de ar. Ao acionar a válvula, o fluxo passa a interagir com a amostra, iniciando a difusão.

O detetor tem duas células, uma célula de referência dinâmica no extremo proximal do tubo onde o fluxo passa continuamente; e uma célula de amostra no extremo distal do tubo. Esta instalação permite minimizar os efeitos de velocidade na refração medida pelo detetor. Os coeficientes de difusão,  $D$ , são estabelecidos pelo ajuste da equação de dispersão às tensões medidas (Equação 2.1) [20].

$$V(t) = V_0 + V_1 t + V_{m\acute{a}x} \left( \frac{t_R}{t} \right)^{1/2} \exp \left[ \frac{-12 D (t - t_R)^2}{r^2 t} \right] \quad (2.1)$$

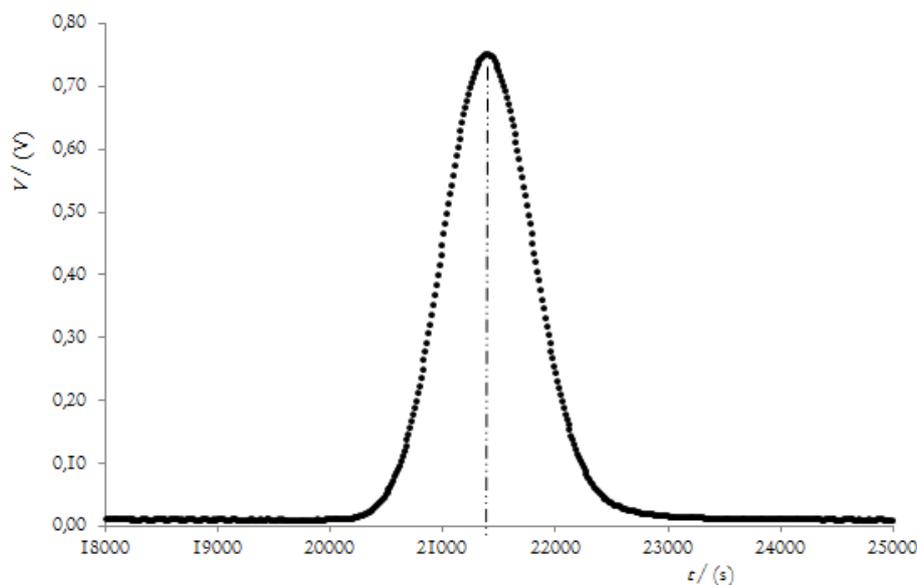
Os parâmetros da equação são o tempo médio de retenção da amostra,  $t_r$ , o máximo de tensão no pico,  $V_{max}$ , a tensão da linha de base,  $V_0$ , o declive da linha de base,  $V_1$  e o raio interno do tubo de dispersão,  $r$ .

Durante o percurso de difusão, a amostra sofre dispersão, difundindo nas duas interfaces com o fluxo – anterior e posterior (Figura 2.2).



**Figura 2.2** – Difusão radial da amostra difundente, na injeção e em difusão (Fonte: Luís Veríssimo).

Por fim, o perfil de saída é estatisticamente tratado através do método de mínimos desvios quadrados, onde se obtém o valor para o coeficiente de difusão mútua,  $D$ . Este perfil de tensões de dispersão de uma amostra típica encontra-se retratado na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Perfil de tensões à saída da dispersão de uma amostra (Fonte: Luís Veríssimo).

## 2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Para ambos os sistemas, todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{23}\text{Na}$  foram obtidos num espectrómetro de RMN de 500 MHz (*Bruker Avance III HD*) instalado se no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, operando a 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ), 125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) e 132,29 MHz ( $^{23}\text{Na}$ ). O sinal do *tert*-butanol foi usado como referência interna nos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta = 1,3$  ppm e  $\delta = 31,2$  ppm, respetivamente, relativamente ao TMS), enquanto para os espectros de  $^{23}\text{Na}$  foi usado como referência externa o sinal do espectro de  $^{23}\text{Na}$  de uma solução de NaCl  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ . Também para ambos os sistemas, os valores de pH\* das soluções, que se encontram incluídos nas legendas dos espectros e respetivas tabelas, foram medidos utilizando um medidor de pH à temperatura ambiente, após padronização com tampões aquosos ( $\text{H}_2\text{O}$ ) [35].

Para o sistema Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD, numa fase prospetiva do trabalho, foram preparadas soluções de  $\beta$ -CD  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH\* 6,5; Gly-L-Phe  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH\* 6,2;

e Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD (10 : 10) mmol dm<sup>-3</sup>, pH\* 6,3 e obtidos os respectivos espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C a 298,15 K.

A determinação da estequiometria do complexo Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD, determinada pelo método de variação contínua (gráfico de Job) [36, 37, 38], envolveu a preparação de várias soluções contendo tanto o Gly-L-Phe como a  $\beta$ -CD em diferentes proporções mantendo constante a concentração total [Gly-L-Phe] + [ $\beta$ -CD] igual a 8 mmol dm<sup>-3</sup>, para cada solução. Assim, prepararam-se as soluções-mãe de  $\beta$ -CD e Gly-L-Phe, ambas com concentrações 8 mmol dm<sup>-3</sup>. A partir destas, prepararam-se soluções de Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD com concentrações (6 : 2) mmol dm<sup>-3</sup>, (1 : 7) mmol dm<sup>-3</sup>, (2 : 6) mmol dm<sup>-3</sup>, (3 : 5) mmol dm<sup>-3</sup>, (4 : 4) mmol dm<sup>-3</sup>, (5 : 3) mmol dm<sup>-3</sup>, (3,33 : 2,67) mmol dm<sup>-3</sup> e (6 : 2) mmol dm<sup>-3</sup>, respetivamente. Para a determinação da constante de associação prepararam-se as soluções-mãe de  $\beta$ -CD e Gly-L-Phe com concentrações 10 mmol dm<sup>-3</sup> e 5 mmol dm<sup>-3</sup>, respetivamente. A partir das soluções-mãe prepararam-se oito soluções diferentes de Gly-L-Phe a variar de (0,5 a 5) mmol dm<sup>-3</sup>.

Relativamente ao sistema Gly-L-Phe : SDS, procedeu-se de modo análogo. Assim, determinou-se a estequiometria do complexo Gly-L-Phe : SDS, determinada pelo mesmo método referido anteriormente, abaixo e acima da CMC do SDS, preparando-se soluções de Job com concentrações totais de [Gly-L-Phe] + [SDS] 7,0 mmol dm<sup>-3</sup> e 40,0 mmol dm<sup>-3</sup>, respetivamente.

Para a determinação da constante de associação, prepararam-se duas soluções-mãe de Gly-L-Phe e SDS com concentrações 200 mmol dm<sup>-3</sup> e 100 mmol dm<sup>-3</sup>, respetivamente. A partir da solução-mãe da Gly-L-Phe, prepararam-se sete soluções diferentes, variando a concentração de Gly-L-Phe entre 0 e 100 mmol dm<sup>-3</sup> e, a partir da solução-mãe do SDS, prepararam-se sete soluções de igual concentração, 20 mmol dm<sup>-3</sup>.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>23</sup>Na (500,13 e 132,29 MHz, respetivamente) foram obtidos num espectrómetro *Bruker Avance III HD NMR*. Obtiveram-se, também, os espectros unidimensionais de sódio (<sup>23</sup>Na) e espectros bidimensionais de RMN de NOESY. O sinal do *tert*-butanol e o sinal do espectro de <sup>23</sup>Na para uma solução de 0,1 mol dm<sup>-3</sup> em D<sub>2</sub>O foram usados como referência interna ( $\delta = 1,3$ ) e referência externa em relação ao TMS, respetivamente.

Para os espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram preparadas soluções H<sub>2</sub>O ou D<sub>2</sub>O, com um desvio relativamente ao TMS de 31,2 ppm.

### 2.2.3 Espectroscopia de fluorescência

Para o sistema Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD, foram preparadas duas soluções-mãe, uma de  $\beta$ -CD e outra de Gly-L-Phe, com  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  e  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , respetivamente. A partir das soluções-mãe prepararam-se oito soluções diferentes, variando a concentração de  $\beta$ -CD entre  $0,01$  e  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  e mantendo constante a concentração de Gly-L-Phe, igual a  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Estas soluções foram preparadas com água ultra-pura do Tipo I.

O mesmo se sucedeu para o sistema Gly-L-Phe : SDS, onde se prepararam duas soluções-mãe, uma de SDS e uma de Gly-L-Phe, com concentração igual a  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  e  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , respetivamente. Procedeu-se, de igual forma, à titulação onde se manteve a concentração de Gly-L-Phe constante e igual a  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , variando-se a concentração de SDS, entre  $0,01$  e  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

As medidas de absorção e de fluorescência no estado estacionário foram realizadas em espectrómetros *Cary* mod. 5000 UV-Vis-NIR e *Horiba-Jobin-Yvon* mod. Fluoromax 4, respetivamente.

### 2.2.4 Estudos computacionais

As estruturas iniciais de Gly-L-Phe e  $\beta$ -CD foram obtidas no *Cambridge Crystallographic Data Center*, CCDC [39]. As estruturas foram otimizadas ao nível da teoria dos funcionais da densidade (*Density Functional Theory*, DFT) com o funcional B3LYP [40-42] (funcional de troca de três parâmetros de Becke [40] combinado com o funcional de correlação de Lee, Yang e Parr [41]). A base utilizada para os cálculos foi 3-21G(d). Foram realizados dois modelos iniciais do complexo de inclusão Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD. Estes modelos foram concebidos colocando a molécula *guest* no centro da cavidade de  $\beta$ -CD, orientada pela perpendicular ao plano definido pelos átomos de oxigénio das ligações glicosídicas. No modelo 1, o grupo fenil da molécula *guest* está direcionado para os grupos hidroxilo primários da  $\beta$ -CD. No modelo 2, o grupo fenil da molécula *guest* está direcionado para os grupos hidroxilo secundários da  $\beta$ -CD. Ambos os modelos foram otimizados pela teoria DFT B3LYP/3-21G(d) [20].

Para ser possível simular computacionalmente o efeito do solvente na geometria da molécula, utilizaram-se os modelos de meio contínuo polarizável (PCM) com a (*Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model*, IEFPCM) [43, 44, 20].

O cálculo das frequências de vibração do oscilador harmónico foi feito, de igual modo, para todas as geometrias otimizadas, com o objetivo de confirmar se os pontos estacionários à superfície da energia potencial são mínimos verdadeiros. Todos os cálculos foram realizados com o programa GAUSSIAN 16 [45, 20].

# Capítulo III

---

---

## Resultados e Discussão

---

---

# SISTEMA GLICIL-L-FENILALANINA + $\beta$ -CICLODEXTRINA

## 3.1 Método de dispersão de Taylor

A difusão é um processo irreversível e espontâneo de transporte de partículas através de um meio, podendo ocorrer em qualquer estado da matéria [46]. A existência de um gradiente de concentração no interior de uma solução livre de correntes de convecção provoca um fluxo de matéria que tende a anular esse mesmo gradiente, isto é, tende a restaurar o equilíbrio. Pode dizer-se que a força responsável pelo fenómeno da difusão é o gradiente de potencial químico da substância difundente que, sendo quantificado em soluções ideais pelo gradiente de concentração a temperatura constante, não o é para soluções reais. Desta forma, indicam-se duas aproximações para descrever a difusão isotérmica: a termodinâmica aplicada a processos irreversíveis e as leis de Fick. Neste trabalho foi estudada a difusão mútua, também conhecida por interdifusão, que é amplamente estudada para fornecer informações fundamentais sobre o transporte de iões e moléculas em solução [47].

A medida quantitativa do processo de difusão num sistema binário é expressa pelo coeficiente de difusão que, de acordo com a primeira lei de Fick [48], é identificado como a constante de proporcionalidade na relação linear entre o fluxo de matéria e o gradiente de concentração.

O tratamento matemático da difusão foi realizado, primeiramente, por Fick. O seu modelo descreve a difusão de soluções de eletrólitos e não eletrólitos, na ausência de campos elétricos e de convecção [48]. São suas as equações que descrevem a primeira e a segunda leis de Fick (Equações 3.1 e 3.2).

$$J = -D \text{ grad } c \quad (3.1)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \text{div } (D \text{ grad } c) \quad (3.2)$$

sendo  $J$  a velocidade de transferência da substância difundente por unidade de volume,  $c$  a concentração genérica da mesma substância,  $t$  o tempo e  $D$  o coeficiente de difusão [46].

Os sistemas multicomponentes (ternários, quaternários, quinários) podem ser estudados por abordagens experimentais laboriosas, e o número de coeficientes de difusão,  $D_{ik}$ , aumenta com a complexidade do sistema [49].

O método de dispersão de Taylor foi utilizado para estimar os coeficientes de difusão de soluções aquosas dos sistemas ternários glicil-L-fenilalanina (Gly-L-Phe) +  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) + H<sub>2</sub>O e os respectivos coeficientes de difusão binários de cada componente em fluxo de água, a 298,15K.

### 3.1.1 Difusão em sistemas binários: medição e sua interpretação

O modelo de Fick pode ser descrito para sistemas binários, isto é, sistemas com dois componentes – solvente e soluto – resultando deste tratamento um coeficiente de difusão binário,  $D$ , que descreve o transporte nas condições enunciadas [47].

Os resultados que foram obtidos para os coeficientes de difusão binária,  $D$ , da Gly-L-Phe em soluções aquosas a concentração infinitesimal e a concentrações finitas encontram-se representados na Tabela 3.1.

A curva de ajuste dos dados experimentais é descrita pela Equação 3.3, compatível com o facto de ser uma solução de não-eletrólito muito diluída. O valor limite do coeficiente de difusão a concentração infinitesimal,  $D^0$ , fica estabelecido a  $7,66 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

$$D / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}) = 0,766 - 1,126c \quad R^2 = 0,993 \quad (3.3)$$

Da análise da Tabela 3.1 podemos dizer que a imprecisão das medidas é inferior a 1%. Para além disso, pode observar-se que a variação dos coeficientes de difusão para o intervalo de concentração estudada,  $0,0010 \leq c \leq 0,010 \text{ mol dm}^{-3}$ , é muito pequena (cerca de 1,3% para todo o intervalo de concentração), sugerindo que não ocorrem interações dipeptídeo-dipeptídeo.

**Tabela 3.1** – Valores médios de coeficientes de difusão,  $D$ , de glicil-L-fenilalanina em soluções aquosas e a diferentes concentrações,  $c$ , e respectivos desvios-padrão experimentais dos valores médios de coeficiente de difusão,  $S_D$ , a 298,15 K.

Concentração da solução de fluxo, $c / (\text{mol dm}^{-3})$	$(D \pm S_D) / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$C_V^b / \%$
0,0000	0,766 <sup>a</sup>	-
0,0010	$0,765 \pm 0,003$	0,39
0,0025	$0,763 \pm 0,004$	0,52
0,0050	$0,760 \pm 0,003$	0,39
0,0075	$0,757 \pm 0,002$	0,26
0,0100	$0,755 \pm 0,004$	0,53

<sup>a</sup> Estimativa do coeficiente de difusão a concentração infinitesimal obtido da equação de ajuste (3.3) aos dados experimentais,  $D$ .

<sup>b</sup>  $C_V$  representa o coeficiente de variação da média dos resultados experimentais, usualmente denominado como imprecisão.

Comparando o  $D_0$  deste dipeptídeo com o dos seus aminoácidos constituintes, é possível concluir que os coeficientes de difusão experimentais a concentração infinitesimal para a Gly-L-Phe são inferiores aos obtidos nas mesmas condições para a glicina ( $D^0 = 1,06 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  [50]). No entanto, é necessário salientar o facto de que o coeficiente de difusão a concentração infinitesimal da fenilalanina é da mesma ordem do obtido por Umecky et al. ( $D^0 = 6,81 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  [51]).

Uma possível explicação para o elevado valor do coeficiente de difusão a concentração infinitesimal obtido para a Gly-L-Phe, em comparação com o da fenilalanina, pode ser atribuído à diminuição do raio de hidratação, como consequência da diminuição do efeito eletroestritivo dos seus grupos carregados. As entidades da Gly-L-Phe oferecerão uma menor resistência ao atrito do movimento através do líquido e, conseqüentemente, o coeficiente de difusão desse sistema aquoso tornar-se-á mais alto.

Os coeficientes de difusão mútua binária,  $D$ , da  $\beta$ -CD em soluções aquosas a concentração infinitesimal e a concentrações finitas, encontram-se representados na Tabela 3.2. Estes dados, já publicados, foram obtidos através da mesma técnica e pelo mesmo grupo de investigação [52]. Contudo, foram efetuados três ensaios visando testar a reprodutibilidade dos resultados. Isto é, repetiram-se medidas para soluções de concentração da solução de fluxo de  $\beta$ -CD com a concentração de  $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ , obtendo-se um  $D_{\text{médio}} = (0,323 \pm 0,003) \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . O desvio entre o coeficiente de

difusão obtido na repetição e aquele que é indicado na bibliografia é inferior a 1%. Este é um valor que certifica uma boa condição de operacionalidade.

**Tabela 3.2** – Valores médios de coeficientes de difusão,  $D$ , de  $\beta$ -CD em soluções aquosas a diferentes concentrações,  $c$ , e respectivos desvios-padrão experimentais dos valores médios de coeficiente de difusão,  $S_D$ , a 298,15 K.

Concentração da solução de fluxo, $c_1 / (\text{mol dm}^{-3})$	$(D \pm S_D) / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$C_V^a / \%$
0,002	$0,324 \pm 0,003$	0,93
0,004	$0,323 \pm 0,001$	0,31
0,006	$0,321 \pm 0,003$	0,93
0,008	$0,318 \pm 0,002$	0,63

<sup>a</sup>  $C_V$  representa o coeficiente de variação da média dos resultados experimentais, usualmente denominado como imprecisão.

### 3.1.2 Difusão em sistemas ternários: medição e sua interpretação

No caso de sistemas ternários – solvente, soluto 1 e soluto 2 – são necessários quatro coeficientes de difusão para descrever o sistema,  $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{21}$  e  $D_{22}$  (Equações 3.4 e 3.5). Os coeficientes de difusão principais (*main diffusion coefficients*),  $D_{11}$  e  $D_{22}$ , medem os fluxos dos solutos 1 e 2 produzidos pelo seu próprio gradiente de concentração, respetivamente, enquanto os coeficientes de difusão secundários (*cross term diffusion coefficients*),  $D_{12}$  e  $D_{21}$ , medem igualmente os fluxos dos solutos 1 e 2 mas produzidos pelo gradiente de concentração do outro componente, respetivamente.  $J_1$  e  $J_2$  representam os fluxos dos solutos 1 e 2 secundários [49].

$$-(J_1) = (D_{11})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{12})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (3.4)$$

$$-(J_2) = (D_{21})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{22})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (3.5)$$

O efeito da  $\beta$ -CD em soluções aquosas de Gly-L-Phe foi avaliado medindo os coeficientes de difusão ternários –  $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{21}$  e  $D_{22}$  – para o sistema Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD +  $H_2O$ . Estes coeficientes de difusão encontram-se representados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Coeficientes de difusão mútua ternários,  $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{21}$  e  $D_{22}$ , para soluções aquosas de Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD e respetivos desvios-padrão experimentais dos valores médios de coeficiente de difusão,  $S_D$ , a 298,15 K.<sup>a,b</sup>

$c_1$	$c_2$	$X_1$	$D_{11} \pm S_D$	$D_{12} \pm S_D$	$D_{21} \pm S_D$	$D_{22} \pm S_D$
0,0000	0,0100	0,00	$0,589 \pm 0,001$	$-0,045 \pm 0,015$	$0,036 \pm 0,001$	$0,460 \pm 0,002$
0,0250	0,0075	0,25	$0,680 \pm 0,009$	$-0,136 \pm 0,027$	$0,002 \pm 0,003$	$0,499 \pm 0,004$
0,0050	0,0050	0,50	$0,678 \pm 0,011$	$-0,180 \pm 0,017$	$0,012 \pm 0,006$	$0,543 \pm 0,007$
0,0075	0,0025	0,75	$0,736 \pm 0,024$	$-0,156 \pm 0,020$	$0,004 \pm 0,009$	$0,540 \pm 0,004$
0,0100	0,0000	1,00	$0,745 \pm 0,008$	$-0,122 \pm 0,039$	$0,013 \pm 0,004$	$0,530 \pm 0,016$

<sup>a</sup>  $c_1$  e  $c_2$  em unidade  $\text{mol dm}^{-3}$ ; <sup>b</sup>  $D_{ik} \pm S_D$  em unidade  $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

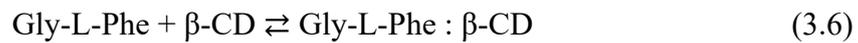
Através da análise dos resultados, é possível inferir que os valores obtidos para  $D_{22}$  são menores do que os valores de  $D_{11}$ . É, também, possível concluir que o  $D_{11}$  aumenta com o aumento da fração de soluto de Gly-L-Phe, definida por  $X_1 = c_1 / (c_1 + c_2)$ . No caso do  $D_{22}$ , este diminui com o aumento da fração de soluto de Gly-L-Phe.

Os coeficientes secundários,  $D_{12}$ , são negativos, o que indica contra-corrente dos fluxos acoplados. Contudo, quando  $X_1 \rightarrow 0$ ,  $D_{12}$  é igual a zero, pois o gradiente de concentração de  $\beta$ -CD não pode direccionar os fluxos acoplados de Gly-L-Phe em soluções que não contêm Gly-L-Phe. Como a  $\beta$ -CD forma complexos com Gly-L-Phe e, portanto, atua como transportador para o peptídeo, é expectável que a  $\beta$ -CD difunda para co-transportar a Gly-L-Phe. Na realidade, o  $D_{12}$  é negativo para Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD, o que indica que a  $\beta$ -CD contra-transporta a Gly-L-Phe. Relativamente à análise dos valores de  $D_{21}$ , estes alteram-se com  $X_1$  de forma aleatória, com valores a rondar o zero. É de realçar que as diferenças observadas estão próximas das incertezas das medidas. De facto, a reprodutibilidade dos coeficientes principais e secundários de difusão é igual a  $\pm(0,02 \times 10^{-9})$  e  $\pm(0,04 \times 10^{-9}) \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , respetivamente.

Através de  $D_{12}/D_{22}$  estima-se o número de moles de Gly-L-Phe contra-transportadas por mole de  $\beta$ -CD. As medições dos coeficientes de difusão mostram

que uma mole de  $\beta$ -CD contra-transporta 0,3 mol de Gly-L-Phe. Os valores de  $D_{21}/D_{11}$  indicam que uma mole de Gly-L-Phe co-transporta até 0,017 mol de  $\beta$ -CD.

Outra questão relevante relaciona-se com a possibilidade de existir um efeito das estruturas supramoleculares *host-guest* com base em  $\beta$ -CD e Gly-L-Phe. Supondo que a Gly-L-Phe interage com a  $\beta$ -CD formando um complexo 1 : 1, é expectável que tanto as CDs livres como as complexadas tenham mobilidades semelhantes e, conseqüentemente, coeficientes de difusão também semelhantes. Para um melhor entendimento do processo de difusão da Gly-L-Phe em soluções aquosas de  $\beta$ -CD (Tabela 3.3), os coeficientes de difusão mútua experimentais foram, inicialmente, comparados com os estimados pelo modelo desenvolvido por Paduano et al. (Equações 3.8 – 3.11), para sistemas que envolvem a formação de complexos de inclusão [36, 53-56]. Apesar de estas equações serem aplicadas apenas a soluções diluídas, são bastante úteis para uma compreensão qualitativa das principais características dos resultados obtidos, incluindo o mecanismo de difusão acoplada e a dependência dos coeficientes  $D_{ik}$ . Assim, analisando o seguinte equilíbrio:



a constante de equilíbrio correspondente,  $K$ , pode ser definida por

$$K = \frac{c_3^*}{c_1^* c_2^*} \quad (3.7)$$

onde  $c_i^*$  ( $i$  igual a 1,2 ou 3) são as concentrações de Gly-L-Phe,  $\beta$ -CD e (Gly-L-Phe) : ( $\beta$ -CD), respetivamente.

Conseqüentemente, a dependência dos coeficientes de difusão ( $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{22}$ ,  $D_{21}$ ) das concentrações dos diferentes componentes pode ser descrita pelas Equações (3.8) a (3.11).

$$D_{11} = D_3^* + (D_1^* - D_3^*) \left( \frac{\partial c_1^*}{\partial c_1} \right) \quad (3.8)$$

$$D_{12} = (D_1^* - D_3^*) \left( \frac{\partial c_1^*}{\partial c_2} \right) \quad (3.9)$$

$$D_{21} = (D_2^* - D_3^*) \left( \frac{\partial c_2^*}{\partial c_1} \right) \quad (3.10)$$

$$D_{22} = D_3^* + (D_2^* - D_3^*) \left( \frac{\partial c_2^*}{\partial c_2} \right) \quad (3.11)$$

onde  $c_i$  são as concentrações estequiométricas e  $D_i^*$ , com  $i = 1, 2, 3$ , é a difusividade das espécies  $i$  efetivamente presentes na solução (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4** – Coeficientes de difusão limitante para as diferentes espécies,  $i$ , no sistema ternário.

	$D_i / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
Gly-L-Phe	0,745 <sup>a</sup>
$\beta$ -CD	0,460 <sup>a</sup>
Gly-L-Phe : $\beta$ -CD	0,428 <sup>b</sup>

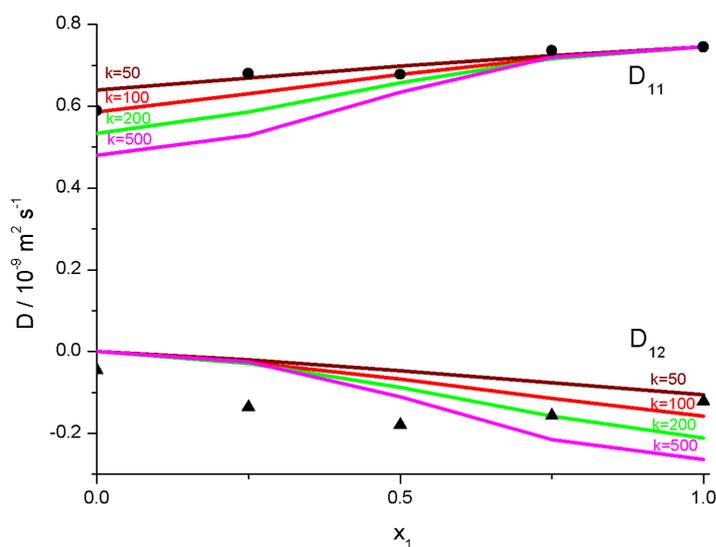
<sup>a</sup> Estes valores são as estimativas dos coeficientes de difusão da Gly-L-Phe e da  $\beta$ -CD livres, respetivamente, obtidas de  $D_{11}$  para  $X_1 = 1$  e  $D_{22}$  para  $X_1 = 0$ .

<sup>b</sup> Este valor representa a estimativa do coeficiente de difusão do complexo (Gly-L-Phe) : ( $\beta$ -CD), calculado através da equação  $D [(Gly-Phe) : (\beta-CD)] = (D (Gly-Phe)^{-3} + D (\beta-CD)^{-3})^{-1/3} = 0,428 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

Usando como estimativa os valores dos coeficientes de difusão da Gly-L-Phe e da  $\beta$ -CD livres:  $D$  (Gly-L-Phe) =  $0,745 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (isto é, de  $D_{11}$  para  $X_1 = 1$ ) e  $D$  ( $\beta$ -CD) =  $0,460 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (isto é, de  $D_{22}$  para  $X_1 = 0$ ), o coeficiente de difusão do complexo (Gly-L-Phe) : ( $\beta$ -CD) é estimado pela Equação (3.12) (isto é,  $D = 0,428 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Tabela 3.4) [57].

$$D [(Gly-L-Phe) - (\beta-CD)] = [D (Gly-L-Phe)^{-3} + D (\beta-CD)^{-3}]^{-1/3} \quad (3.12)$$

A partir dos dados calculados pela Equação 3.12 e das Equações (3.6 – 3.11) é possível estimar os valores de  $D_{ik}$  [36, 53-56]. A Figura 3.1 expõe um gráfico representativo dos valores previstos para  $D_{11}$  e  $D_{12}$ , quando comparados com os valores experimentais, para diferentes constantes de equilíbrio ( $K_{\text{complexo}} = 50, 100, 200$  e  $500 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ). Em anexo, encontra-se a Figura A.1 para os valores previstos de  $D_{22}$  e  $D_{21}$ .



**Figura 3.1** – Coeficientes de difusão mútuos ternários do sistema Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD vs. a fração de soluto de Gly-L-Phe,  $X_1$ , a 298,15 K. Os valores de  $D_{ij}$  foram previstos pelas Equações (3.8 e 3.9) para os diferentes valores de  $K$  (Equação 3.7). Valores medidos: ● ( $D_{11}$ ); ▲ ( $D_{12}$ ).

A partir da análise da Figura 3.1, é razoável concluir que o modelo aplicado se aproxima dos dados experimentais para coeficientes de difusão,  $D$ , com uma constante de equilíbrio entre 50 – 100 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup>. Assumindo esses valores, o desvio entre os dados experimentais e teóricos é menor que 7 %. Estes valores sugerem que a interação entre Gly-L-Phe e  $\beta$ -CD é fraca de acordo com os valores obtidos para outros hóspedes semelhantes [23, 54, 55]. Também é necessário salientar que os valores de  $D_{12}$ , que foram estimados para as diferentes constantes de equilíbrio,  $K$ , apresentam valores negativos, aumentando, em valor absoluto, com o aumento de  $X_1$ . Este fenômeno indica, portanto, que o gradiente de concentração de  $\beta$ -CD produz fluxos acoplados de contra-corrente de Gly-L-Phe, contribuindo para a formação de complexos 1 : 1.

A fração total de Gly-L-Phe ligado à  $\beta$ -CD, nas composições em estudo, pode ser estimada pela Equação (3.13) (Tabela 3.5).

$$D_{11} = (1 - X_3) D_1 + X_3 D_3 \quad (3.13)$$

**Tabela 3.5** – Estimativa de  $X_3$  para diferentes valores de  $X_1$ .<sup>a</sup>

$c_1$	$c_2$	$X_1$	$X_3$
0,0000	0,0100	0,000	0,492
0,0025	0,0075	0,250	0,205
0,0050	0,0050	0,500	0,211
0,0075	0,0025	0,750	0,028
0,0100	0,0000	1,000	0,000

<sup>a</sup>  $X_1$  e  $X_3$  representam a fração de soluto de Gly-L-Phe e a fração total da ligação de Gly-L-Phe com  $\beta$ -CD, respetivamente.

$D_{11}$ ,  $X_3$ ,  $D_1$ ,  $D_3$  representam o coeficiente de difusão principal da Gly-L-Phe, a fração total de Gly-L-Phe na presença de  $\beta$ -CD, e os valores dos coeficientes de difusão da Gly-L-Phe e do complexo (Gly-Phe :  $\beta$ -CD), respetivamente.

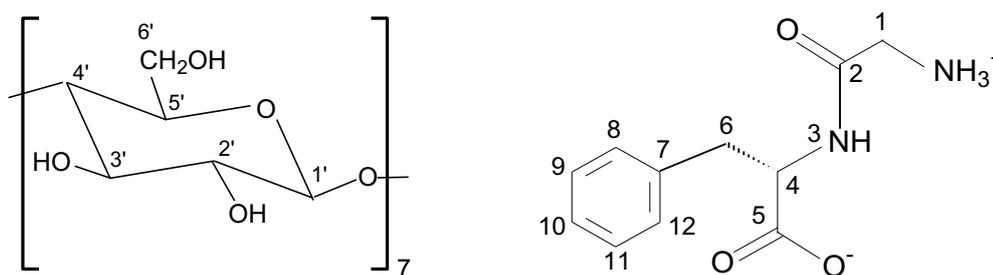
Pela Tabela 3.5 é possível concluir que, para 10 mM de  $\beta$ -CD, e assumindo um coeficiente de difusão limitante (*tracer*) para Gly-L-Phe igual a  $5,89 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , é obtido um  $X_3 = 0,492$ . Isto significa que cerca de metade do coeficiente de difusão limitante da Gly-L-Phe está ligado à  $\beta$ -CD. Assim sendo, as moléculas de Gly-L-Phe vão ter uma mobilidade reduzida e, portanto, essa pode ser uma das causas da diminuição, relativamente elevada, de  $D_{11}$ . Contudo, aumentando a concentração até atingir a concentração coeficiente de difusão vestigial da  $\beta$ -CD (*i.e.*,  $X_1 = 1$ ), é possível ver que a fração total da ligação de Gly-L-Phe com a  $\beta$ -CD diminui até zero. Neste caso limite, é possível concluir que a Gly-L-Phe é livre em solução e, conseqüentemente, os valores de  $D_{11}$  são quase iguais (com diferenças  $< 1\%$ ) aos coeficientes de difusão binária do Gly-L-Phe aquoso (Tabela 3.1).

## 3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

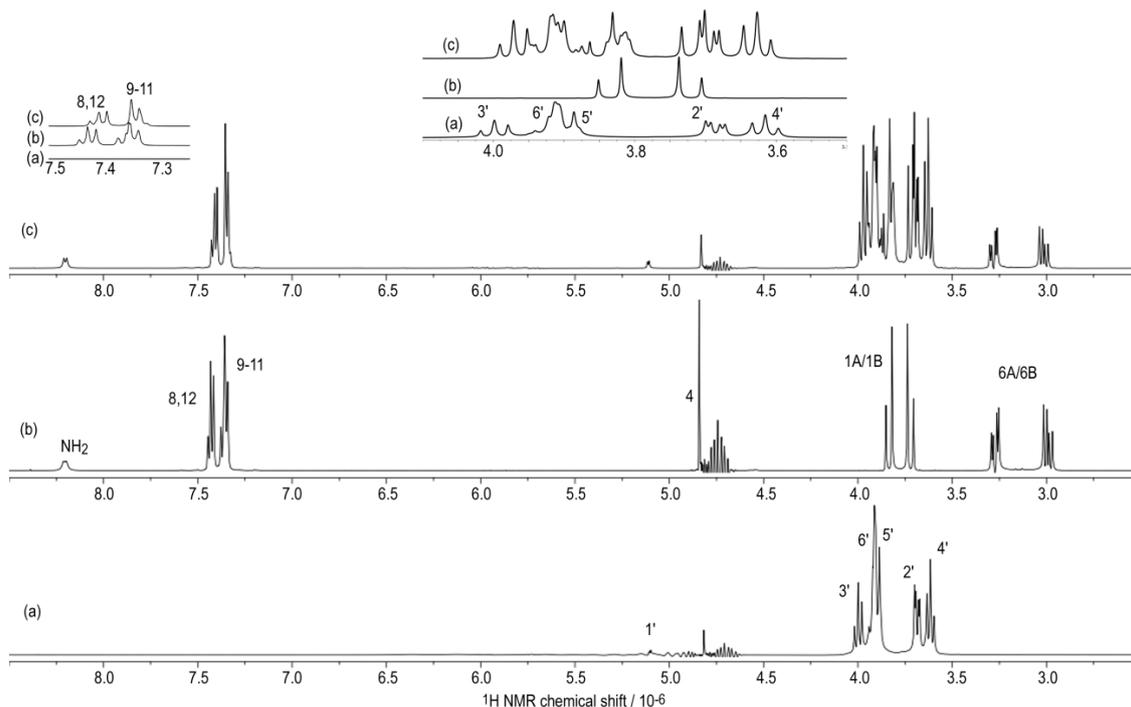
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais poderosas na investigação da estabilidade e estequiometria dos complexos. Permite investigar sistemas de inclusão (*host-guest*), fornecendo uma observação direta e detalhada dos núcleos relevantes para a estrutura e dinâmica dos sistemas. Para este sistema, foi utilizada a espectroscopia de RMN uni- e bidimensional de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para aprofundar as interações intermoleculares na formação do complexo de inclusão do peptídeo Gly-L-Phe com  $\beta$ -CD. Foi, também, obtida a respetiva estequiometria e constante de associação para o complexo de inclusão formado – Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD – utilizando o método de variação contínua (método de Job).

### 3.2.1 Espectros RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

O esquema 3.1 mostra as representações esquemáticas e a numeração das moléculas  $\beta$ -CD e Gly-L-Phe, enquanto a Figura 3.2 apresenta o espectro RMN de  $^1\text{H}$  de soluções de  $\beta$ -CD, Gly-L-Phe e da mistura dos dois componentes, respetivamente. Os parâmetros espectrais completos de RMN de  $^1\text{H}$  encontram-se nas Tabelas 3.6 e 3.7.



**Esquema 3.1** – Representação esquemática e numeração de  $\beta$ -CD e Gly-L-Phe, respetivamente.



**Figura 3.2** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  (a)  $\beta\text{-CD}$   $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,5$  [35]; (b)  $\text{Gly-L-Phe}$   $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,2$ ; (c)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  ( $10 : 10$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ , a  $298,15 \text{ K}$ .

**Tabela 3.6** – Parâmetros<sup>a</sup> de RMN de  $^1\text{H}$  para  $\beta\text{-CD}$  na ausência e na presença de  $\text{Gly-L-Phe}$ , a  $298 \text{ K}$ .

	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$
$\beta\text{-CD}^b$ ( $\text{pH}^* = 6,7$ )	5,11	3,69	4,00	3,62	3,89	3,91	3,6	9,6	9,2	9,2	- <sup>d</sup>
$\beta\text{-CD/Gly-L-Phe}$ $10:10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ( $\text{pH}^* = 6,3$ )	5,11	3,70	3,97	3,63	3,86	3,91 3,81	3,5	9,6	9,6	9,4	- <sup>d</sup>

<sup>a</sup>  $\delta$ , em ppm, relativo a  $\text{Me}_4\text{Si}$ , usando o *tert*-butanol ( $\delta_{\text{H}} = 1,3$ ) como referência interna; valores de  $J$  em Hz.

<sup>b</sup>  $\beta\text{-CD}$   $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

<sup>c</sup>  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  ( $10 : 10$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ .

<sup>d</sup> não observado.

**Tabela 3.7** – Parâmetros<sup>a</sup> de RMN de <sup>1</sup>H para Gly-L-Phe na ausência e na presença de β-CD, a 298 K.

	H-1a/1b	H-4	H-6a/6b	H-8/12	H-9/10/11	J <sub>1a/1b</sub>	J <sub>6a/6b</sub>	J <sub>4,6a</sub> /	J <sub>4,6b</sub>
Gly-L-Phe <sup>b</sup> (pH*=6,3)	3,73/ 3,84	4,84	3,27/ 3,00	7,43	7,36	16,1	14,3	9,1/	4,9
Gly-L-Phe/β-CD <sup>c</sup> 10:10 mmol.dm <sup>-3</sup> (pH*=6,3)	3,72/ 3,85	4,83	3,28 /3,02	7,41	7,35	16,1	14,3	9,0/	5,0

<sup>a</sup> δ, em ppm, relativo a Me<sub>4</sub>Si, usando o *tert*-butanol (δ<sub>H</sub> = 1,3) como referência interna; valores de *J* em Hz.

<sup>b</sup> Gly-L-Phe 10 mmol dm<sup>-3</sup>.

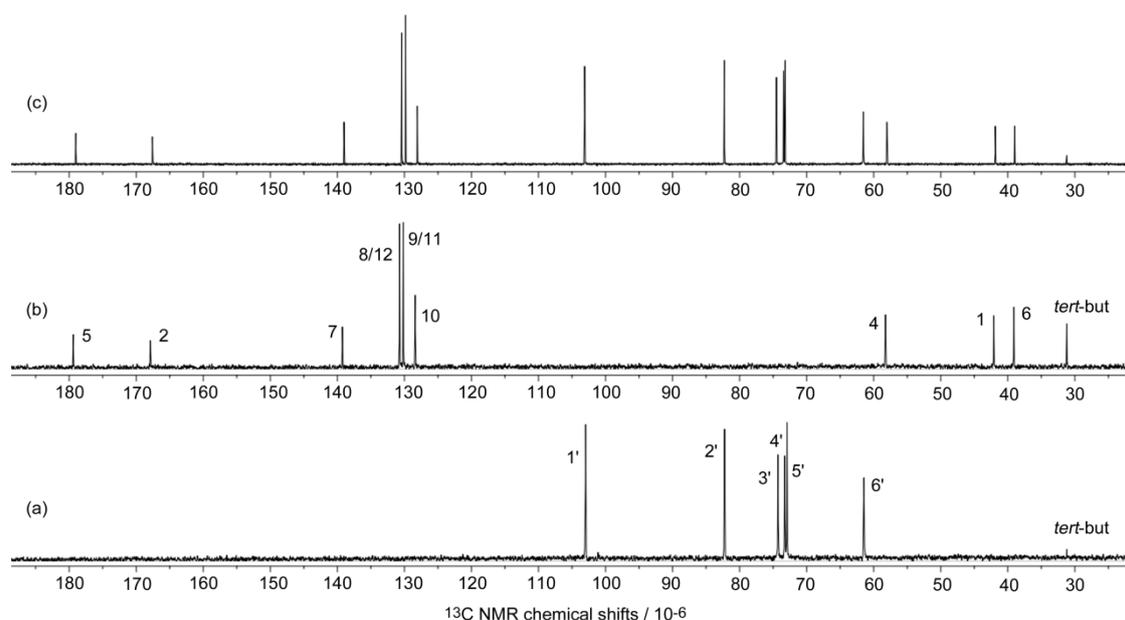
<sup>c</sup> β-CD / Gly-L-Phe (10 : 10) mmol dm<sup>-3</sup>.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de β-CD na presença do dipeptídeo, numa razão molar 1 : 1 (10 mmol dm<sup>-3</sup> : 10 mmol dm<sup>-3</sup>), pH\* = 6,5, mostra desvios significativos para os sinais correspondentes aos prótons H-3' e H-5', para frequências mais baixas, detetando-se também um novo sinal para os prótons H-6'. Os sinais correspondentes aos outros prótons mostram variações pouco significativas quer para os deslocamentos químicos, quer para as larguras de linha. Estas observações sugerem a interação entre as duas espécies. É de esperar que não se observem alterações conformacionais nas moléculas de β-CD na presença de Gly-L-Phe, dado que se observam apenas pequenas variações das constantes de acoplamento. À exceção do sinal correspondente aos prótons H-6', a observação de um único sinal para os prótons de H-1' a H-5', para ambas as espécies livres e ligadas, confirma as pequenas alterações conformacionais das mesmas posições da ciclodextrina ao estabelecer a ligação com Gly-L-Phe, existindo uma dinâmica de troca rápida, na escala de tempo de RMN, entre as espécies livres e ligadas. Para o sinal H-6', a observação de um novo sinal pode indicar, especificamente para esta posição, uma dinâmica de troca lenta, na escala de tempo do RMN, para o complexo (Gly-L-Phe : β-CD), sugerindo uma maior rigidez nessa região.

Também são observadas alterações nos sinais RMN de <sup>1</sup>H do grupo fenil da Gly-L-Phe na presença da β-CD. Apesar de apresentar apenas ligeiros desvios para frequências mais baixas, observa-se também um estreitamento do perfil dos sinais, particularmente para os sinais correspondentes aos prótons H-9, H-10 e H-11. Os sinais para os restantes prótons não apresentam desvios, nem alterações das constantes de acoplamento.

Os deslocamentos observados para os sinais correspondentes a H-3' e H-5' dentro da cavidade da  $\beta$ -CD, juntamente com as alterações correspondentes aos prótons do grupo fenil de Gly-L-Phe nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , presentes nos espectros da mistura, dão consistência à hipótese da formação de um complexo de inclusão entre os compostos e, por analogia com estudos anteriores, apontam para a inclusão de uma parte do grupo fenil na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD [23, 55].

A Figura 3.3 apresenta o espectro RMN de  $^{13}\text{C}$ , para as três soluções, a 298 K, utilizando como referência o *tert*-butanol (31,2 ppm).

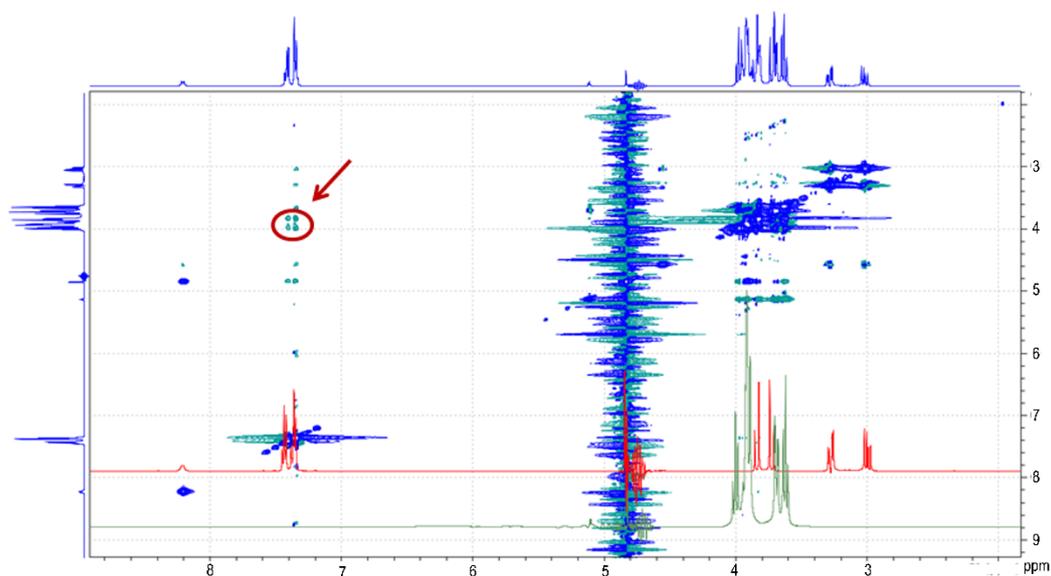


**Figura 3.3** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das soluções em  $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$  de (a)  $\beta$ -CD 10  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^*$  6,5; (b) Gly-L-Phe 10  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^*$  6,2; (c)  $\beta$ -CD / Gly-L-Phe (10 : 10)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^*$  6,3, a 298,15 K.

Contrariamente aos espectros de  $^1\text{H}$ , não se observam alterações significativas nos espectros de  $^{13}\text{C}$ , algo que se deve ao facto da população eletrónica que se atribui à orbital  $1s$  de um átomo de hidrogénio depender da polaridade da ligação  $\text{H} - \text{X}$ , em que o átomo de hidrogénio participa. As variações no termo diamagnético,  $\sigma_d$ , integram uma contribuição principal para os desvios químicos dos prótons. O mesmo não acontece, normalmente, com núcleos  $^{13}\text{C}$ , sendo o termo paramagnético o fator determinante [58].

### 3.2.2 Espectro 2D-RMN de NOESY

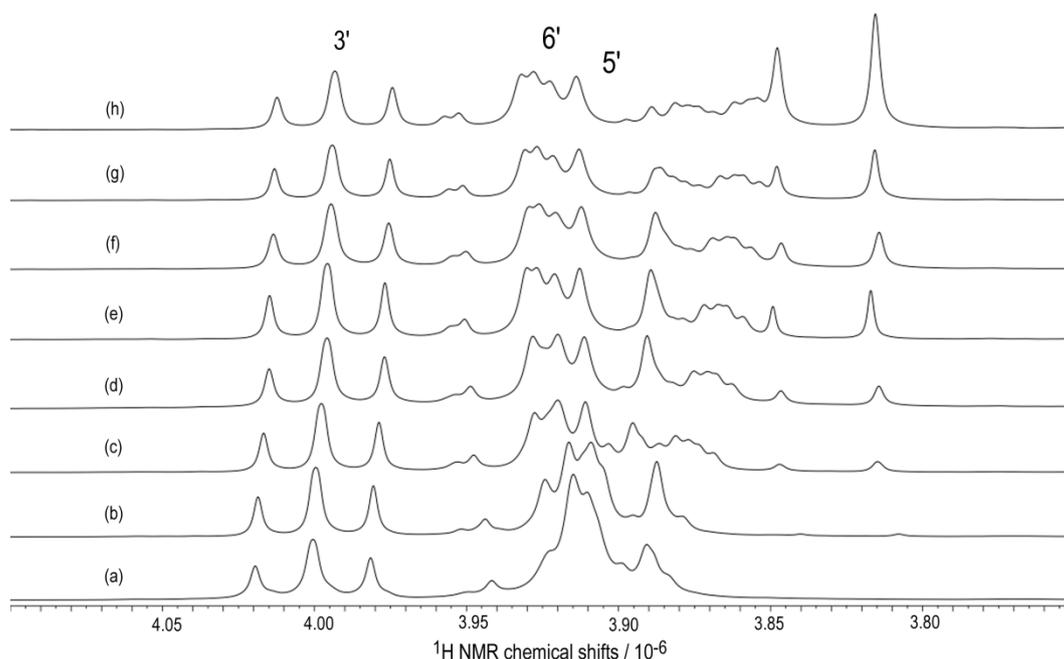
Adicionalmente, foi realizado um espectro bidimensional NOESY representado na Figura 3.4. onde foram detetados os sinais cruzados (conforme destacado pela seta), devidos a efeitos *overhauser* nucleares. A partir deste, é possível estabelecer as conectividades no espaço (acoplamento dipolar), sugerindo para este sistema que, com a inclusão, a distância entre os prótons H-3' e H-5' das moléculas de  $\beta$ -CD e os prótons do grupo fenil H-9, H-10 e H-11 da molécula de Gly-L-Phe é inferior a 5 Å [56].



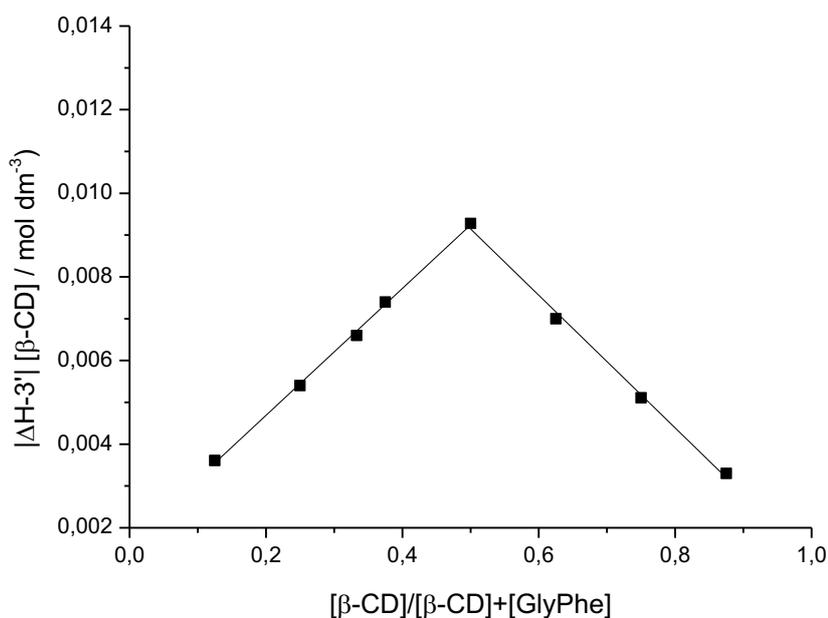
**Figura 3.4** – Espectro de 2D-RMN de NOESY da solução em H<sub>2</sub>O / D<sub>2</sub>O (30%) de  $\beta$ -CD : Gly-L-Phe (10 : 10) mmol dm<sup>-3</sup>, pH\* 6,2, a 298,15 K.

### 3.2.3 Gráfico de Job

A estequiometria do complexo Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD foi, também, determinada pelo método das variações contínuas (Método de Job) [36, 37, 38]. Este método envolve a preparação de várias soluções que contêm tanto Gly-L-Phe como  $\beta$ -CD em diferentes proporções, para uma ampla gama de proporções molares amostradas ( $0 < [\text{Gly-L-Phe}] / ([\text{Gly-L-Phe}] + [\beta\text{-CD}]) < 1$ ) e onde a concentração total ( $[\text{Gly-L-Phe}] + [\beta\text{-CD}]$ ) é mantida constante para cada solução. O parâmetro experimentalmente observado é o deslocamento químico do H-3' da  $\beta$ -CD, que é sensível à formação de complexos (Figura 3.5). O gráfico da variação de  $\Delta\delta (\text{H-3}') \times [\beta\text{-CD}]$  em função da fração molar de  $\beta$ -CD está representado na Figura 3.6. O gráfico apresenta um valor máximo de  $([\text{Gly-L-Phe}] + [\beta\text{-CD}])$  de 0,5 e uma forma altamente simétrica, o que demonstra a existência do complexo Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD com uma estequiometria de 1 : 1.



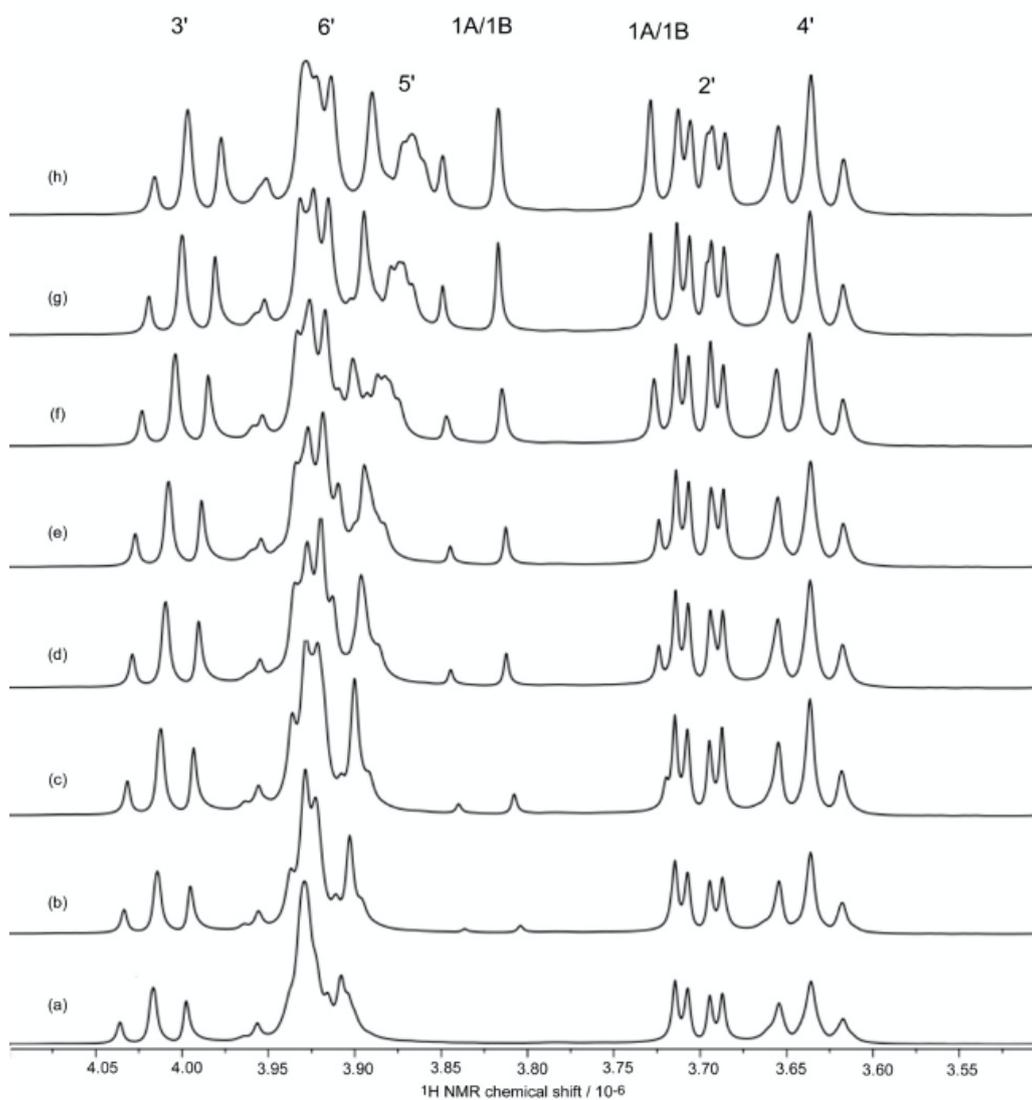
**Figura 3.5** – Expansão dos espectros RMN de  $^1\text{H}$  de 3,75 a 4,10 ppm das soluções Job em  $\text{D}_2\text{O}$ ; (a)  $\beta$ -CD  $8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,5$  [35]; (b) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (1 : 7)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (c) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (2 : 6)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (d) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (3 : 5)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (e) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (4 : 4)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (f) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (5 : 3)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (g) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (3,33 : 2,67)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (h) Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (6 : 2)  $\text{mmol dm}^{-3}$ , a 298,15 K.



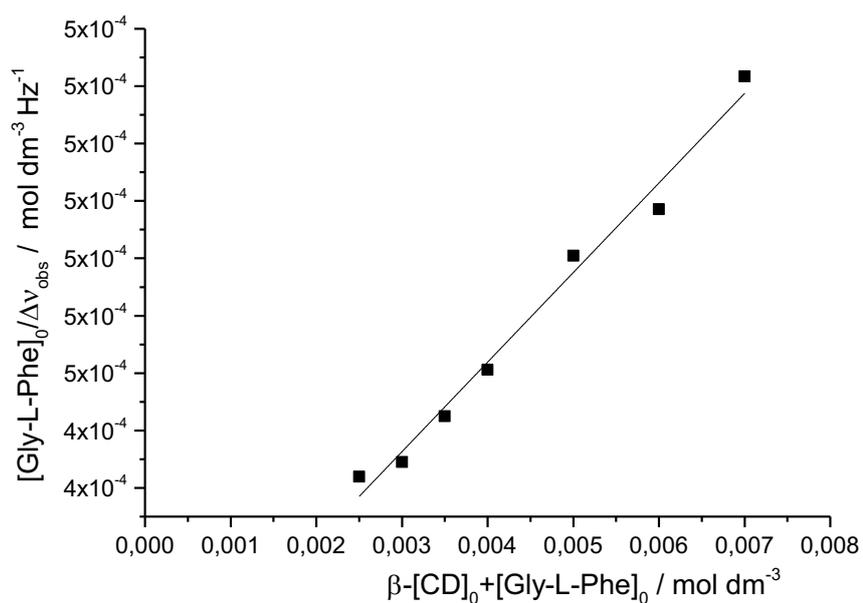
**Figura 3.6** – Gráfico de Job (Método das variações contínuas) do complexo de inclusão Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD, onde se verifica uma estequiometria 1 : 1, ( $\Delta\delta = \delta$  (complexo) -  $\delta$  (livre)).

Para obter informações relativas à extensão da interação, obtiveram-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de soluções  $2,0 \text{ mol dm}^{-3}$  em  $\beta$ -CD com concentrações de Gly-L-Phe a variar de  $(0,5 \text{ a } 5,0) \text{ mol dm}^{-3}$  (Figura 3.7). Através dos deslocamentos químicos, em Hz, do sinal correspondente ao próton H-3' da  $\beta$ -CD, é possível medir a diferença entre a frequência observada na mistura e na solução de  $\beta$ -CD livre,  $\Delta\nu = \nu - \nu^0$ .

Assim sendo, a constante de associação para o complexo (a pH de dissolução, pH = 6,3) foi estimada através do método de Sompornpisut et al. [54], utilizando a relação de  $[\text{Gly-L-Phe}]_0 / \Delta\nu_{\text{obs}}$  como função de  $[\beta\text{-CD}]_0 + [\text{GlyPhe}]_0$  (Figura 3.8). O valor estimado para a constante de associação foi de  $40 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Este valor pode ser comparado com os valores dos sistemas  $\beta$ -CD / L-fenilalanina [54],  $\beta$ -CD / DL-fenilalanina [59],  $\beta$ -CD / L-dopa [23] e  $\beta$ -CD / fluconazol [55], para o qual foram relatados os valores de 25,5; 131; 20 e  $68,7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , respetivamente.



**Figura 3.7** – Expansão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de (3,40 a 4,10) ppm das soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  de (a)  $\beta\text{-CD}$   $2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; (b)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 0,5)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (c)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 1)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (d)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 1,5)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (e)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 2)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (f)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 3)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (g)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 4)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (h)  $\beta\text{-CD} / \text{Gly-L-Phe}$  (2 : 5)  $\text{mmol dm}^{-3}$ .



**Figura 3.8** – Curva de ajuste linear dos dados experimentais de  $[\text{Gly-L-Phe}]_0 / \Delta\nu_{\text{obs}}$  dos prótons H-3 'da  $\beta\text{-CD}$  em função da concentração total.

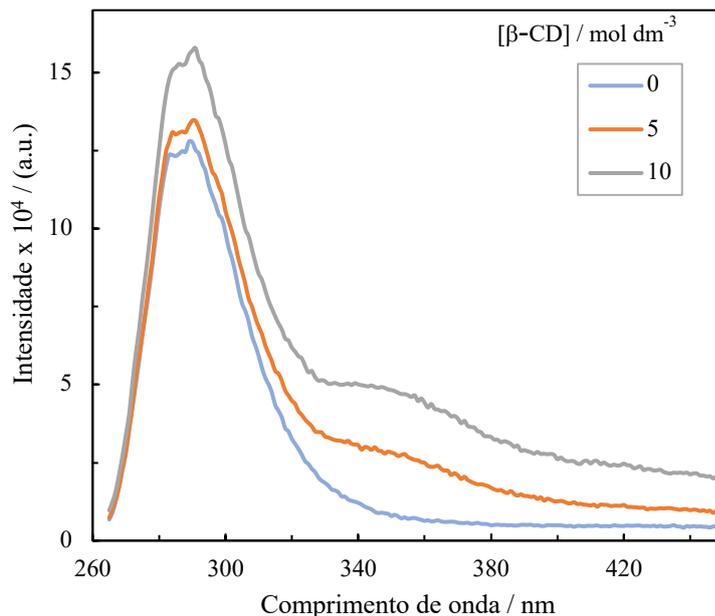
### 3.3 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é uma importante técnica que permite estudar o comportamento físico e químico de macromoléculas. Tem como principal vantagem, a sua alta sensibilidade. A quantidade de amostra necessária pode ser bastante reduzida pois as espécies fluorescentes podem ser detetadas quantitativamente [60].

De uma maneira simplificada, a fluorescência pode ser descrita pela libertação de um fóton a partir de um estado excitado da molécula. O estado excitado pode ser facilmente induzido por irradiação com luz de uma molécula no estado fundamental. Como o tempo de duração de uma molécula no estado excitado é muito curto, esta regressa ao estado fundamental libertando a energia de excitação como calor, fluorescência ou ambos [60].

A formação de um complexo de inclusão entre a Gly-L-Phe e a  $\beta$ -CD foi, também, ponderada através da técnica de espectroscopia de fluorescência. Na Figura 3.9 encontra-se representado o espectro de emissão de fluorescência para uma concentração de  $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  de Gly-L-Phe, obtido com excitação a 255 nm na presença e na ausência de  $\beta$ -CD. Na ausência de  $\beta$ -CD, pode verificar-se que apenas se observa o espectro de emissão típico da Gly-L-Phe com máximo de emissão a 290 nm. Ao adicionar a  $\beta$ -CD, verifica-se o aparecimento de uma nova banda de emissão para comprimentos de onda maiores e, também, um aumento da intensidade da fluorescência.

Como referido anteriormente, as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com uma ampla gama de moléculas incluídas (*guest*). Ao formar esses complexos, a molécula incluída fica protegida dos inibidores o que restringe a torção de certas moléculas, o que gera um aumento da intensidade da fluorescência [54] e a formação de uma nova banda deslocada para o vermelho (como se pode verificar na Figura 3.9).



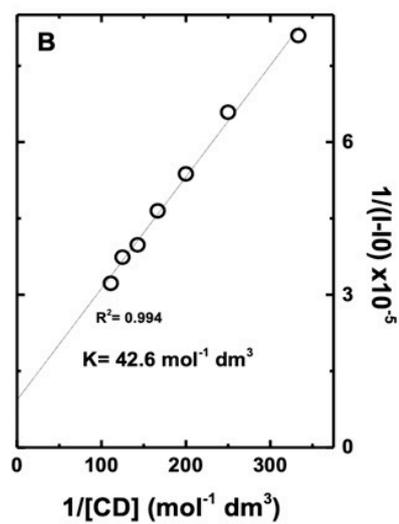
**Figura 3.9** – Espectro de emissão de fluorescência de Gly-L-Phe na presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -CD.

O aperfeiçoamento da intensidade da fluorescência para uma gama de emissão de 360 nm, medida em função da concentração de  $\beta$ -CD, foi utilizado para a obtenção da constante de associação,  $K$ , do complexo, utilizando a abordagem de Benesi-Hildebrand cujo cálculo é feito através da Equação 3.14 [61].

$$\frac{1}{I - I_0} = \frac{1}{I_1 - I_0} + \frac{1}{K(I_1 - I_0)[\beta - CD]} \quad (3.14)$$

onde  $[\beta\text{-CD}]$  representa a concentração de  $\beta$ -CD,  $I$  e  $I_0$  são as intensidades de fluorescência da Gly-L-Phe na presença e na ausência de  $\beta$ -CD, respectivamente, e  $I_1$  diz respeito à intensidade de fluorescência esperada quando todas as moléculas do hóspede se encontram inseridas no complexo.

A relação linear com o coeficiente de correlação obtido no gráfico da Figura 3.10 apoia a formação de um complexo 1 : 1 de Gly-L-Phe e  $\beta$ -CD. Partindo da razão entre a interceção e o declive do gráfico de Benesi-Hildebrand [61], obteve-se uma constante de associação, aproximadamente, igual a  $43 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Estes valores são concordantes com os valores obtidos através da espectroscopia de RMN e com os valores que foram estimados através dos coeficientes de difusão.



**Figura 3.10** – Gráfico de Benesi-Hildebrand (a 360 nm) para soluções aquosas do complexo de inclusão Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD, na proporção 1 : 1, a 293,15 K.

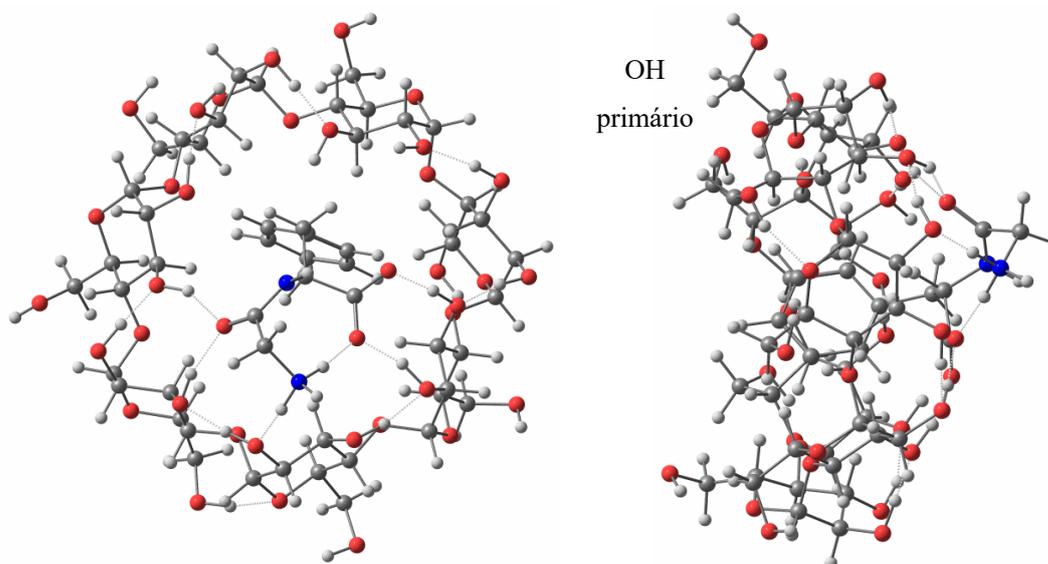
## 3.4 Estudos computacionais

Foram feitos cálculos de DFT e TD-DFT com o objetivo de avaliar os aspectos estruturais do complexo Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD.

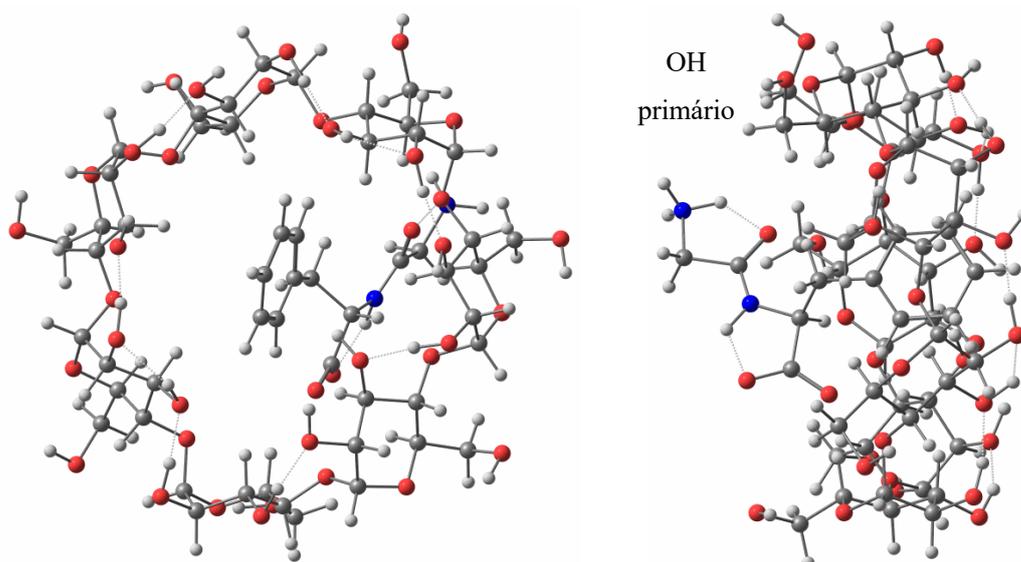
### 3.4.1 Estudos DFT

Os cálculos da teoria dos funcionais da densidade (DFT) foram utilizados para analisar a estabilidade dos complexos de inclusão formados pelas soluções aquosas de Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD. Com base nos resultados experimentais (que sugerem uma estequiometria 1 : 1), podem considerar-se dois tipos de modelos para o complexo de inclusão. As estruturas foram construídas conforme descrito no Capítulo II e ambos os modelos foram otimizados pela teoria DFT (B3LYP) [20].

No modelo 1, o grupo fenil da molécula *guest* é orientado para os grupos hidroxilo primários de  $\beta$ -CD (Figura 3.11). Este modelo é mais estável (por 34,8 kcal mol<sup>-1</sup>) do que o modelo 2, com o grupo fenil da molécula *guest* orientado para os grupos hidroxilo secundários de  $\beta$ -CD (Figura 3.12). Nas duas geometrias otimizadas, o grupo fenil hidrofóbico do peptídeo está localizado para dentro da cavidade e os grupos hidrofílicos para fora da cavidade de  $\beta$ -CD [20].



**Figura 3.11** – Estruturas otimizadas do complexo de inclusão Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD (modelo 1) [20].



**Figura 3.12** – Estruturas otimizadas do complexo de inclusão Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD (modelo 2) [20].

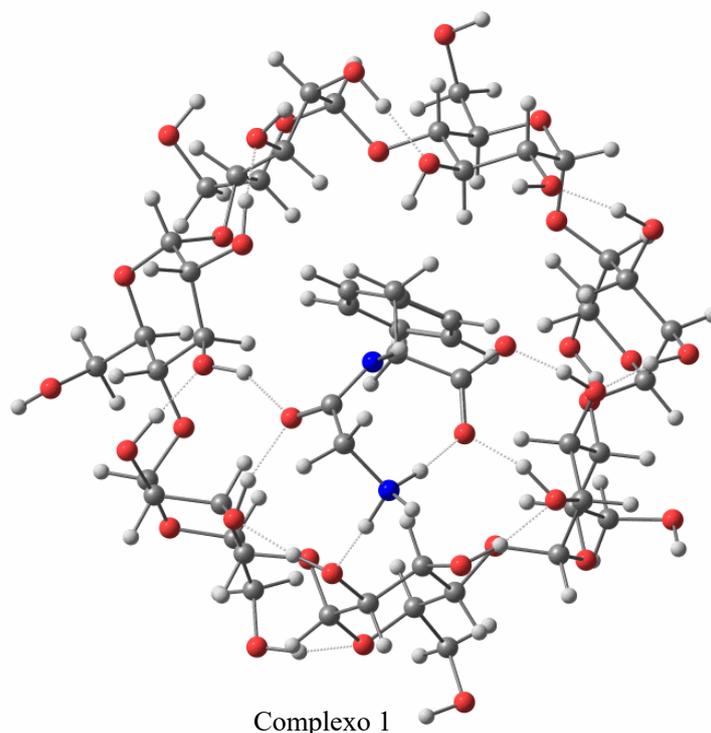
No complexo 1, os átomos de N e O do peptídeo estão envolvidos numa extensa rede de ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo secundários de  $\beta$ -CD, enquanto que no complexo 2, provavelmente devido a interações desfavoráveis, as únicas interações significativas de ligações de hidrogénio são intramoleculares (no peptídeo e na  $\beta$ -CD). Esta é uma diferença significativa entre as duas estruturas otimizadas [20].

As energias de ligação dos complexos de inclusão, calculadas a partir da Equação 3.15, foram de  $-52,58 \text{ kcal mol}^{-1}$  para o modelo 1 e  $-17,79 \text{ kcal mol}^{-1}$  para o modelo 2 [20].

$$E_{\text{ligação}} = E_{\text{complexo}} - (E_{\text{Gly-L-Phe}} + E_{\beta\text{-CD}}) \quad (3.15)$$

A alta estabilidade do complexo 1 deve-se, em parte, à estabilização energética causada pelas ligações de hidrogénio intermoleculares estabelecidas no complexo Gly-L-Phe /  $\beta$ -CD (Figura 3.13). Estes resultados demonstram que a Gly-L-Phe e a  $\beta$ -CD formam complexos estáveis em soluções aquosas. Na estrutura otimizada do complexo 1, as distâncias entre os prótons do grupo fenil, H-9, H-10 e H-11 da Gly-L-Phe e os prótons mais aproximados da  $\beta$ -CD, H-3' e H-5', são (2,02, 2,21, 2,73, e 2,99) Å para os

protões H-9 e H-11. Para o protão H-10, as distâncias são (3,60 e 4,11) Å, em concordância com os picos cruzados observados no NOESY para esses protões [20].



**Figura 3.13** – Rede intermolecular de ligações de hidrogênio estabelecidas no complexo 1 (entre Gly-L-Phe e  $\beta$ -CD), otimizados pela teoria DFT B3LYP/3-21G(d).

A estrutura otimizada do complexo 1 (Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD), sugere que os fragmentos de  $\text{CH}_2\text{OH}$  da  $\beta$ -CD podem ter conformações ligeiramente diferentes, algumas delas induzidas pelas interações do peptídeo dentro da cavidade de  $\beta$ -CD. Existe, assim, uma conformidade com os espectros de RMN para o complexo de inclusão, com o sinal da banda amplo dos protões H-6'  $\text{CH}_2$ .

### 3.4.2 Estudos TD-DFT

Para a obtenção de mais informações acerca do comportamento do complexo de inclusão no estado excitado, foram feitos cálculos TD-DFT (*Time-Dependent Density Functional Theory*) obtendo-se as energias de excitação, a força do oscilador e as principais contribuições dos estados excitados. Na Tabela 3.8 encontram-se os resultados obtidos, na região UV/visível, até 174 nm [20].

**Tabela 3.8** – Energias de excitação, comprimentos de onda,  $\lambda_{\text{calc}}$ , força do oscilador,  $f$ , e principais contribuições para os estados excitados do complexo de inclusão 1 (Gly-L-Phe :  $\beta$ -CD) [20].

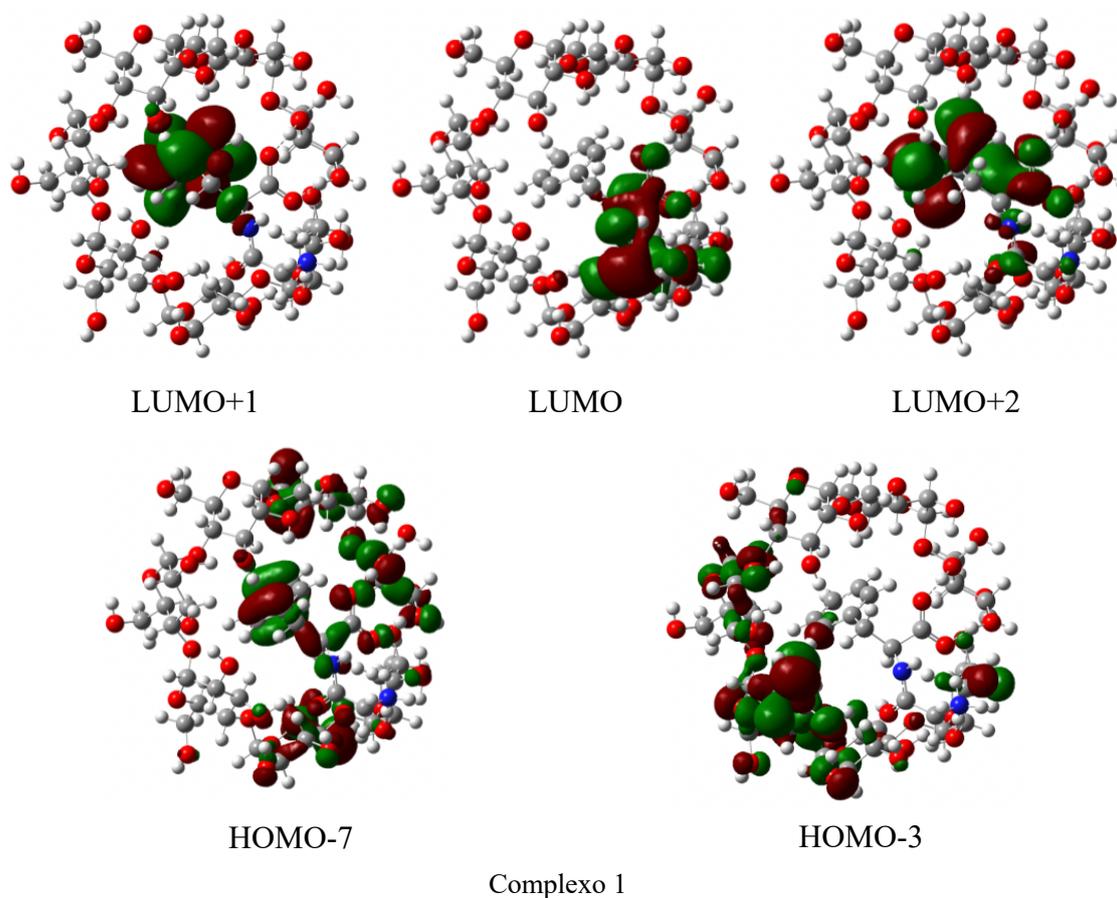
Estado excitado	Energia (eV)	$\lambda_{\text{calc}}$ (nm)	$f^a$	Principais contribuições (%)
S1	5,53	224	0,004	H-7→L+1 (21%) + H-3→L+2 (17%) + H-3→L (13%)
S3	5,60	221	0,015	H-7→L+1 (16%) + H-18→L+2 (16%) + H-44→L (14%)
S4	5,84	212	0,027	H-27→L+1 (21%) + H-3→L (15%) + H-27→L+3 (13%)
S6	6,29	197	0,034	H-3→L+1 (32%) + H-7→L+2 (18%) + H-7→L+1 (13%)
S7	6,36	195	0,067	H-3→L (25%) + H-7→L+2 (17%) + H-3→L+1 (16%)
S17	6,99	177	0,199	H-4→L+2 (18%) + H-6→L+1 (15%) + H-3→L+2 (14%)
S19	7,03	176	0,147	H-7→L+2 (29%) + H-4→L+1 (28%)
S22	7,12	174	0,366	H-7→L+1 (22%) + H-3→L+2 (16%)

<sup>a</sup> Da região de baixa energia até 190 nm, os resultados são relatados para  $f > 0,003$ ; na região de energia entre 190 e 174 nm, os resultados são relatados para  $f > 0,140$ .

O primeiro estado excitado, previsto a 224 nm, tem uma força de oscilador muito baixa e envolve contribuições de uma excitação HOMO-7 a LUMO+1, juntamente com excitações HOMO-3 a LUMO+2 e HOMO-3 a LUMO. As orbitais envolvidas nestas transições encontram-se na Figura 3.14 e demonstram que o estado excitado  $S_1$  do complexo envolve a transferência de cargas entre diferentes regiões de  $\beta$ -CD e de peptídeo.

Os cálculos de TD-DFT indicam que o espectro de absorção do complexo, até 190 nm, tem duas bandas mais fortes para comprimentos de onda 195 nm e 197 nm (estados  $S_7$  e  $S_6$ , respectivamente), juntamente com duas bandas mais fracas para comprimentos de onda 212 nm e 221 nm (estados  $S_4$  e  $S_3$ , respectivamente). As duas bandas de energia mais fortes envolvem transições entre as orbitais HOMO-7 e HOMO-3 para as orbitais LUMO, LUMO+1 e LUMO+2. Estas orbitais descrevem, também, as principais contribuições

para o estado excitado  $S_1$  (Figura 3.14). Pode concluir-se que as duas bandas para comprimentos de onda 195 nm e 197 nm correspondem, também, à transferência de carga entre diferentes regiões de  $\beta$ -CD e de peptídeo [20].



**Figura 3.14** – Diagrama das principais transições que contribuem para o estado excitado  $S_1$  do complexo de inclusão 1 [20].

## SISTEMA GLICIL-L-FENILALANINA + DODECILSULFATO DE SÓDIO

### 3.5 Método de dispersão de Taylor

O método de dispersão de Taylor foi utilizado para estimar os coeficientes de difusão de soluções aquosas dos sistemas ternários glicil-L-fenilalanina (Gly-L-Phe) + dodecilsulfato de sódio (SDS) + H<sub>2</sub>O e os respectivos coeficientes de difusão binários de cada componente em fluxo de água, a 298,15K.

#### 3.5.1 Difusão de SDS em sistemas binários: bibliografia

Os coeficientes de difusão binários,  $D$ , de SDS em soluções aquosas encontram-se representados na Tabela 3.9. Estes dados, já publicados, foram obtidos através da mesma técnica e pelo mesmo grupo de investigação [62].

**Tabela 3.9** – Valores médios de coeficientes de difusão,  $D$ , de SDS em soluções aquosas a diferentes concentrações,  $c$ , e respectivos desvios-padrão experimentais dos valores médios de coeficiente de difusão,  $S_D$ , a 298,15 K [62].

Concentração da solução de fluxo, $c_1 / (\text{mol dm}^{-3})$	$(D \pm S_D) / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$C_V^a / (\%)$
0,0018	$0,795 \pm 0,008$	1,0
0,0028	$0,788 \pm 0,007$	0,89
0,0034	$0,782 \pm 0,007$	0,90
0,0046	$0,781 \pm 0,001$	0,13
0,0118	$0,234 \pm 0,003$	1,3
0,0178	$0,228 \pm 0,003$	1,3
0,0249	$0,277 \pm 0,004$	1,4
0,0462	$0,375 \pm 0,004$	1,1
0,0817	$0,488 \pm 0,004$	0,82

<sup>a</sup>  $C_V$  representa o coeficiente de variação da média dos resultados experimentais, usualmente denominado como imprecisão.

### 3.5.2 Difusão em sistemas ternários: medição e sua interpretação

No âmbito deste projeto, avaliou-se o efeito do SDS em soluções aquosas de Gly-L-Phe medindo os coeficientes de difusão ternários –  $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{21}$  e  $D_{22}$  – para o sistema Gly-L-Phe + SDS + H<sub>2</sub>O abaixo e acima da concentração micelar crítica (CMC). Estes coeficientes de difusão encontram-se representados na Tabela 3.10 e 3.11 para valores de concentração abaixo e acima da CMC, respetivamente.

**Tabela 3.10** – Coeficientes de difusão mútua ternários,  $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{21}$  e  $D_{22}$ , para soluções aquosas de Gly-L-Phe + SDS e respetivos desvios-padrão experimentais dos valores médios de coeficiente de difusão,  $S_D$ , a 298,15 K.<sup>a,b</sup>

$c_1$	$c_2$	$X_1$	$D_{11} \pm S_D$	$D_{12} \pm S_D$	$D_{21} \pm S_D$	$D_{22} \pm S_D$
0,0000	0,0040	0,00	0,870 ± 0,030	0,044 ± 0,024	-0,147 ± 0,030	0,866 ± 0,025
0,0010	0,0030	0,25	0,785 ± 0,026	-0,021 ± 0,019	-0,108 ± 0,051	0,882 ± 0,039
0,0020	0,0020	0,50	0,753 ± 0,008	-0,062 ± 0,045	-0,111 ± 0,022	0,895 ± 0,030
0,0030	0,0010	0,75	0,762 ± 0,014	-0,035 ± 0,024	-0,092 ± 0,019	0,900 ± 0,025
0,0040	0,0000	1,00	0,737 ± 0,004	-0,155 ± 0,011	-0,066 ± 0,015	0,941 ± 0,007

<sup>a</sup>  $c_1$  e  $c_2$  em unidade mol dm<sup>-3</sup>; <sup>b</sup>  $D_{ik} \pm S_D$  em unidade 10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.11** – Coeficientes de difusão mútua ternários,  $D_{11}$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{21}$  e  $D_{22}$ , para soluções aquosas de Gly-L-Phe + SDS e respetivos desvios-padrão experimentais dos valores médios de coeficiente de difusão,  $S_D$ , a 298,15 K.<sup>a,b</sup>

$c_1^a$	$c_2^a$	$X_1^b$	$D_{11} \pm S_D$	$D_{12} \pm S_D$	$D_{21} \pm S_D$	$D_{22} \pm S_D$
0,0000	0,0500	0,000	0,544 ± 0,010	-0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,011	0,420 ± 0,001
0,0025	0,0500	0,048	0,543 ± 0,025	0,100 ± 0,012	0,030 ± 0,099	0,338 ± 0,010
0,0075	0,0500	0,130	0,525 ± 0,024	0,049 ± 0,002	0,062 ± 0,03	0,389 ± 0,004

<sup>a</sup>  $c_1$  e  $c_2$  em unidade mol dm<sup>-3</sup>; <sup>b</sup>  $D_{ik} \pm S_D$  em unidade 10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.

Através da análise dos resultados da Tabela 3.10, é possível verificar que os valores de  $D_{22}$  são superiores aos valores obtidos para  $D_{11}$ . Neste caso, o  $D_{11}$  diminui com o aumento da concentração,  $c_1$ , algo que também acontece para os coeficientes de difusão binários (Tabela 3.9). Uma das possíveis justificações é o aumento da associação de

moléculas de Gly-L-Phe com o aumento da sua concentração, diminuindo a sua mobilidade e, conseqüentemente, o coeficiente de difusão.

Os coeficientes de difusão secundários,  $D_{12}$  e  $D_{21}$ , apresentam valores diferentes de zero, o que sugere que ocorrem interações entre os solutos. Os coeficientes de difusão secundários,  $D_{12}$ , apresentam valores negativos (à exceção do primeiro), indicando que o fluxo de Gly-L-Phe, devido ao gradiente de concentração do SDS, é realizado em sentido inverso, ou seja, ocorre um contra-transporte.

Aparentemente, o peptídeo encontra-se encapsulado na micela de SDS e, portanto, não existe em solução peptídeo sob a forma livre. Assim sendo, o  $D_{11}$  (0,529) é, praticamente, igual ao valor do *tracer* ( $D_{11} = 0,544$ ). O valor de  $D_{22}$  diminui devido à existência do agregado, o que provoca uma maior resistência ao movimento diminuindo, assim, o valor de coeficiente de difusão. O facto de o coeficiente de difusão vestigial do peptídeo em  $X_1 = 0$  ( $D_{11} = 0,544$ ) ser significativamente menor do que o coeficiente de difusão vestigial do peptídeo em água pura ( $D = 0,766$ ), pode ser justificado através da solubilização parcial por ação das micelas de SDS (coeficiente de difusão micelar,  $D_{mic.} = 0,100$ ). Ao verificar-se este pressuposto, a fração  $X_S$  do peptídeo solubilizado poderá ser estimada pela Equação 3.16, resultando que  $X_S = 0,333$ , o que indica que cerca de um terço do peptídeo total é solubilizado.

$$D_{11} = (1 - X_S) D + X_S D_{mic.} \quad (3.16)$$

Assim, analisando o seguinte equilíbrio:

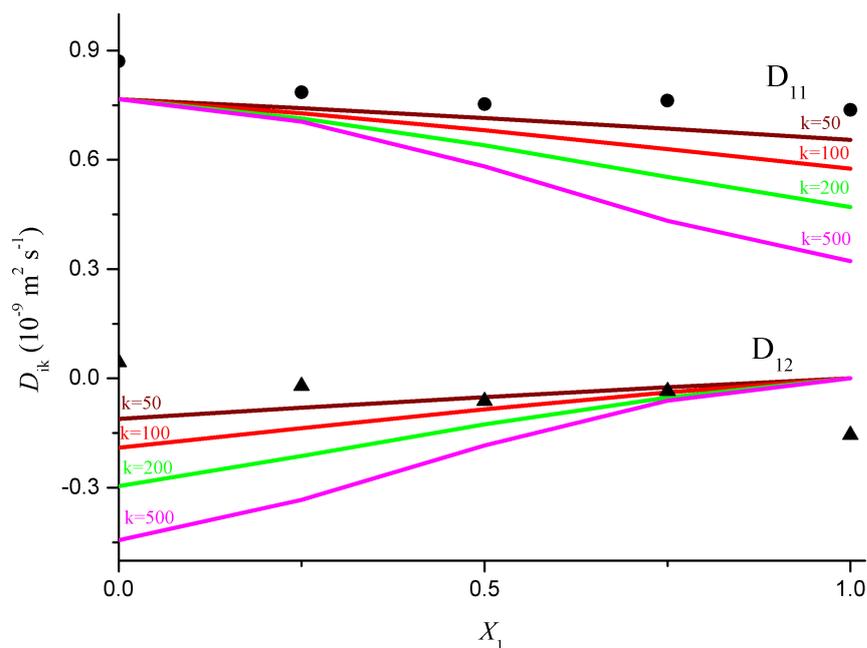


a constante de equilíbrio correspondente,  $K$ , pode ser definida pela Equação 3.7, onde  $c_i^*$  ( $i$  igual a 1,2 ou 3) são as concentrações de Gly-L-Phe, SDS e Gly-L-Phe : SDS, respetivamente. Conseqüentemente, e de igual modo, a dependência dos coeficientes de difusão ternários das concentrações dos diferentes componentes pode ser descrita pelas seguintes Equações 3.8 a 3.11.

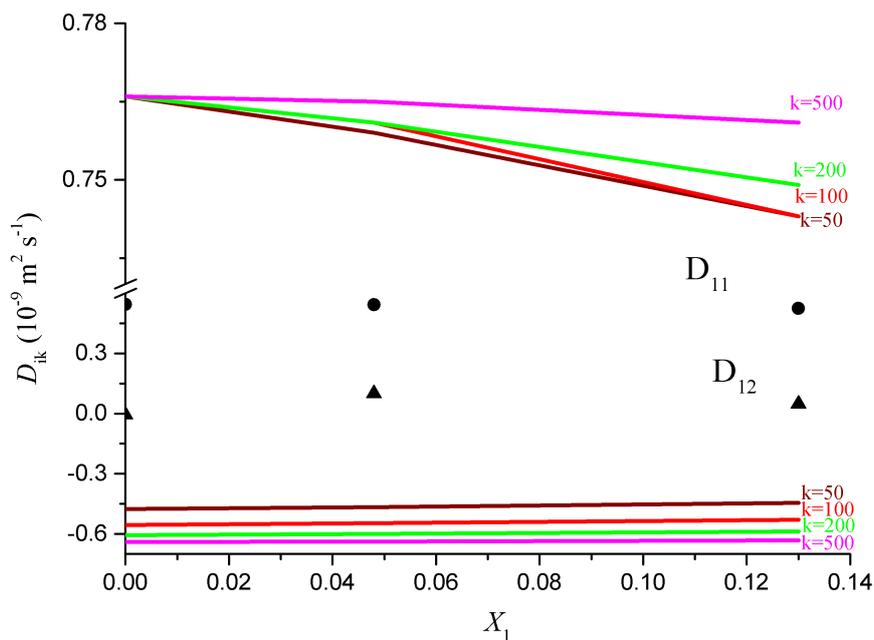
As Figuras 3.15 e 3.16 expõem os gráficos representativos dos valores previstos para  $D_{11}$  e  $D_{12}$ , quando comparados com os valores experimentais, para diferentes constantes de equilíbrio ( $K_{\text{complexo}} = 50, 100, 200$  e  $500 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ), a valores superiores e

inferiores à CMC do SDS, respetivamente. Em anexo encontram-se as Figuras A.2 e A.3 para os valores previstos de  $D_{22}$  e  $D_{21}$ .

A partir da análise da Figura 3.15, pode concluir-se que o modelo aplicado se aproxima dos dados experimentais para um coeficiente de difusão,  $D$ , com uma constante de equilíbrio de  $50 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Estes valores sugerem que a interação entre Gly-L-Phe e SDS é fraca de acordo com os valores obtidos para outros hóspedes semelhantes [63, 64]. A partir da análise da Figura 3.16, verifica-se que o modelo não se aplica à forma de agregados e, como tal, nada mais se pode concluir.



**Figura 3.15** – Coeficientes de difusão mútua ternários do sistema Gly-L-Phe + SDS vs. a fração de soluto de Gly-L-Phe,  $X_1$ , para valores de concentração abaixo da CMC do SDS, a 298,15 K. Os valores de  $D_{ij}$  foram previstos pelas Equações (3.8 e 3.9) para os diferentes valores de  $K$  (Equação 3.7). Valores medidos: ● ( $D_{11}$ ); ▲ ( $D_{12}$ ).



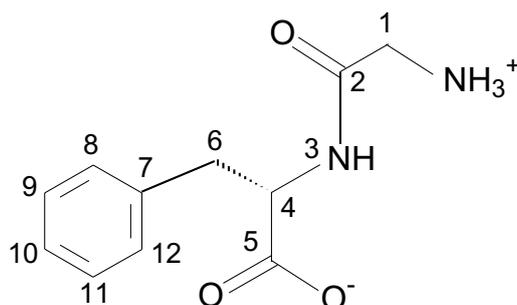
**Figura 3.16** – Coeficientes de difusão mútua ternários do sistema Gly-L-Phe + SDS vs. a fração de soluto de Gly-L-Phe,  $X_1$ , para valores de concentração acima da CMC do SDS, a 298,15 K. Os valores de  $D_{ij}$  foram previstos pelas Equações (3.8 e 3.9) para os diferentes valores de  $K$  (Equação 3.7). Valores medidos: ● ( $D_{11}$ ); ▲ ( $D_{12}$ ).

### 3.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

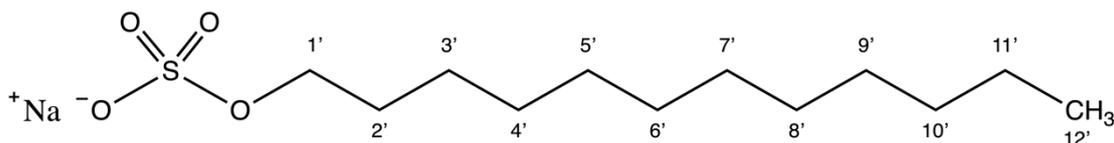
Para este sistema, foi utilizada a espectroscopia de RMN uni- e bidimensional de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{23}\text{Na}$  para aprofundar as interações intermoleculares na formação do complexo de inclusão do peptídeo Gly-L-Phe com SDS. Foi, também, obtida a respectiva estequiometria e constante de associação para o complexo de inclusão formado – Gly-L-Phe : SDS – utilizando o método de variação contínua (método de Job).

#### 3.6.1 Espectros RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e de $^{23}\text{Na}$

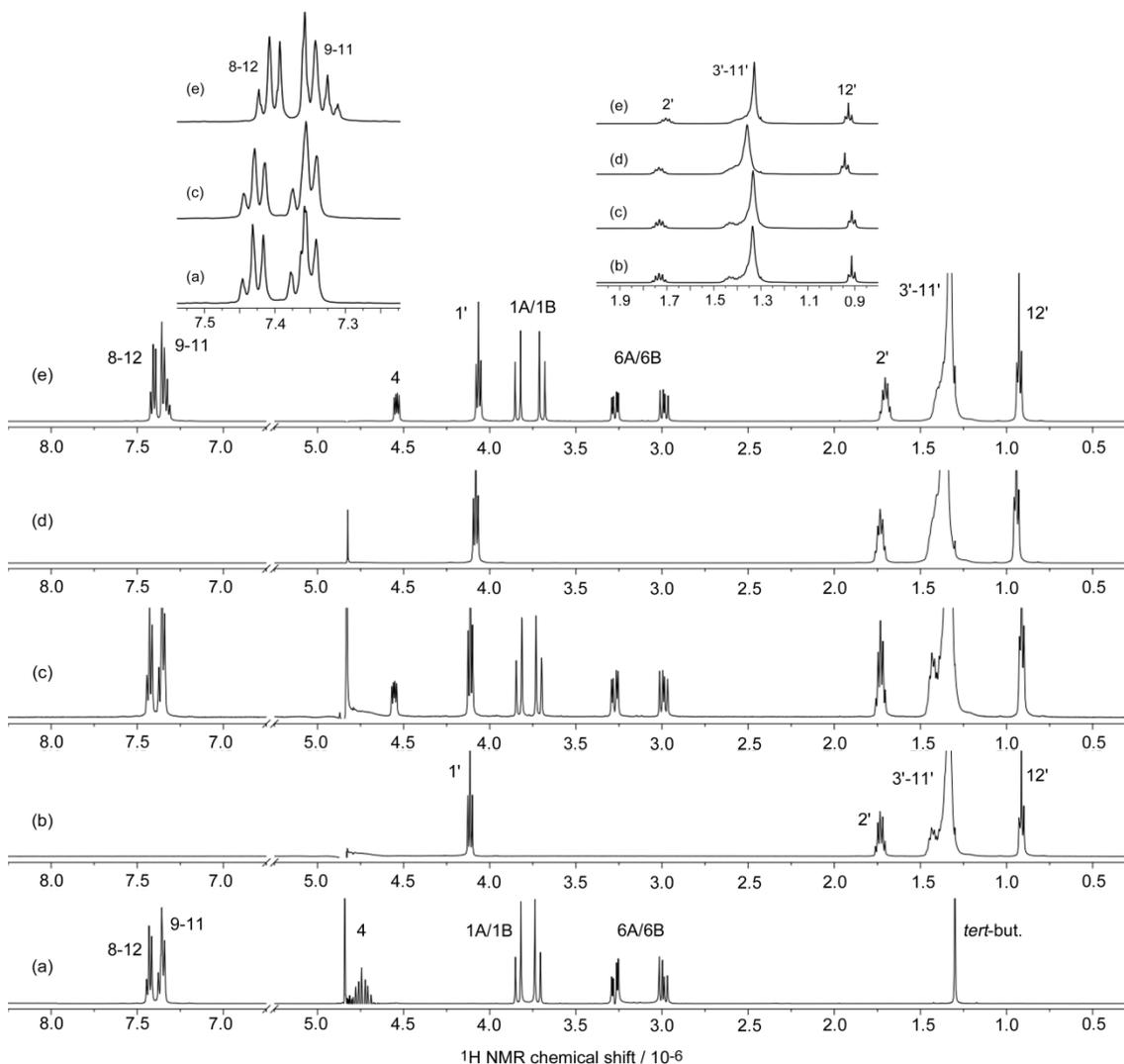
Os esquemas 3.2 e 3.3 mostram as representações esquemáticas e numeração para as moléculas de Gly-L-Phe e SDS, respetivamente. Na Figura 3.17 encontram-se os espectros RMN de  $^1\text{H}$  das soluções de Gly-L-Phe, SDS e da mistura de ambos os componentes, utilizando duas condições de concentrações, inferior e superior à CMC do SDS, respetivamente. Os parâmetros espectrais completos de RMN de  $^1\text{H}$  encontram-se nas Tabelas 3.12 e 3.13.



**Esquema 3.2** – Representação esquemática e numeração da molécula de Gly-L-Phe.



**Esquema 3.3** – Representação esquemática e numeração da molécula de SDS.



**Figura 3.17** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  (a) Gly-L-Phe  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,3$ ; (b) SDS  $6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 9,2$ ; (c) SDS : Gly-L-Phe ( $6 : 6$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,8$ ; (d) SDS  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,6$ ; (e) SDS : Gly-L-Phe ( $50 : 50$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,8$ ; expansões de (0,80 a 2,00) ppm para uma melhor visualização dos sinais dos prótons H-2', H-3' – H-11' e H-12' do SDS na presença e na ausência da Gly-L-Phe de (7,22 a 7,54) ppm para uma melhor visualização dos sinais dos prótons H-8, H-9, H-10, H-11 e H-12 da Gly-L-Phe na presença e na ausência de SDS, a 298,15 K.

**Tabela 3.12** – Parâmetros<sup>a</sup> de RMN de <sup>1</sup>H para o SDS na ausência e na presença da Gly-L-Phe, a 298 K.

	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'- H-11'	H- 12'	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{11',12''}$	$\Delta\nu_{1/2}$ (H- 4'-H-11')
SDS 6 mmol dm <sup>-3</sup> (pH*=7,2)	4,17	1,79	1,43	1,34	0,91	4,9	8,9	6,8	11
SDS 50 mmol dm <sup>-3</sup> (pH*=6,3)	4,08	1,73	1,36	1,36	0,94	6,8	9,6	6,8	15
SDS/Gly-L-Phe 6 : 6 mmol dm <sup>-3</sup> (pH*=6,8)	4,11	1,73	1,43	1,33	0,91	6,5	7,0	5,5	11
SDS/Gly-L-Phe 50 : 50 mmol dm <sup>-3</sup> (pH*=6,8)	4,07	1,70	1,40	1,33	0,93	5,0	7,2	6,6	7

<sup>a</sup>  $\delta$ , em ppm, relativo a Me<sub>4</sub>Si, usando o *tert*-butanol ( $\delta_{\text{H}} = 1,3$ ) como referência interna; valores de  $J$  em Hz.

**Tabela 3.13** – Parâmetros<sup>a</sup> de RMN de <sup>1</sup>H para a Gly-L-Phe na ausência e na presença do SDS, a 298 K.

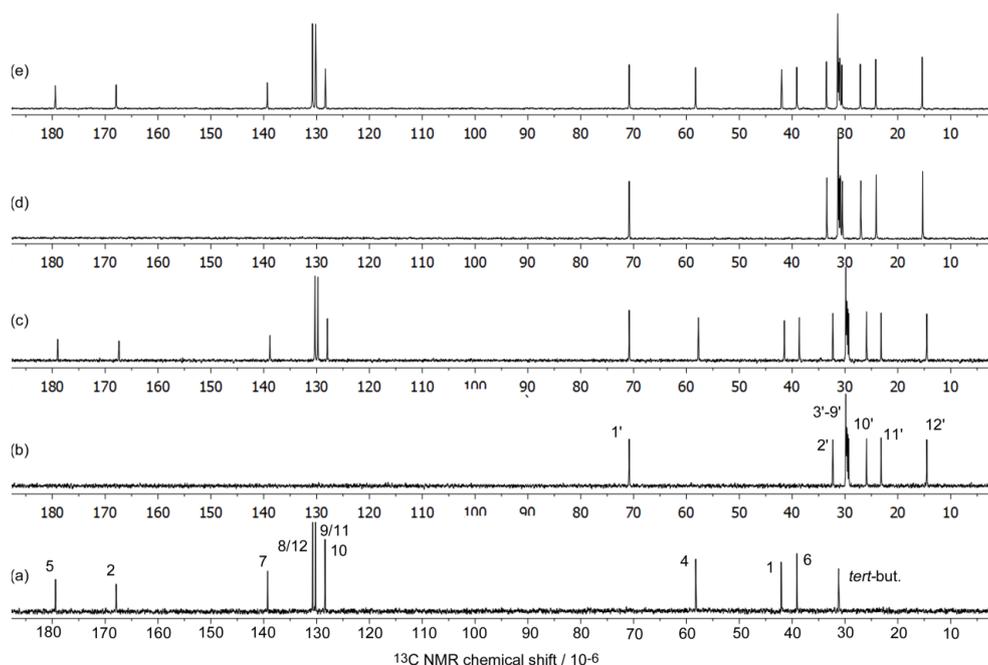
	H- 1a/1b	H-4	H- 6a/6b	H-8/12	H- 9/10/ 11	$ J_{1a/1b} $	$ J_{6a/6b} $	$J_{4,6a} /$	$J_{4,6b}$
Gly-L-Phe <sup>b</sup> (pH*=6,3)	3,73/ 3,84	4,74	3,27/ 3,00	7,43	7,36	16,1	14,3	9,1/	4,9
Gly-L-Phe/SDS <sup>c</sup> 6 : 6 mmol dm <sup>-3</sup> (pH*=6,3)	3,72/ 3,85	4,56	3,28 /3,00	7,41	7,36	16,1	14,3	9,2/	5,1
Gly-L-Phe/SDS <sup>c</sup> 50 : 50 mmol dm <sup>-3</sup> (pH*=6,3)	3,70/ 3,84	4,55	3,27/ 2,99	7,41	7,34	16,1	14,1	9,2	4,9

<sup>a</sup>  $\delta$ , em ppm, relativo a Me<sub>4</sub>Si, usando o *tert*-butanol ( $\delta_{\text{H}} = 1,3$ ) como referência interna; valores de  $J$  em Hz.

De acordo com a Figura 3.17, pode verificar-se que no espectro de RMN de <sup>1</sup>H da mistura de Gly-L-Phe + SDS, se observam alterações tanto em relação ao espectro do peptídeo na ausência de SDS como em relação ao espectro de SDS na ausência de peptídeo.

Relativamente aos sinais de RMN de <sup>1</sup>H para a Gly-L-Phe na presença de SDS, é possível observar modificações nos sinais do anel aromático em relação ao espectro da molécula de Gly-L-Phe na ausência de SDS. Esta modificação é mais intensa para concentrações de SDS acima da CMC. Também se pode observar um estreitamento no perfil dos sinais para frequências mais baixas, principalmente nos prótons H-9, H-10 e H-11, mostrando, além disso, o aparecimento de dois novos sinais. Estas observações

sugerem uma maior rigidez na região do anel aromático como resultado da sua interação com o SDS, alterando a dinâmica do peptídeo, provavelmente como resultado da inclusão da zona aromática nas micelas de SDS. Os sinais  $^1\text{H}$  do SDS também sofrem alterações, sugerindo uma interação entre o surfactante e o polímero. Uma vez que, em solução, as moléculas de SDS livre (formas monoméricas) e as incluídas nas micelas estão em troca rápida, na escala de tempo de RMN, as alterações de largura de linha observadas nos sinais de SDS de  $\text{CH}_2\text{-3}$  a  $\text{CH}_2\text{-11}'$  sugerem uma grande mobilidade, para concentrações abaixo da CMC e, acima deste valor, uma notória restrição de flexibilidade. Esta observação sugere interações hidrofóbicas intensificadas para concentrações acima da CMC, com a inclusão da zona aromática do peptídeo Gly-L-Phe nas micelas de SDS, formando micelas mistas. Nestas, a zona não aromática do peptídeo deverá localizar-se no exterior da micela. Além do mais, as interações hidrofóbicas estabelecidas entre o anel aromático do peptídeo com o SDS na micela são, também, compatíveis com o desvio sofrido pelo sinal do grupo  $\text{CH}_3\text{-12}'$  do SDS na presença de peptídeo para frequências mais baixas. Na Figura 3.18 encontram-se os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das soluções de Gly-L-Phe, SDS e da mistura de ambos, utilizando duas condições de concentrações, abaixo e acima da CMC do SDS, respectivamente.



**Figura 3.18** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  de (a) Gly-L-Phe  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,3$ ; (b) SDS  $6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 7,2$ ; (c) SDS : Gly-L-Phe ( $6 : 6$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,8$ ; (d) SDS  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,6$ ; (e) SDS : Gly-L-Phe ( $50 : 50$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,8$ , a  $298,15 \text{ K}$ .

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  não apresentam alterações, tal como para o primeiro sistema estudado. Deve-se essa observação ao facto dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  serem mais sensíveis a pequenas variações de densidade de carga eletrónica do que os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$ . de uma forma geral, para um dado núcleo de um nuclide sensível em RMN,  $\sigma$ , a constante de proteção, além de outras pequenas contribuições, é fundamentalmente determinada pela soma de  $\sigma_d$  e  $\sigma_p$  ( $\sigma_d + \sigma_p$ ). O deslocamento químico de um determinado núcleo está relacionado com a constante de proteção  $\sigma$  ( $\sigma_d + \sigma_p$ ) através da expressão:

$$\delta_i = (\sigma_{\text{ref}} - \sigma_i) \times 10^6 = [(v_i - v_{\text{ref}}) \times 10^6] / \nu_0 \text{ aparelho (ppm)} \quad (3.18)$$

sendo

$$\sigma = \sigma_d + \sigma_p \quad (3.19)$$

em que

$$\sigma_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{3m} \sum_i (r^{-1}) \quad (3.20)$$

$$\sigma_p = - \frac{2e^2h^2}{3m^2c^2} \langle r^{-3} \rangle P_u \left( \frac{1}{\Delta E} \right) \quad (3.21)$$

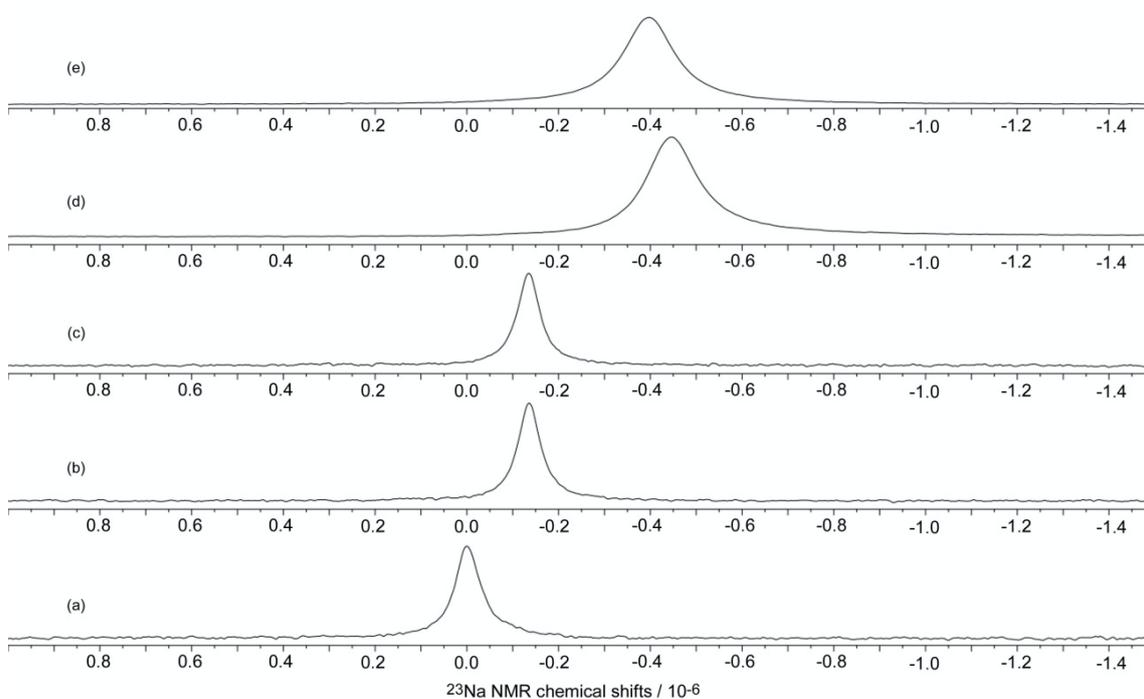
Na Equação de Lamb (3.20),  $\mu^0$  é a permeabilidade magnética do vácuo,  $e$  e  $m$  a carga e massa do eletrão, respetivamente, e  $r$  a distância de cada um dos eletrões ao núcleo sendo, conseqüentemente, o termo  $\sigma_d$  proporcional à densidade de carga eletrónica em redor de cada núcleo.

Na equação de Ramsey (3.21),  $\langle r^{-3} \rangle$ ,  $P_u$  e  $\Delta E$  correspondem, respetivamente, ao inverso do volume médio, à carga não compensada de uma orbital de valência e à média da diferença de energia entre o estado fundamental e todos os estados excitados possíveis. O valor de  $\Delta E$  é normalmente estimado a partir do espectro eletrónico da molécula. O deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) é linearmente dependente de  $1 / \Delta E$ , dado que as propriedades das orbitais representadas pelos fatores  $\langle r^{-3} \rangle$  e  $P_u$  variam de modo a que a constante de proteção dependa maioritariamente da parcela  $\sigma_p$ , como é o caso do  $^{13}\text{C}$  [58].

Em sistemas como os que estão em estudo, em que da interação entre as moléculas resultam variações ténues de densidade de carga eletrónica em alguns locais da molécula, a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  é bastante adequada, uma vez que é suficientemente

sensível para mostrar alterações de deslocamento químico para prótons situados nas zonas de maior variação de densidade eletrônica. Já os espectros de  $^{13}\text{C}$  não mostram qualquer alteração, uma vez que o termo  $\sigma_p$ , através de  $\Delta E$ , apenas varia com perturbações mais intensas como, por exemplo, com a protonação/desprotonação de grupos polares da molécula e alterações conformacionais significativas decorrentes de interações ou de processos dinâmicos presentes.

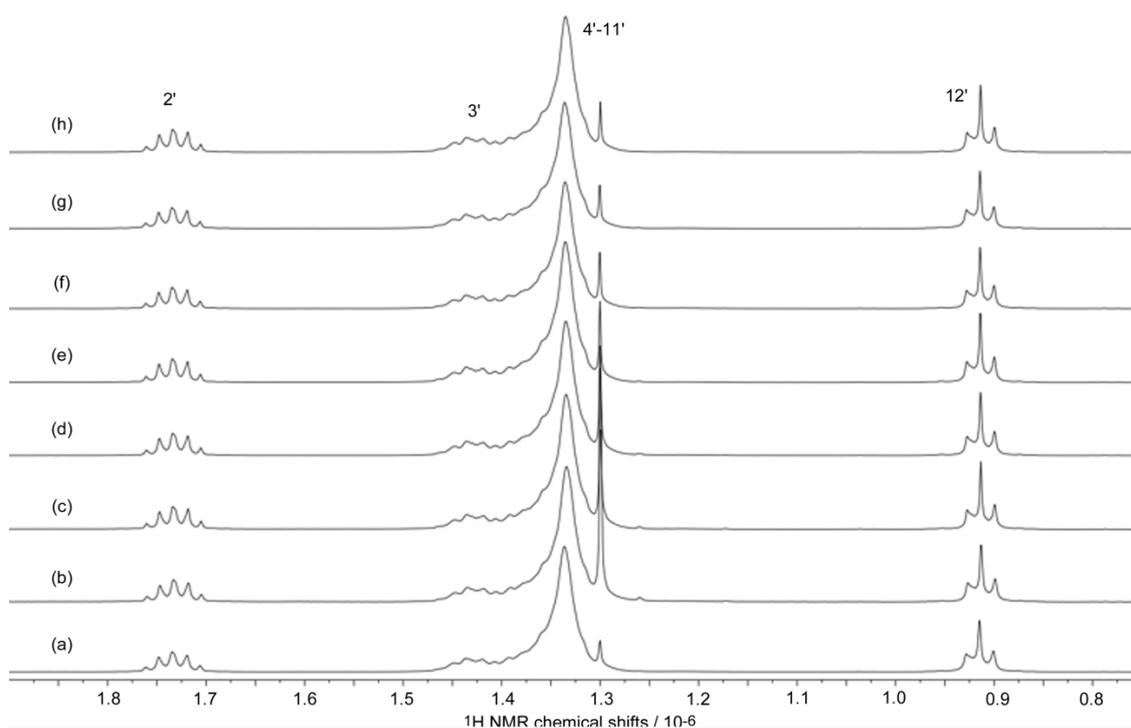
Adicionalmente, é possível que existam interações hidrofílicas e eletrostáticas estabelecidas no exterior das micelas nas quais os grupos  $\text{OSO}_3^-$  e o contra-íon  $\text{Na}^+$  podem estabelecer interações entre si e com outros grupos polares do peptídeo, como é sugerido nos espectros de RMN de  $^{23}\text{Na}$  apresentados na Figura 3.19.



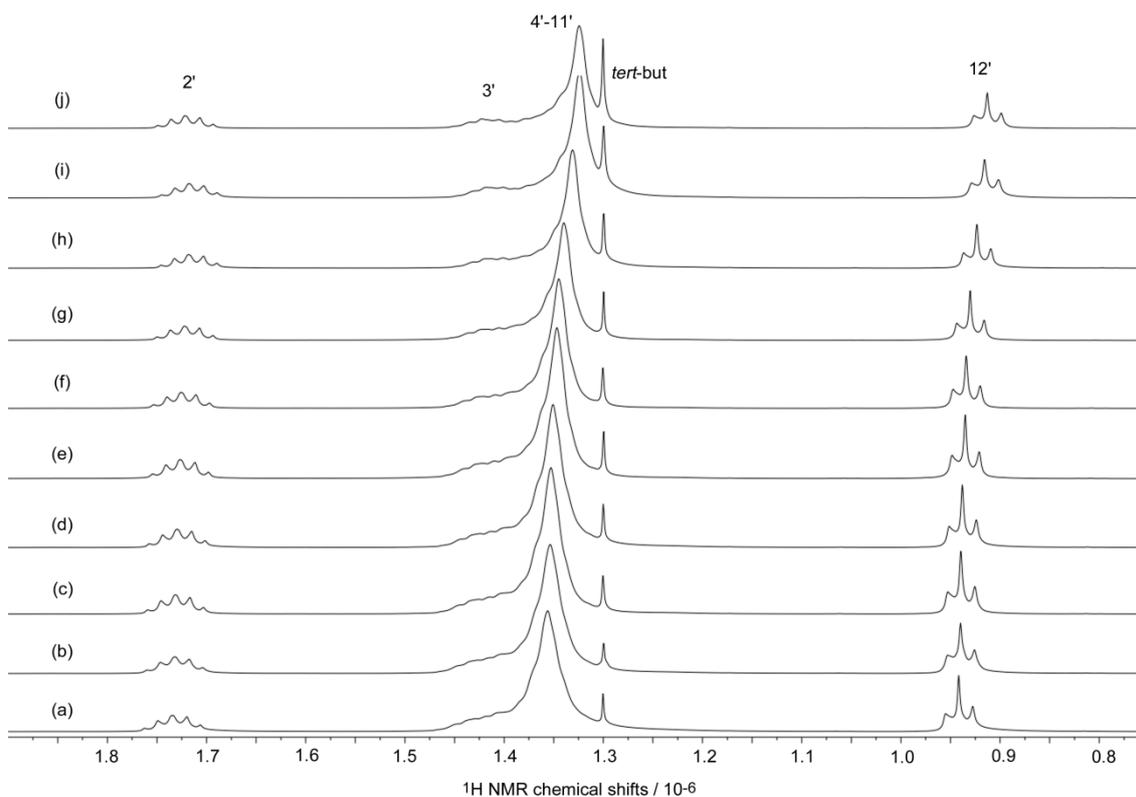
**Figura 3.19** – Espectros de RMN de  $^{23}\text{Na}$  das soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  (a)  $\text{NaCl}$   $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  (referência externa); (b)  $\text{SDS}$   $6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 9,2$ ; (c)  $\text{SDS} : \text{Gly-L-Phe}$  ( $6 : 6$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,8$ ; (d)  $\text{SDS}$   $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,6$ ; (e)  $\text{SDS} : \text{Gly-L-Phe}$  ( $50 : 50$ )  $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,8$ , a  $298,15 \text{ K}$ .

### 3.6.2 Gráfico de Job

A razão molar das espécies Gly-L-Phe : SDS envolvidas nas micelas mistas, na fase pré-micelar e micelar, foram determinadas através do método de variação contínua (gráfico de Job) [36, 37, 38]. Foi necessário preparar soluções contendo Gly-L-Phe e SDS, variando as suas proporções para se obter uma gama de frações molares entre 0 e 1,  $0 < [\text{Gly-L-Phe}] / [\text{Gly-L-Phe}] + [\text{SDS}] < 1$ , onde a concentração total ( $[\text{Gly-L-Phe}] + [\text{SDS}]$ ) é mantida constante para cada solução. Para ambas as situações, o parâmetro experimental observado é o deslocamento químico dos prótons  $\text{CH}_3\text{-12}'$  do SDS, por ser sensível à formação de um agregado (Figuras 3.20 e 3.21, para condições de concentração pré-micelar e micelar, respetivamente).

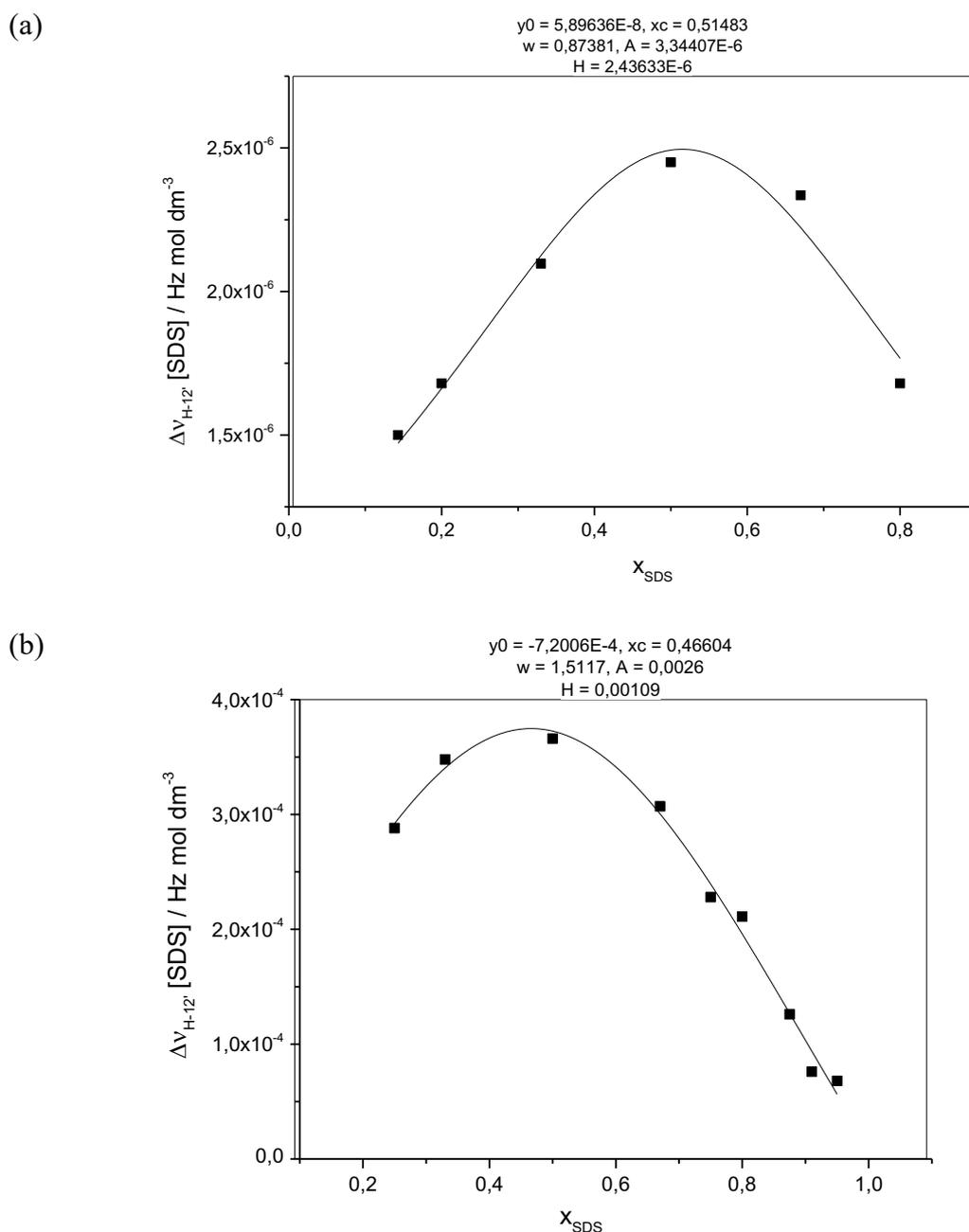


**Figura 3.20** – Expansão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das soluções Job em  $\text{D}_2\text{O}$  de (0,75 a 1,90) ppm: (a) SDS  $7,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,5$ ; (b) Gly-L-Phe / SDS (1,0 : 6,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (c) Gly-L-Phe / SDS (1,4 : 5,6)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (d) Gly-L-Phe / SDS (2,3 : 4,7)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (e) Gly-L-Phe / SDS (3,5 : 3,5)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (f) Gly-L-Phe / SDS (4,7 : 2,3)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (g) Gly-L-Phe / SDS (5,6 : 1,4)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (h) Gly-L-Phe / SDS (6,0 : 1,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ , a 298,15 K.



**Figura 3.21** – Expansão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das soluções Job em  $\text{D}_2\text{O}$  de (0,75 a 1,90) ppm: (a) SDS  $40,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}^* 6,5$ ; (b) Gly-L-Phe / SDS (2,0 : 38,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (c) Gly-L-Phe / SDS (3,6 : 36,4)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (d) Gly-L-Phe / SDS (5,0 : 35,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (e) Gly-L-Phe / SDS (8,0 : 32,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (f) Gly-L-Phe / SDS (10,0 : 30,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (g) Gly-L-Phe / SDS (13,3 : 26,7)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (h) Gly-L-Phe / SDS (20,0 : 20,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (i) Gly-L-Phe / SDS (25 : 15)  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; (j) Gly-L-Phe / SDS (30,0 : 10,0)  $\text{mmol dm}^{-3}$ , a 298,15 K.

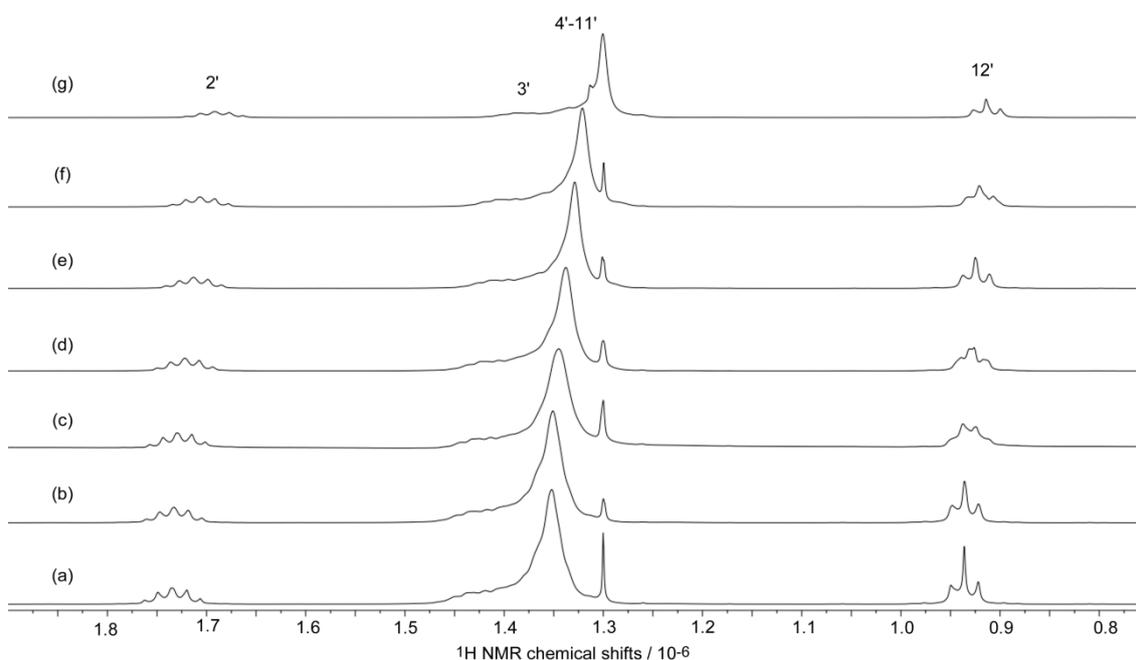
O gráfico de  $\Delta\delta (\text{H-12}') \times [\text{SDS}]$  em função da fração molar do SDS está representado na Figura 3.22. Ambos os gráficos apresentam um valor máximo para  $x = 0,5$ , o que sugere a existência de micelas mistas contendo unidades alternadas de SDS e de Gly-L-Phe numa razão molar de 1 : 1 (Gly-L-Phe : SDS). Embora, abaixo da CMC, o surfactante se encontre, essencialmente, como uma espécie unimérica solvatada, os espectros representados na Figura 3.20 mostram a existência de pequenos desvios dos prótons  $\text{CH}_3\text{-12}'$  com o aumento da concentração de Gly-L-Phe, o que sugere que, para esta concentração de SDS pré-micelar,  $7 \text{ mmol dm}^{-3}$ , se detetam já agregados micelares mistos, ainda que em concentrações muito baixas, da ordem do micromolar,  $10^{-3} \text{ mmol dm}^{-3}$ .



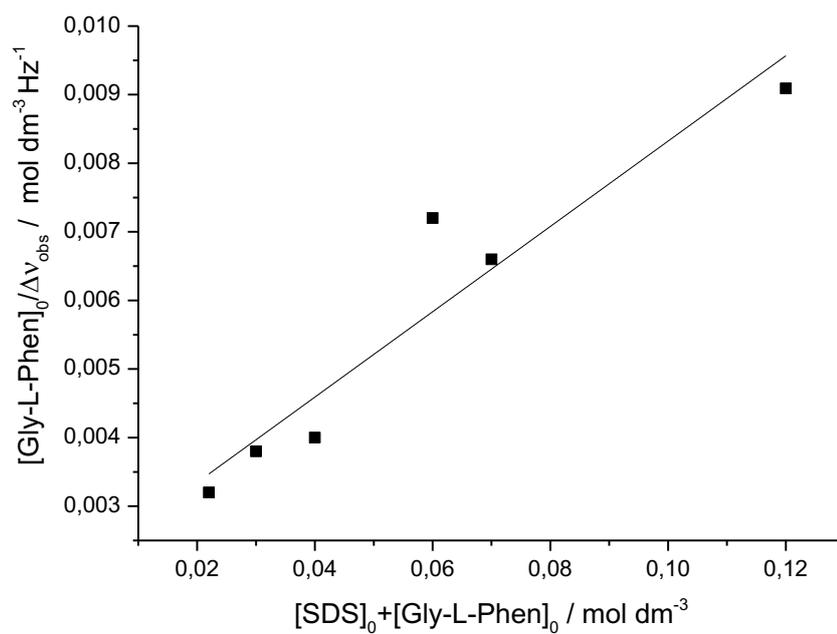
**Figura 3.22** – Gráfico de Job (método da variação contínua) do complexo Gly-L-Phe : SDS na micela, mostrando uma estequiometria de 1 : 1 ( $\Delta\nu = \nu$  (complexo) -  $\nu$  (livre)), com concentração total [Gly-L-Phe] + [SDS]: (a) 7 mmol dm<sup>-3</sup>; (b) 40 mmol dm<sup>-3</sup>, a 298,15 K.

Para obter informações acerca da associação SDS – peptídeo na micela, foram obtidos espectros de RMN de <sup>1</sup>H das soluções contendo 20 mmol dm<sup>-3</sup> de SDS e Gly-L-Phe com concentrações entre 2 a 100 mmol dm<sup>-3</sup>. A partir dos deslocamentos

químicos, em Hz, dos prótons CH<sub>3</sub>-12' do SDS, é possível medir  $\Delta\nu = \nu - \nu^0$ , ou seja, a diferença entre a frequência observada para os prótons CH<sub>3</sub>-12' na mistura e no SDS na ausência do peptídeo. Assim sendo, a constante de associação do complexo Gly-L-Phe com o SDS foi estimada seguindo o método de Sompornpisut et al. [54], a partir da relação  $[\text{Gly-L-Phe}] / \Delta\nu$  em função de  $([\text{SDS}] + [\text{Gly-L-Phe}])$  (Figuras 3.23 e 3.24). O valor estimado foi de  $30 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , para uma concentração acima da CMC, sendo este valor superior ao encontrado na bibliografia ( $17 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ) [65].



**Figura 3.23** – Expansão dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H das soluções em D<sub>2</sub>O de 0,75 a 1,90 ppm: (a) SDS 20 mmol dm<sup>-3</sup>, pH\* 6,5; (b) Gly-L-Phe / SDS (2,0 : 20) mmol dm<sup>-3</sup>; (c) Gly-L-Phe / SDS (10 : 20) mmol dm<sup>-3</sup>; (d) Gly-L-Phe / SDS (20 : 20) mmol dm<sup>-3</sup>; (e) Gly-L-Phe / SDS (40 : 20) mmol dm<sup>-3</sup>; (f) Gly-L-Phe / SDS (50 : 20) mmol dm<sup>-3</sup>; (g) Gly-L-Phe / SDS (100 : 20) mmol dm<sup>-3</sup>, a 298,15 K.

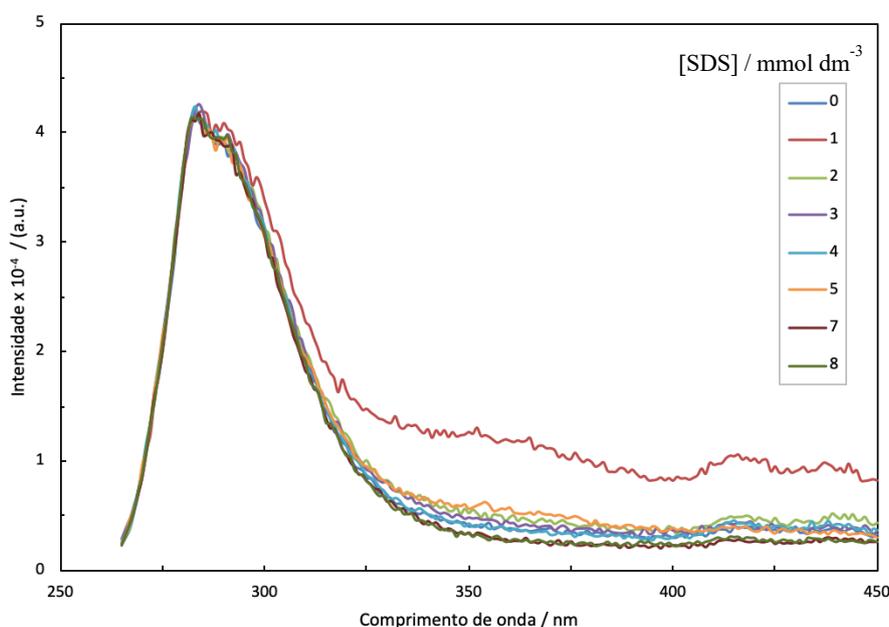


**Figura 3.24** – Curva de ajuste linear dos dados experimentais de  $[Gly-L-Phe] / \Delta v$  para o  $CH_3-12'$  terminal do SDS *versus* a concentração total.

### 3.7 Espectroscopia de fluorescência

Para este segundo sistema foi, também, ponderada a formação de um complexo de inclusão entre o peptídeo, Gly-L-Phe, e o surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio, SDS, através da técnica de espectroscopia de fluorescência. Quando uma quantidade suficiente de SDS é adicionada a uma solução aquosa, certas propriedades desta são significativamente alteradas, nomeadamente a tensão superficial – que decresce – e a solubilidade de hidrocarbonetos – que aumenta. No entanto, estas propriedades não se alteram até que seja atingida a CMC do SDS (cerca de  $8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Abaixo da CMC, o surfactante encontra-se, essencialmente, como uma espécie unimérica solvatada, enquanto acima da CMC estes unímeros sofrem um processo de auto-associação formando estruturas designadas de micelas que podem formar complexos de inclusão com determinados cromóforos [66].

Na Figura 3.25 encontra-se representado o espectro de emissão de fluorescência para uma concentração de  $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  de Gly-L-Phe, obtido com excitação a  $255 \text{ nm}$  na presença e na ausência de SDS para diferentes concentrações. Ao adicionar SDS, verifica-se o aparecimento de uma nova banda de emissão para maiores comprimentos de onda, Figura 3.25. No entanto, não foi possível de calcular a constante de associação utilizando o método de Benesi-Hildebrand (Equação 3.14) devido à dispersão de dados.



**Figura 3.25** – Espectro de emissão de fluorescência de Gly-L-Phe na presença de diferentes concentrações de SDS.

# Capítulo IV

---

---

Conclusão

---

---

Neste projeto de Mestrado em Química, foram utilizadas diversas técnicas – método de dispersão de Taylor, a espectroscopia de RMN, a espectroscopia de fluorescência e os estudos computacionais – para caracterizar as interações de Gly-L-Phe com  $\beta$ -CD e com SDS.

Para a Gly-L-Phe, obteve-se um valor limite do coeficiente de difusão para concentração infinitesimal de  $7,66 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  a 298,15 K.

Relativamente ao primeiro sistema estudado (Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD + H<sub>2</sub>O), o coeficiente de difusão principal,  $D_{11}$ , aumenta com o aumento da fração molar de soluto de Gly-L-Phe. O coeficiente de difusão secundário,  $D_{12}$ , é negativo, o que indica contra-corrente dos fluxos acoplados. Este tipo de comportamento indica que a difusão de Gly-L-Phe é afetada pela presença com a  $\beta$ -CD, que se pode confirmar com uma constante de associação inferior a  $100 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Através da espectroscopia de RMN foi possível obter uma constante de associação de  $40 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Foi, também, possível concluir que a estequiometria da interação é de 1 : 1. A partir dos espectros de RMN pode observar-se uma blindagem dos prótons da cavidade da  $\beta$ -CD, acompanhada por um estreitamento do perfil dos prótons do anel aromático de Gly-L-Phe, sugerindo uma complexação entre Gly-L-Phe e  $\beta$ -CD. Os espectros 2D-RMN de NOESY apoiam a afirmação através dos seus sinais cruzados. Complementarmente, obteve-se uma constante de associação de  $43 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  através da espectroscopia de fluorescência, algo que é coerente com as constantes de associação obtidas através das outras técnicas.

Os picos cruzados observados no espectro 2D-NOESY e, também, os cálculos de DFT que preveem a entrada do anel aromático da Gly-L-Phe dentro da cavidade de  $\beta$ -CD. A geometria otimizada do complexo está de acordo com a observação dos picos cruzados NOE para os prótons do grupo fenil. As interações intermoleculares peptídico /  $\beta$ -CD são, também, relevantes, como indicado através da DFT, contribuindo para a alta estabilidade do complexo.

Para o segundo sistema estudado (Gly-L-Phe + SDS + H<sub>2</sub>O), determinaram-se os coeficientes de difusão inferior e superior à CMC de SDS. Para valores inferiores à CMC de SDS, pode verificar-se que o coeficiente de difusão principal,  $D_{11}$ , diminui com o aumento da fração de soluto de Gly-L-Phe. Os coeficientes de difusão secundários,  $D_{12}$  e  $D_{21}$ , são diferentes de zero, sugerindo uma interação entre os solutos. Através destes dados, é possível que o peptídeo esteja encapsulado na micela de SDS.

A constante de associação verifica-se para valores inferiores a  $100 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . Para valores superiores à CMC de SDS, os coeficientes de difusão principais,  $D_{11}$  e  $D_{22}$ ,

diminuem com o aumento da fração molares de soluto de Gly-L-Phe. A constante de associação não foi possível estimar para valores superiores à CMC de SDS. A partir dos espectros de RMN, verificam-se modificações dos sinais do anel aromático de Gly-L-Phe e, também, dos sinais do SDS. Estas modificações é mais acentuadas para concentrações de SDS acima da CMC, sugerem o estabelecimento de interações hidrofóbicas entre o anel aromático do peptídeo e a cadeia hidrofóbica do SDS e a sua provável inclusão nas micelas, de acordo com os gráficos de Job obtidos através da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  que indica uma estequiometria da interação de 1 : 1. O valor estimado para a contante de associação foi de  $30 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , para valores de concentração superiores à CMC de SDS. Através da espectroscopia de fluorescência, não foi possível calcular a constante de associação.

Com base no trabalho escrito e nos resultados estabelecidos, é possível sugerir que a  $\beta$ -CD é o melhor transportador para a Gly-L-Phe do que o SDS dado que apresentou um valor para a constante de associação superior.

## Bibliografia

[1] Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018) Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26 (10), 2700-2707.

doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052

[2] Llano, D. G., & Sánchez, C. P. (2003) Peptides. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Academic Press, 4468-4473.

ISBN: 978-0-12-227055-0

[3] Puškarić, A., Halasz, I., Gredičak, M., Palčić, A., & Bronić, J. (2016) Synthesis and structure characterization of zinc and cadmium dipeptide coordination polymers. *New J. Chem*, 40, 4252–4257.

doi: 10.1039/C5NJ03001C

[4] Luiz, M.T. B., Szpoganicz, B., Rizzoto, M., Martell, A.E., & Basallote, M.G. (1997) Equilibrium studies and molecular recognition in the glycylglycine, dl-alanyl-dl-alanine and glycyl-l-leucine Cu(II)-1,4,7,13,16,19-hexaaza-10,22-dioxacyclotetacosane complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 254, 345–351.

doi: 10.1016/S0020-1693(96)05187-0

[5] Sharifi, S., Nori-shargh, D., & Bahadory, A. (2007) Complexes of thallium(I) and cadmium(II) with dipeptides of L-phenylalanyl-glycine and Glycyl-L-phenylalanine. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 1011–1016.

doi: 10.1590/S0103-50532007000500020

[6] Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo A. C., Liang, K., Vazquez-Fresno, R., ... , & Scalbert, A. (2018) HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018, *Nucleic Acids Research*, 46, 608-617.

doi: 10.1093/nar/gkx1089

[7] Santos, J. P. F. B. C. (2016) Modificações conformacionais em soluções aquosas de aminoácidos e de ácido polimetacrílico induzidas por salto de pH. *Tese de Mestrado*. Universidade de Coimbra: Coimbra.

[8] Kiani, F., Rostami, A. A., Sharifi, S., Bahadori, A., & Chaichi, M. J. (2010) Determination of Acidic Dissociation Constants of Glycine, Valine, Phenylalanine, Glycylvaline, and Glycylphenylalanine in Water Using ab Initio Methods. *Journal of Chemical & Engineering*, 55 (8), 2732-2740.

doi: 10.1021/je900975s

- [9] Lehn, Jean-Marie (1988) *Angewandte Chemie International Edition* Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture), 27, 1, 89-112.
- [10] Lehn, Jean-Marie Lehn (1995) *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley.  
doi:10.1002/3527607439
- [11] Silva, L. M. C. (2005) Compostos de inclusão em ciclodextrina- $\beta$  a humidades relativas definidas. *Tese de Doutoramento*. Universidade de Aveiro: Aveiro.
- [12] Steed, J. W., & Atwood, J. L. (2009) *Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 2.  
ISBN: 978-0-470-51234-0
- [13] Shimizu, S., Shirakawa, S., Suzuki, & T., Sasaki, Y. (2001) Water-soluble calixarenes as new inverse phase-transfer catalysts. Their application to aldol-type condensation and Michael addition reactions in water. *Tetrahedron*, 57, 6169–6173.  
doi: 10.1016/S0040-4020(01)00572-5.
- [14] Kubo, Y. (1999) Binaphthyl-appended chromogenic receptors: Synthesis and application to their colorimetric recognition of amines. *Synlett*, 161–174.  
doi: 10.1055/s-1999-2568
- [15] Buschmann, H., Mutihac, L., & Schollmeyer, E. (2003) Complexation of Some Amino Acids and Peptides by p-Sulfonatocalix[4]arene and Hexasodium p-Sulfonatocalix[6]arene in Aqueous Solution. *J. Incl. Phenom*, 46, 133–137.  
doi: 10.1023/A:1026361017680.
- [16] Cram, D. J., & Cram, J. M. (1974) *Host-Guest Chemistry*. 183 (4127), 803-809.  
doi: 10.1126/science.183.4127.803
- [17] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014) *Lehninger principles of biochemistry*. W.H.Freeman and Company (6<sup>th</sup> ed.). New York.  
ISBN: 978-1429234146
- [18] Hedges, A. (2009) Starch. In *Cyclodextrins Properties and Applications*, 3<sup>th</sup> Ed. Elsevier, 833-848.  
doi: 10.1016/B978-0-12-746275-2.00022-7
- [19] Valente, A.J.M., & Söderman, O. (2014) The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 205, 156-176.  
doi: 10.1016/j.cis.2013.08.001.
- [20] Ramos, M.L., Dias, D., Justino, L.L.G., Verissimo, L.M.P., Valente, A.J.M., Estes, M.A., Ribeiro, A.C.F., Leais, D.G., Pina, J., Cabral, A.M.T.D.P.V., & Rodrigo, M.M.

(2019) Interactions between glycyl-L-phenylalanine and  $\beta$ -cyclodextrin from diffusion, spectroscopic and computational studies. Manuscrito aceite para publicação na *J. Mol. Liquids*.

[21] Stefan, M.I., Le Novère, N. (2013) Cooperative binding. *PLOS Computational Biology*, 9, 1-6.

doi: 10.1371/journal.pcbi.1003106

[22] Ribeiro, A. C. F., Santos, C. I. A. V., Lobo, V. M. M., Cabral, A. M. T. D. P. V., Veiga, F. J. B., & Estesó, M. A. (2009) Diffusion coefficients of the ternary system  $\beta$ -cyclodextrin + caffeine + water at 298.15K. *J. Chem. Eng. Data*, 54, 115-117.

doi: 10.1021/je800728b

[23] Barros, M.C.F., Ramos, M. L., Burrows, H.D., Estesó, M.A., Leaist, D.G., Ribeiro, A.C.F. (2015) Ternary mutual diffusion coefficients of aqueous {l-dopa (1)+ $\beta$ -CD (2)} solutions at T=298.15K. *J. Chem. Thermodyn*, 90, 169–173.

doi:10.1016/j.jct.2015.06.022.

[24] Azevedo, E. F. G. (2003) Difusão de eletrólitos em soluções aquosas na ausência e na presença de sacarose e de  $\beta$ -ciclodextrina. *Tese de Mestrado*. Universidade de Coimbra: Coimbra.

[25] Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., & Lindman, Bjorn. (2003) Surfactants and Polymers. In *Aqueous Solution* (2<sup>nd</sup> ed.). John Wiley & Sons, Ltd., 39-66.

ISBN: 0-471-49883-1

[26] Wołowicz, A., & Staszak, K. (2020) Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions. *Journal of Molecular Liquids*, 299, 1-41.

doi: 10.1016/j.molliq.2019.112170

[27] Iwasawa, Y., Oyama, N., & Kunieda, H. (2001) Studies in Surface Science and Catalysis, 132, 141-144.

doi: 10.1016/S0167-2991(01)82054-1

[28] Klang, V., & Matsko, N. B. (2014) Electron Microscopy of Pharmaceutical Systems. In *Advances in Imaging and Electron Physics* (181<sup>th</sup> ed.). Elsevier, 125-208

ISBN: 978-0-12-800091-5

[29] Machlin, E. S. (2007) Thermodynamics of Micelles. In *An Introduction to Aspects of Thermodynamics and Kinetics Relevant to Materials Science* (3<sup>rd</sup> ed.) Elsevier, 833-848.

ISBN: 978-0-08-046615-6

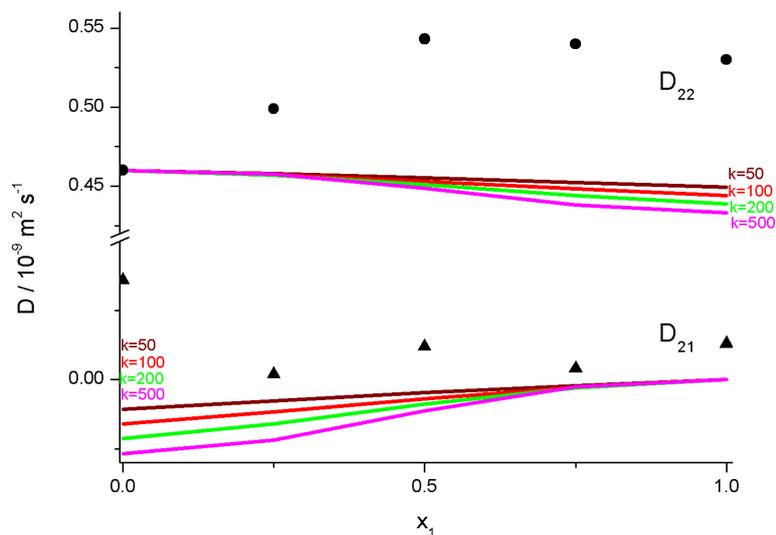
- [30] Ribeiro, A. C. F., Lobo, V. M. M., Azevedo, E. F. G., Miguel, M. da G., & Burrows, H. D. (2001) Diffusion coefficients of sodium dodecylsulfate in aqueous solutions of sucrose and in aqueous solutions. *Journal of molecular liquids*, 94, 193-201.
- [31] Khan, A., & Shah, S. (2008). Determination of critical micelle concentration (CMC) of sodium dodecyl sulfate (SDS) and the effect of low concentration of pyrene on its CMC using origin software. *Journal of the chemical society of Pakistan*, 30, 186-191.  
doi: 10.1016/S0167-7322(01)00268-9
- [32] Ribeiro, A.C.F., Lobo, V. M. M., Azevedo, E. F. G., Miguel, M. da G., & Burrows, H. D. (2001) Diffusion coefficients of sodium dodecylsulfate in aqueous solutions of sucrose and in aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*, 94, 193-201.  
doi: 10.1016/S0167-7322(01)00268-9
- [33] Burrows, H. D., Lobo, V. M. M., Pina, J., Ramos, M. L., Seixas de Melo, J., Valente, A. J. M., Tapia, M. J. M., Pradhan, S., Shcherf, U., Hintschich, S. I., Rothe, C., & Monkman, A. P. (2005) Interactions between surfactants and {1,4-phenylene-[9,9-bis(4-phenoxy-butylsulfonate)]fluorene-2,7-diyl}. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 270, 61-66.  
doi: 10.1016/j.colsurfa.2005.05.037
- [34] Ribeiro, A.C.F., Veríssimo, L.M.P., Santos, C.I.A.V., Cabral, A.M.T.D.P.V., Veiga, F.J.B., Estes, M.A. (2013) Effect of HP- $\beta$ -cyclodextrin in the diffusion behaviour of hydrocortisone in aqueous solutions at T = 298.15 K. *Intern. J. Pharm.*, 441, 1-2, 352-355.  
doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.021
- [35] Glasoe, P.K., & Long, F.A. (1960) Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem*, 64, 188–190.  
doi: 10.1021/j100830a521
- [36] Job, P. (1928) Studies on the formation of complex minerals in solution and on their stability. *Ann. Chim. Fr.*, 9, 113–203.
- [37] Gil, V.M.S., & Oliveira, N.C. (1990) On the use of the method of continuous variations. *J. Chem. Educ.*, 67, 473-478.  
doi: 10.1021/ed067p473.
- [38] Ramos, M. L. (1998). Estudo da complexação de ácidos derivados de açúcares com oxoiões de Mo(VI) e W(VI) por RMN multinuclear. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra: Coimbra.
- [39] The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). Disponível online em <https://www.ccdc.cam.ac.uk/>.

- [40] Becke, A.D. (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 38, 3098–3100.  
doi: 10.1103/PhysRevA.38.3098
- [41] Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37, 785–789.  
doi: 10.1103/PhysRevB.37.785
- [42] Vosko, S., Wilk, L., & Nusair, M. (1980) Accurate Spin-Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin-Density Calculations - A Critical Analysis. *Can. J. Phys.*, 58, 1200–1211.  
doi: 10.1139/p80-159
- [43] Miertuš, S., Scrocco, E., & Tomasi, J. (1981) Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.*, 55, 117–129.  
doi: 10.1016/0301-0104(81)85090-2
- [44] Tomasi, J., Mennucci, B., & Cammi, R. (2005) Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.*, 105, 2999–3094.  
doi: 10.1021/cr9904009
- [45] Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G., Nakatsuji, H., et al. (2016) Gaussian 16.
- [46] Valente, A. (1998). Difusão de eletrólitos em solução aquosa e em hidrogéis com diferentes graus de hidrofiliçidade. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra: Coimbra.
- [47] Callendar, R., & Leaist, D.G. (2006) Diffusion Coefficients for Binary, Ternary, and Polydisperse Solutions from Peak-Width Analysis of Taylor Dispersion Profiles. *J Solution Chem*, 35, 353–379.  
doi: 10.1007/s10953-005-9000-2
- [48] Fick, A. (1855) Ueber Diffusion. *Annalen der Physik*, 59.  
doi: 10.1002/andp.18551700105
- [49] Verissimo, L., Ramos, M., Justino, L., Burrows, H., Cruz, P.F., Cabral, A., Veiga, F., Estes, M., & Ribeiro, A. (2018) The structure and diffusion behaviour of the 1:1 copper(II) complex of ethambutol in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids*, 262, 63-70.  
doi: 262. 10.1016/j.molliq.2018.04.039

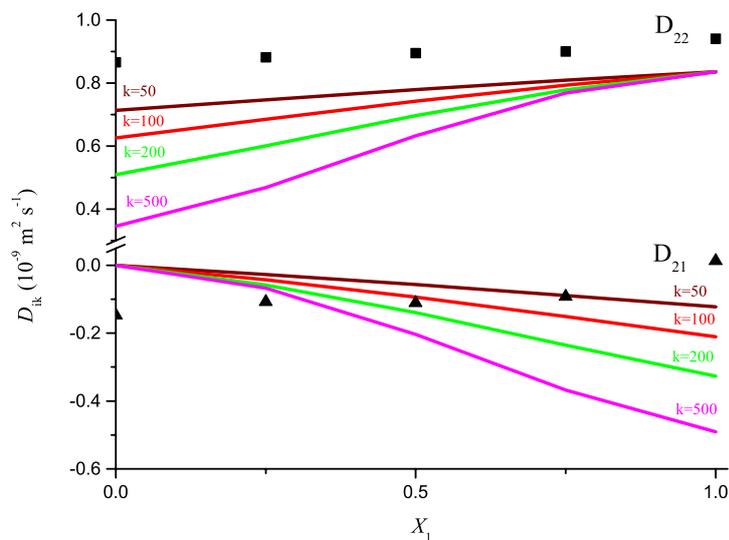
- [50] Lu, R., & Leaist, D. G. (1998) Comparison of the Diffusion of Aqueous Glycine Hydrochloride and Aqueous Glycine. *Journal of Solution Chemistry*, 27, 285–297.  
doi: 10.1023/A:1022619430507
- [51] Umecky, T., Ehara, K., Omori, S., Kuga, T., Yui, K., & Funazukuri, T. (2019) Binary Diffusion Coefficients of Aqueous Phenylalanine, Tyrosine Isomers, and Aminobutyric Acids at Infinitesimal Concentration and Temperatures from (293.2 to 333.2) K. *J. Chem. Eng. Data X*, 58, 7, 1909–1917.  
doi: 10.1021/je3012698
- [52] Ribeiro, A. C. F., Leaist, D. G., Estes, M. A., Lobo, V. M. M., Valente, A. J. M., Santos, C. I. A. V., Cabral, A. M. T. D. P. V., & Veiga, F. J. B. (2006) Binary Mutual Diffusion Coefficients of Aqueous Solutions of  $\beta$ -Cyclodextrin at Temperatures from 298.15 to 312.15 K. *Journal of Chemical & Engineering*, 51 (4), 1368-1371.  
doi: 10.1021/je060092t
- [53] Paduano, L., Sartorio, R., & Vitagliano, V. (1998) Diffusion Coefficients of the Ternary System  $\alpha$ -Cyclodextrin–Sodium Benzenesulfonate–Water at 25 °C: The Effect of Chemical Equilibrium and Complex Formation on the Diffusion Coefficients of a Ternary System. *J. Phys. Chem. B.*, 102, 5023–5028.  
doi:10.1021/jp972356b
- [54] Sompornpisut, P., Deechalao, N., & Vongsvivut, J. (2002) An inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin-L-phenylalanine:  $^1\text{H}$  NMR and molecular docking studies. *Science Asia*, 28, 263-270.  
doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.263
- [55] Upadhyay, S.K., & Kumar, G. (2009) NMR and molecular modelling studies on the interaction of fluconazole with  $\beta$ -cyclodextrin. *Chem. Cent. J.*, 3, 9.  
doi: 10.1186/1752-153X-3-9
- [56] Butts, C.P., Jones, C.R., Towers, E.C., Flynn, J.L., Appleby, L., & Barron, N.J. (2011) Interproton distance determinations by NOE – surprising accuracy and precision in a rigid organic molecule. *Org. Biomol. Chem.*, 9, 177–184.  
doi: 10.1039/C0OB00479K
- [57] Rodrigo, M.M., Ribeiro, A.C.F., Verissimo, L.M.P., Estes, M.A., & Leaist, D.G. (2018) Coupled diffusion in aqueous citric acid + calcium citrate solutions. *J. Chem. Thermodyn*, 131, 314–321.  
doi: 10.1016/j.jet.2018.11.003
- [58] Gil, V. M. S., & Geraldês, C. F. G. C. (2002). *Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações* (2<sup>nd</sup> ed.). Fundação Calouste Gulbenkian, 2, 3-344.

- [59] Lehmann, L., & Kleinpeter, E. (1991)  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy as a probe of intermolecular interactions in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion compounds. *J. Incl. Phe.*, 27, 232.  
doi: doi.org/10.1007/BF01066207
- [60] T. Tanaka. (2012) Experimental Methods in Polymer Science: Modern Methods. In *Polymer Research and Technology*. New York: Academic Press, 155–260.  
ISBN: 9780126832655
- [61] Benesi, H.A., & Hildebrand, J.H. (1949) A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2703–2707.  
doi: 10.1021/ja01176a030
- [62] Ribeiro, A.C.F., Lobo, V.M.M., Azevedo, E.F.G., Miguel, M. da G., & Burrows, H.D. (2003) Diffusion coefficients of sodium dodecylsulfate in aqueous solutions and in aqueous solutions of  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*, 102, 285-292.  
doi: 10.1016/S0167-7322(02)00069-7
- [63] Pereira, R. F.P., Valente, A. J.M., & Burrows, H. D. (2014) The interaction of long chain sodium carboxylates and sodium dodecylsulfate with lead(II) ions in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 414, 66-72.  
doi: 10.1016/j.jcis.2013.09.051
- [64] Pereira, R. F. P., Tapia, M. J. T., Valente, A. J. M., & Burrows, H. D. (2012) Effect of Metal Ion Hydration on the Interaction between Sodium Carboxylates and Aluminum(III) or Chromium(III) Ions in Aqueous Solution. *Langmuir*, 28, 168-177.  
doi: 10.1021/la2034164
- [65] Deaton, K.R., Feyen, E.A., Nkulabi, H.J., & Morris, K.F. (2001) Pulsed-field gradient NMR study of sodium dodecylsulfate micelle–peptide association. *Magn. Reson. Chem*, 39, 276–282.  
doi: 10.1002/mrc.847
- [66] Kobayashi, N., Muranaka, A, & Mack, J. (2012) Cyclodextrin Inclusion Compounds. In *Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy for Organic Chemists*. Royal Society of Chemistry, 93.  
ISBN: 978-1-84755-869-5

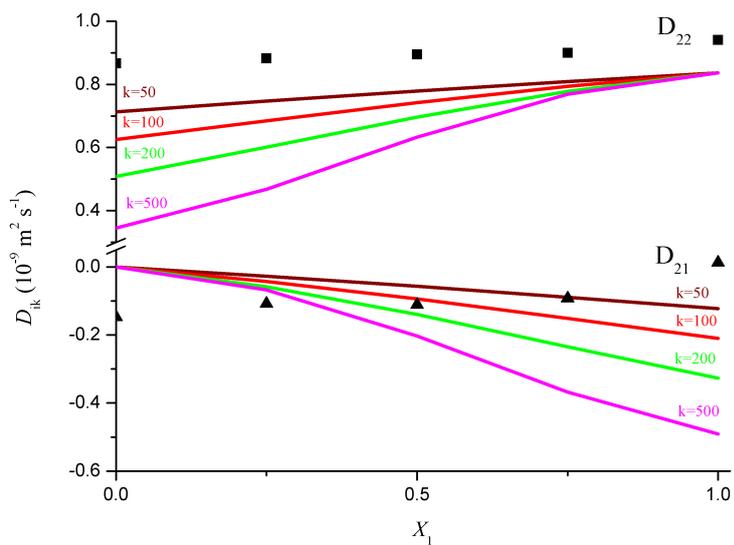
## Apêndice



**Figura A.1** - Coeficientes de difusão mútua ternários do sistema Gly-L-Phe +  $\beta$ -CD vs. a fração de soluto de Gly-L-Phe,  $X_1$ , a 298,15 K. Os valores de  $D_{ij}$  foram previstos pelas Equações (3.10 e 3.11) para os diferentes valores de  $K$  (Equação 3.7). Valores medidos: ● ( $D_{22}$ ); ▲ ( $D_{21}$ ).



**Figura A.2** - Coeficientes de difusão mútua ternários do sistema Gly-L-Phe + SDS vs. a fração de soluto de Gly-L-Phe,  $X_1$ , para valores de concentração abaixo da CMC do SDS, a 298,15 K. Os valores de  $D_{ij}$  foram previstos pelas Equações (3.10 e 3.11) para os diferentes valores de  $K$  (Equação 3.7). Valores medidos: ● ( $D_{22}$ ); ▲ ( $D_{21}$ ).



**Figura A.3** - Coeficientes de difusão mútua ternários do sistema Gly-L-Phe + SDS vs. a fração de soluto de Gly-L-Phe,  $X_1$ , para valores de concentração acima da CMC do SDS, a 298,15 K. Os valores de  $D_{ij}$  foram previstos pelas Equações (3.10 e 3.11) para os diferentes valores de  $K$  (Equação 3.7). Valores medidos:  $\bullet$  ( $D_{22}$ );  $\blacktriangle$  ( $D_{21}$ ).