

PRÁCTICA I.8

OBTENÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO

INCLUSION COMPLEX OF DIAZEPAM WITH CYCLODEXTRINS IN SOLID PHASE

Madalena M. M. Pinto e Honorina M. M. Cidade

Laboratório de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia,

Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164 4050-047 Porto,

Portugal

E-mail: madalena@ff.up.pt; hcidade@ff.up.pt

INTRODUÇÃO GERAL

O reconhecimento molecular desempenha um papel crucial em vários processos vitais, nomeadamente síntese proteica, catálise enzimática, replicação do ADN, respostas imunitárias, replicação viral e actividade de fármacos.

A mimetização das condições necessárias ao reconhecimento molecular por compostos que não entidades biológicas, mas que a elas se assemelham em estrutura e funções, leva ao designado reconhecimento molecular artificial [1].

Para uma determinada função biológica ocorrer, a nível de receptores ou enzimas, há a formação de um complexo “pequena molécula-macromolécula”, uma nova entidade química, envolvendo a formação de interacções de natureza variada (hidrofóbicas, de van der Waals, dipolo-dipolo, hidrogénio, transferência de carga, etc.). Também no reconhecimento molecular artificial se forma um complexo e se tal formação implicar a entrada da pequena molécula, pelo menos parcialmente, para o interior da macromolécula não biológica a nova entidade química formada é designada de “complexo de inclusão”.

Um dos exemplos interessantes de reconhecimento molecular artificial é a formação de complexos de inclusão entre moléculas variadas, nomeadamente fármacos, e as ciclodextrinas. Estas últimas são macrociclos naturais, constituídas por um número variável de unidades de α -D-(+)-glucopiranosose resultantes da conversão enzimática do amido. Conforme o número de resíduos constituintes é de 6, 7, ou 8 unidades de glucose, designam-se por α -, β - e γ -ciclodextrinas, respectivamente. Estes compostos exibem uma forma muito peculiar, muitas vezes designada de “cesto” ou de “donut”, embora com um bordo mais largo que o outro. O interior das ciclodextrinas é de natureza hidrofóbica enquanto os bordos e o exterior, contendo grupos hidroxilo, conferem um carácter hidrofílico a esse ambiente. As interacções possíveis entre a pequena molécula e a ciclodextrina, embora dependendo da funcionalidade da pequena molécula, são geralmente de natureza hidrofóbica com o interior da ciclodextrina e de ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo [2].

A metodologia utilizada na preparação de complexos de inclusão inclui a obtenção em fase sólida ou em solução, podendo utilizar-se vários métodos na detecção da formação do complexo, nomeadamente a espectrofotometria no IV e no UV/vis, RMN de ^1H e ^{13}C , difracção de raios X e dicroísmo circular [3–8].

OBJECTIVO GERAL

Preparar complexos de inclusão do diazepam com três ciclodextrinas: α -, β - e γ -ciclodextrinas e averiguar com qual(ais) da(s) ciclodextrina(s) ocorre a formação de complexos de inclusão.

FUNDAMENTO

No presente trabalho a obtenção do complexo de diazepam com as ciclodextrinas é baseado no método em fase sólida. A detecção da formação de complexos de inclusão é efectuada por espectrofotometria no IV, por comparação dos espectros das duas espécies moleculares separadamente, da respectiva mistura física e do produto da inclusão. As alterações previstas no espectro no IV do complexo, relativamente ao diazepam não incluído, far-se-ão sentir principalmente na zona de absorção do grupo carbonilo, devido ao estabelecimento de ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo das ciclodextrinas.

TÉCNICA (REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA BÁSICA: [3])

Pese, rigorosamente, cerca de 5,7 mg de diazepam, 29,2 mg de α -ciclodextrina, 34,0 mg de β -ciclodextrina, e 38,9 mg de γ -ciclodextrina.

Prepare as amostras seguintes:

- a) Mistura física: Misture em almofariz de ágata, sem triturar, o diazepam com cada uma das ciclodextrinas, nas proporções indicadas anteriormente. Reserve metade da mistura física para posterior análise.
- b) Produto da inclusão: Triture energicamente a restante quantidade da mistura preparada em a) durante 10 minutos.
- c) Registe o espectro no IV (KBr) das amostras seguintes:
 - Diazepam;
 - α -, β -, e γ -ciclodextrinas;
 - Misturas físicas do diazepam com cada uma das α -, β -, e γ -ciclodextrinas obtidas em a)
 - Produtos de inclusão entre o diazepam e cada uma das α -, β -, e γ -ciclodextrinas, obtidos em b)
- d) Compare os espectros no IV do diazepam e das amostras indicadas em a) e b). Verifique com qual(ais) ciclodextrina(s) ocorreu formação do complexo de inclusão.

Reagentes e equipamento

Os espectros no IV foram obtidos num espectrofotómetro ATI Mattson Genesis Series FTIR, em discos de brometo de potássio (Uvasol, Merck) a 1 %.

Os reagentes foram adquiridos nas seguintes firmas:

Diazepam - Sigma.; γ -ciclodextrina Fluka; α - e β -ciclodextrinas Tokyo TCI Kasei.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra a porção dos espectros no IV na zona do carbonilo para as misturas físicas e produtos da inclusão do diazepam com as α -, β - e γ -ciclodextrinas.

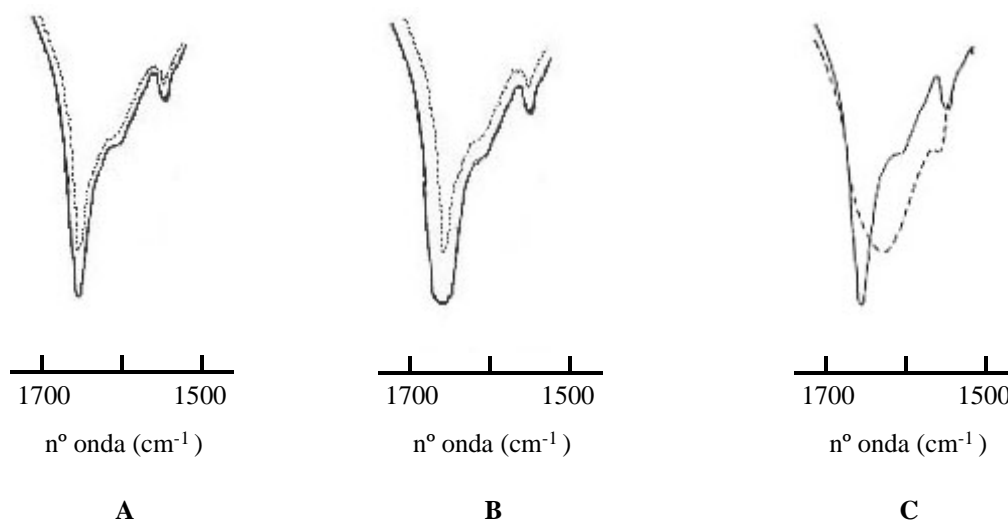


Fig. 1 Porções dos espectros no IV das misturas físicas (linha contínua) e produtos de inclusão (tracejado) do diazepam com a α -ciclodextrina (**A**), β -ciclodextrina (**B**) e γ -ciclodextrina (**C**).

A comparação dos espectros evidencia um deslocamento da banda correspondente ao grupo carbonilo do produto da inclusão do diazepam com a γ -ciclodextrina, não se observando o mesmo efeito com as restantes ciclodextrinas. De acordo com estes resultados pode concluir-se que apenas ocorre formação de complexo de inclusão com a γ -ciclodextrina.

REFERÊNCIAS

1. P. D. Beer, P. A. Gale, D. K. Smith. *Supramolecular Chemistry*, pp. 57 and 92, Oxford University Press, New York (1999).
2. <<http://www.betadexcyclodextrin.com/html/properties.html> (07/01/2001)>.
3. K. Uekama, S. Narisawa, F. Hirayama, M. Otagiri. *Int. J. Pharm.* **16**, 327 (1983).
4. I. C. R. Galán, R. López, A. C. Galán. *Ciência Técnica* **6**, 366 (1987).
5. K. Terada, K. Yamamoto, Y. Nakai. *Expo-Congr. Int. Technol. Pharm.*, 3rd, **5**, 246 (1983).
6. K. Uekama, F. Hirayama, A. Fujise, M. Otagiri, K. Inaba, H. Saito. *J. Pharm. Sci.* **73**, 382 (1984).
7. A. L. Thakkar, P. B. Kuehn, J. H. Perrin, W. L. Wilham. *J. Pharm. Sci.* **61**, 1841 (1972).
8. C. P. Rossel, J. S. Carreño, M. R. R-Baeza, J. B. Alderete. *Quím. Nova* **23**, 749 (2000).

OBJECTIVOS PEDAGÓGICOS

Tempo de execução laboratorial: 2 horas

Disciplina: Química Farmacêutica Orgânica I do actual curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal e destinada a Estudantes do 2º ano.

Com a criação deste trabalho laboratorial pretende-se que os Estudantes façam uma conexão com a matéria teórica, no que se refere à intervenção do reconhecimento molecular no mecanismo de acção dos fármacos a nível molecular. Na medida em que as ciclodextrinas podem mimetizar o local activo de enzimas e receptores clássicos, será ainda fomentada a discussão relativa às interacções intervenientes nesses fenómenos. Utilizando uma metodologia simples, e comum a praticamente todos os laboratórios de Química, este trabalho permitirá ainda alargar a discussão a aspectos relacionados com a aplicação da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas, nomeadamente protecção de fármacos da acção do oxigénio e da luz, aumento da hidrofília de certas moléculas lipossolúveis, mascarar o sabor desagradável de medicamentos de uso por via oral, etc.

Madalena M. M. Pinto

madalena@ff.up.pt

Honorina M. M. Cidade

hcidade@ff.up.pt

O trabalho em laboratórios de Química Medicinal requer cuidado e uso de boas práticas de laboratório. O manuseio de instrumentos eletrónicos, a utilização de calor, o uso de vidrarias e de solventes não representam problemas especiais, desde que sejam seguidas, de forma cuidadosa, as instruções do supervisor.

Este documento foi supervisionado pelo Prof. MADALENA PINTO (madalena@ff.up.pt) que informou sobre a inexistência de riscos específicos na realização deste exercício (e.g., toxicidade, inflamabilidade, riscos de explosão, etc.), fora aqueles comuns a execução de toda e qualquer prática em laboratórios de Química Medicinal.

Se seu exercício ou prática envolver qualquer risco específico, favor informar ao Editor.

EXERCISE I.8

INCLUSION COMPLEX OF DIAZEPAM WITH CYCLODEXTRINS IN SOLID PHASE

Madalena Pinto and Honorina Cidade

Faculdade de Farmácia do Porto, Laboratório de Química Orgânica,

Rua Aníbal Cunha, 164 4050-047 Porto, Portugal

E-mail: madalena@ff.up.pt

INTRODUCTION

Molecular recognition plays an important role in several vital processes, such as protein synthesis, enzymatic catalysis, DNA replication, viral replication, and drug action. On the other hand, artificial molecular recognition can result from a mimetization of the necessary conditions for molecular recognition by nonbiological compounds with structure and functions similar to the biological counterparts [1]. The formation of a complex of the “small molecule-macromolecule”, involving several interactions (hydrophobic, van der Waals, dipole-dipole, hydrogen bonding, charge transfer, etc.), is necessary for the occurrence of a biological function. The formation of such a complex also occurs in artificial recognition, and if there is an entrance of the small molecule into the cavity of the nonbiological macromolecule the new chemical entity is called “inclusion complex”. Examples of artificial molecular recognition include the formation of inclusion complexes between drugs and cyclodextrins, naturally occurring macrocyclic compounds composed of α -D-(+)-glucopyranose units, obtained by enzymatic degradation of starch. There are three particularly important cyclodextrins: α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, and γ -cyclodextrin, containing 6, 7, and 8 α -D-(+)-glucopyranose units, respectively. The shape of these compounds is very peculiar, frequently called a “basket” or a “doughnut” with one rim larger than the other. One rim of the cavity possesses secondary hydroxyl groups, whilst the other rim is

functionalized with primary hydroxyl groups. The interior of the cavity is nonpolar, and the external surface and the rims are polar. The interaction of the small molecules with the cavity of cyclodextrins is normally hydrophobic. However, the substituents of the small molecules can also form a hydrogen bonding with the rims of cyclodextrin molecules [2].

Inclusion complexes can be made in an aqueous solution or in a solid phase, and can be analyzed by spectrophotometric methods (IR, UV), nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C), X-ray diffractometry, and circular dichroism [3–8].

AIM

Preparation of the inclusion complexes of diazepam using α -, β -, and γ -cyclodextrins by solid phase.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Diazepam was obtained from Sigma Chemical Co., γ -cyclodextrin was purchased from Fluka, α - and β -cyclodextrins were obtained from Tokyo TCI Kasei.

IR spectra were recorded in ATI Mattson Genesis series FTIR, in 1 % potassium bromide disks (Uvasol, Merck).

Methods [3]

Weigh 5.7 mg of diazepam, 29.2 mg of α -cyclodextrin, 34.0 mg of β -cyclodextrin, and 38.9 mg of γ -cyclodextrin.

Physical mixtures: mix appropriate amount of each cyclodextrin with diazepam. Record the IR spectra.

Inclusion complexes: Grind the remaining amount of physical mixture in quartz mortar during 10 min and then record the IR spectra of the complexes.

RESULTS AND DISCUSSION

Inclusion complexes of diazepam are formed by the solid-phase method. IR spectrophotometry is used to determine which cyclodextrin inclusion complex is formed. Figure 1 shows the IR spectra of the physical mixtures and the inclusion products of diazepam with α -, β -, and γ -cyclodextrins in the carbonyl stretching region.

In the case of γ -cyclodextrin inclusion complex, the 1685 cm^{-1} band was shifted to 1665 cm^{-1} , suggesting the formation of the intermolecular hydrogen bonding between diazepam and γ -cyclodextrin. The IR spectra showed that the inclusion complexes with the diazepam and γ -cyclodextrins were not formed.

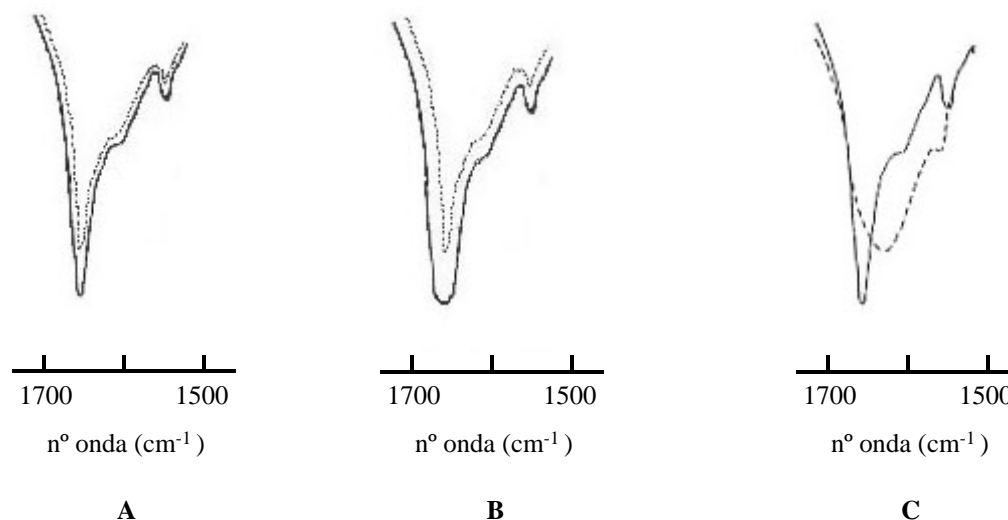


Fig. 1 IR spectra of diazepam- α -cyclodextrin (**A**), diazepam- β -cyclodextrin (**B**), and diazepam- γ -cyclodextrin (**C**) physical mixtures (—) and inclusion complexes (---)

REFERENCES

1. P. D. Beer, P. A. Gale, D. K. Smith. *Supramolecular Chemistry*, pp. 57 and 92, Oxford University Press, New York (1999).
2. <<http://www.betadexcyclodextrin.com/html/properties.html> (07/01/2001)>.
3. K. Uekama, S. Narisawa, F. Hirayama, M. Otagiri. *Int. J. Pharm.* **16**, 327 (1983).
4. I. C. R. Galán, R. López, A. C. Galán. *Ciência Técnica* **6**, 366 (1987).
5. K. Terada, K. Yamamoto, Y. Nakai. *Expo-Congr. Int. Technol. Pharm.*, 3rd, **5**, 246 (1983).
6. K. Uekama, F. Hirayama, A. Fujise, M. Otagiri, K. Inaba, H. Saito. *J. Pharm. Sci.* **73**, 382 (1984).
7. A. L. Thakkar, P. B. Kuehn, J. H. Perrin, W. L. Wilham. *J. Pharm. Sci.* **61**, 1841 (1972).
8. C. P. Rossel, J. S. Carreño, M. R. R-Baeza, J. B. Alderete. *Quím. Nova* **23**, 749 (2000).

Madalena Pinto
madalena@ff.up.pt

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. MADALENA PINTO (madalena@ff.up.pt) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.