

LUCAS MICQUÉIAS ARANTES

**ESTUDOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CALIX[N]ARENOS E ANESTÉSICOS
LOCAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A662e
2009

Arantes, Lucas Micquéias, 1983-

Estudos das interações entre calix[n]arenos e anestésicos locais por ressonância magnética nuclear de hidrogênio / Lucas Micquéias Arantes. – Viçosa, MG, 2009. xv, 76f. : il ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sergio Antonio Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-76

1. Calixarenos. 2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. 3. Anestésicos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 547.7

LUCAS MICQUÉIAS ARANTES

**ESTUDOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CALIX[N]ARENOS E ANESTÉSICOS
LOCAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2009.

Prof. Márcio José da Silva.
(Coorientador)

Prof. Elson Santiago de Alvarenga.
(Coorientador)

Prof. Antônio Jacinto Demuner.

Prof. Adão Aparecido Sabino.

Prof. Sergio Antonio Fernandes
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha família, meus pais, Hilton e Maria e meus irmãos, Jonas e Marina pelo carinho, pelo incentivo e apoio durante o período de mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a oportunidade de chegar aonde cheguei e por ter sempre guiado meus passos.

Aos meus pais, pela dedicação de uma vida.

Aos meus irmãos, Jonas e Marina pelo apoio e companheirismo.

A minha namorada Poliana pelo carinho e companheirismo durante parte do mestrado.

A todos os meus familiares, por me acompanharem em toda minha caminhada, comemorando e sofrendo junto comigo. Agradeço, principalmente, a todos os momentos em que vocês me fizeram presentes em suas orações.

Ao meu orientador Sergio Antonio Fernandes pela orientação, amizade e pelos conselhos que me permitiram amadurecer profissionalmente.

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos professores Márcio e Elson pela coorientação.

Ao professor José Roberto pelos equipamentos utilizados na pesquisa.

Aos colegas e amigos do laboratório 309, Eder (Nelson), Ricardo (xuxu, menino bão), Filipe (Juca), Simone, Milena (Gasparzinho), Aninha, Paula, Poliana, Lilian pela grande amizade, Eclair (tiririca), Fabiano (menino monstro), Elder, Ricardo (baiano), Leticia, Alexandre (bolinha), Abinei, Milene, pela agradável convivência e ajudando no que foi necessário durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Departamento de Química, Marisa, José Luiz, Fabricio, Tiago, Ricardo Montanari, Katalin, Leandro (xarazito) parceiro de longa caminhada, Elba e a todos que de alguma forma me ajudaram nessa caminhada.

E a todos que se fizeram presentes durante esta caminhada, dando incentivo e força para que eu a concluísse, **MUITO OBRIGADO!**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ESQUEMAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E NOTAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Química Supramolecular.....	1
2 - ANESTÉSICOS LOCAIS.....	2
2.1 - Preparação de anestésicos de longa duração e terapia da dor.....	3
3 - CALIXARENOS, BREVE HISTÓRICO.....	4
3.1 - Síntese de calixarenos.....	6
3.2 – Conformações.....	7
3.3 - Propriedades Físico-Químicas.....	8
3.3.1 – Solubilidade.....	8
3.3.2 - Temperatura de fusão.....	9
3.3.3 - Propriedades Espectroscópicas dos calixarenos.....	10
3.4 - Aplicações de calixarenos na área Biológica.....	10
3.5 - Aplicação da RMN no estudo de complexos supramoleculares.....	11
4 – OBJETIVOS.....	13
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5.1 - Síntese do <i>p</i>-terc-butilcalix[4]areno.....	13

5.2 - Síntese do calix[4]areno.....	17
5.3 - Síntese do ácido <i>p</i> -sulfônico calix[4]areno.....	20
5.4 - Síntese do <i>p-terc</i> -butilcalix[6]areno.....	23
5.5 - Síntese do calix[6]areno.....	27
5.6 - Síntese do ácido <i>p</i> -sulfônico calix[6]areno.....	29
6 – ESTUDOS DA COMPLEXAÇÃO ENTRE CALIXARENOS SULFONADOS E ANESTÉSICOS LOCAIS.....	32
6.1 - Complexo entre o ácido <i>p</i> -sulfônico calix[4]areno e o cloridrato de oxibuprocaína.....	33
6.2 - Complexo entre o ácido <i>p</i> -sulfônico calix[6]areno e o cloridrato de oxibuprocaína.....	38
6.3 - Complexo entre o ácido <i>p</i> -sulfônico calix[4]areno e o cloridrato de tetracaína.....	42
6.4 - Complexo entre o ácido <i>p</i> -sulfônico calix[4]areno e a benzocaína.....	46
6.5 - Complexo entre o ácido <i>p</i> -sulfônico calix[6]areno e a benzocaína.....	51
6.6 - Complexo entre o ácido <i>p</i> -sulfônico calix[4]areno e o cloridrato de proparacaína.....	53
7 – CONCLUSÃO.....	59
8 - PARTE EXPERIMENTAL.....	60
8.1 – Instrumentação e Condições.....	60
8.1.1– Espectroscopia no infravermelho.....	60
8.1.2 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)....	60
8.1.3 – Técnicas unidimensionais.....	61
8.1.4 – Experimentos de nOe (efeito nuclear Overhauser).....	61
8.2 – Preparo das amostras.....	62
8.2.1 - Solventes e reagentes.....	62

8.2.2 – Preparo das amostras para estudo de espectroscopia no infravermelho.....	62
8.2.3 – Preparo das amostras para estudos de RMN de ¹ H.....	62
8.2.4 – Preparo de amostras para estudos de RMN de ¹ H(NOESY).....	63
8.2.5 - Experimentos de titulação.....	63
8.2.5.1 - Estequiometria: Método de Job.....	63
9 – DESCRIÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.....	65
9.1 - Síntese do <i>p-terc</i> -butilcalix[4]areno.....	65
9.2 - Síntese do calix[4]areno.....	67
9.3 - Síntese do ácido <i>p</i> -sulfônico calix[4]areno.....	68
9.4 - Síntese do <i>p-terc</i> -butilcalix[6]areno.....	69
9.5 - Síntese do calix[6]areno.....	70
9.6 - Síntese do ácido <i>p</i> -sulfônico calix[6]areno.....	72
10 - REFERÊNCIAS.....	73
11 – ANEXO.....	76
11.1 - Artigo publicado.....	76
11.1.1 - Proparacaine complexation with β-cyclodextrin and <i>p</i> -sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied ¹ H-NMR approaches <i>Magn. Res. Chem.</i> 2009, 47, 757-763.....	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Calixarenos utilizados como sistemas supramoleculares.
- Figura 2** - Estrutura Química de Anestésicos Locais de uso clínico.
- Figura 3** – Comparação feita por Gutsche devido à semelhança dos calixarenos com a forma de um vaso grego.
- Figura 4** - Conformações adotadas pelo *p-terc*-butilcalix[4]areno.
- Figura 5** – Movimento de inversão de configuração do calix[4]areno.
- Figura 6** - Alguns calixarenos com elevados pontos de fusão.
- Figura 7** - Titulação por RMN de ^1H : **a)** método com variação contínua de um dos componentes e **b)** método de Job.
- Figura 8** - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do *p-terc*-butilcalix[4]areno.
- Figura 9** - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do *p-terc*-butilfenol.
- Figura 10** - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do *p-terc*-butilcalix[4]areno.
- Figura 11** - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00; 25 °C) do *p-terc*-butilcalix[4]areno.
- Figura 12** - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do calix[4]areno.
- Figura 13** - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do calix[4]areno.
- Figura 14** - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00; 25 °C) do calix[4]areno.
- Figura 15** - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.
- Figura 16** - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.
- Figura 17** - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; D_2O ; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.

Figura 18 - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do *p-terc*-butilcalix[6]areno.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do *p-terc*-butilcalix[6]areno.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00; 25 °C) do *p-terc*-butilcalix[6]areno.

Figura 21 - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do calix[6]areno.

Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do calix[6]areno.

Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00; 25 °C) do calix[6]areno.

Figura 24 - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; H_2O ; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

Figura 27 - Anestésicos Locais e sistemas carreadores utilizados nos estudos de RMN de ^1H .

Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a**) cloridrato de oxibuprocaína pura e **b**) complexo oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **7/3**.

Figura 29 - Gráfico da titulação através do método de Job para o complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **7/3**.

Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **7/3**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de oxibuprocaína (20 mmol L^{-1}).

Figura 31 - Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **7/3**.

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a)** cloridrato de oxibuprocaína pura e **b)** complexo oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **7/6**.

Figura 33 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **7/6**.

Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **7/6**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de oxibuprocaína (20 mmol L^{-1}).

Figura 35 - Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **7/6**.

Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a)** cloridrato de tetracaína pura e **b)** complexo do cloridrato de tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **8/3**.

Figura 37 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo cloridrato de tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **8/3**.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **8/3**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de tetracaína. (20 mmol L^{-1}).

Figura 39 - Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **8/3**.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a)** benzocaína pura e **b)** complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **9/3**.

Figura 41 – Curva de titulação através do método de Job para o complexo benzocaína /ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **9/3**.

Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **9/3**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e benzocaína. (20 mmol L^{-1}).

Figura 43 - Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **9/3**.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25°C) **a**) benzocaína pura e **b**) complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **9/6**.

Figura 45 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **9/6**.

Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **9/6**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (40 mmol L^{-1}) e benzocaína. (20 mmol L^{-1}).

Figura 47 - Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **9/6**.

Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25°C) **a**) do cloridrato de proparacaína pura e **b**) complexo cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **10/3**.

Figura 49 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **10/3**.

Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **10/3**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de proparacaína. (20 mmol L^{-1}).

Figura 51 - Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **10/3**.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H do cloridrato de oxibuprocaína puro e do complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

Tabela 2 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H do cloridrato de oxibuprocaína puro e do complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

Tabela 3 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H do cloridrato de tetracaína pura e do complexo cloridrato de tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

Tabela 4 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H da benzocaína pura e do complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

Tabela 5 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H da benzocaína pura e do complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

Tabela 6 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H do cloridrato de proparacaína pura e do complexo cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

Tabela 7 - Tabela de titulação (Método de Job)

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1 – Mecanismo para a formação do *p-terc*-butilcalix[4]areno.

Esquema 2 - Síntese do *p-terc*-butilcalix[4]areno.

Esquema 3 - Síntese do calix[4]areno.

Esquema 4 - Mecanismo para a formação do calix[4]areno.

Esquema 5 - Reação de formação do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.

Esquema 6 - Síntese do *p-terc*-butilcalix[6]areno.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E NOTAS

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultra violeta
IV	Infravermelho
CG	Comatografia gasosa
CG/EM	Comatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ROESY	“rotating frame Overhauser effect spectroscopy” (experimento unidimensional de RMN para avaliar os incrementos dos sinais devido ao efeito Overhauser nas coordenadas girantes)
nOe	“nuclear Overhauser effect”
DOSY	“diffusion Ordered spectroscopy”
sw	largura de varredura (espectral)
T	tesla
WALTZ	sequência de pulso utilizada em RMN para desacoplamento heteronuclear de sinais
T1	Tempo de relaxação longitudinal
at	Tempo de aquisição
δ	Deslocamento químico
B₀	Campo magnético estático de um espectrômetro de RMN
d1	Tempo de espera para reciclagem
Hz	hertz
J	Constante de acoplamento escalar
AL	Anestésico Local
CMC	Concentração micelar crítica
Δδ	Variação de deslocamento químico
TMS	Tetrametilsilano
K_{ap}	constante aparente
%p_{compl}	população complexada
v	número de onda

RESUMO

ARANTES, Lucas Micquéias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009. **Estudos das interações entre calix[n]arenos e anestésicos locais por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.** Orientador: Sergio Antonio Fernandes. Coorientadores: Márcio José da Silva e Elson Santiago de Alvarenga.

Os calixarenos vem merecendo destaque no âmbito da química supramolecular com aplicações em inúmeras áreas. A relativa facilidade com que os calixarenos podem ser sintetizados e posteriormente modificados, juntamente com grande variedade no tamanho da cavidade dos macrociclos, torna-os muito promissores para aplicações como sistemas carreadores de moléculas bioativas. Esta dissertação teve como objetivo principal estudar as interações intermoleculares entre dois calixarenos solúveis em água e quatro anestésicos locais empregando como ferramenta principal RMN de ^1H . Inicialmente foi realizada a síntese de dois calixarenos solúveis em água que posteriormente foram utilizados como sistemas de encapsulamento para anestésicos locais. A estequiometria dos complexos foi determinada utilizando método de Job, e as topologias proposta através de RMN de ^1H (NOESY). A RMN de ^1H mostrou-se uma ferramenta muito importante e eficaz para o estudo das interações de complexos do tipo hóspede-hospedeiro entre calixarenos e anestésicos locais.

ABSTRACT

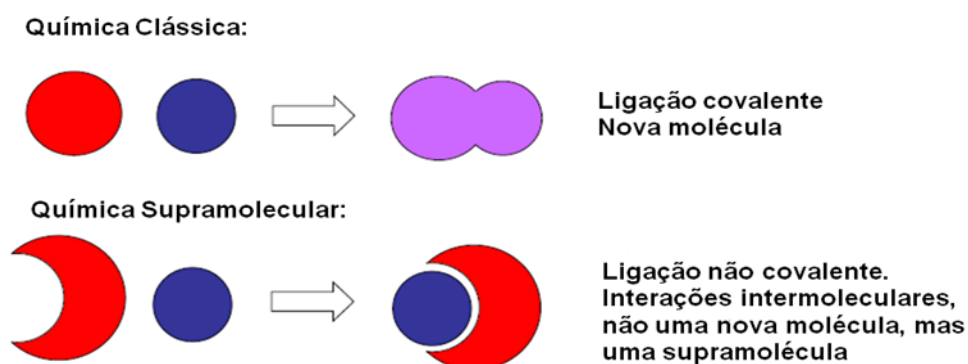
ARANTES, Lucas Micquéias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Studies of interactions between calix[n]arene and local anesthetics by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen.** Adviser: Sergio Antonio Fernandes. Co-advisers: Márcio José da Silva and Elson Santiago de Alvarenga.

The calixarenes are deserving of emphasis within supramolecular chemistry with applications in many areas. The relative ease with which the calixarenes can be synthesized and subsequently modified, with great variety in size of the cavity of macrocycles makes them very promising for applications such as carriers of bioactive molecules. This thesis aims principal study the intermolecular interactions between two water-soluble calixarenes and four local anesthetics using as main tool for ^1H NMR. Initially it was performed the synthesis of two water-soluble calixarenes that were subsequently used as encapsulation systems for local anesthetics. The stoichiometry of the complexes was determined using method of Job, and the topologies proposed by the ^1H NMR (NOESY). The ^1H NMR of a tool shown to be very important and effective when applied in studies of complexes of the type of guest-host calixarenes and local anesthetics.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Química Supramolecular

No fim de 1960, pesquisadores como (Pedersen 1988), (Lehn 1988) e (Cram 1988) entre outros, publicaram a síntese de moléculas macrocíclicas (éteres coroa, “cryptands”, “spherands”, etc) capazes de se ligar seletivamente a íons ou pequenas moléculas orgânicas por interações não covalentes e com reconhecimento específico (ligação e seleção). Lehn, cunhou o termo química supramolecular (“supramolecular chemistry”) ou química além da molécula (“chemistry beyond the molecule”) para este campo.



Na química supramolecular, as moléculas (hospedeiros) são projetadas e sintetizadas para interagir especificamente com moléculas hóspedes ou formar grandes agregados (Konovalov e Antipin, 2008). O artifício usado para desenhar hospedeiros satisfatórios considera propriedades físico-químicas como tamanho, carga, caráter do átomo doador, entre outras de acordo com as propriedades das moléculas hóspedes designadas. A otimização da pré-organização hospedeiro-hóspede é atingida se a complementaridade da interface de ligação hospedeiro-hóspede é adequada e correta. Características como solubilidade do hospedeiro também tem um papel fundamental na complexação. As idéias desenvolvidas na química supramolecular são também

amplamente aplicadas no campo da ciência de materiais, ciência de superfície, tecnologia de sensores, nanotecnologia, entre outras. (Reinhoudt et al. 2002)

Hoje muitos sistemas supramoleculares são conhecidos (ciclodextrinas, éteres de coroa, lipossomas, curcubitais, porfirinas, calix[n]arenos, entre outros) e a aplicação destes como sistemas transportadores de biomoléculas vem merecendo destaque nos últimos anos (Arantes et al. 2009; Fernandes et al. 2007).

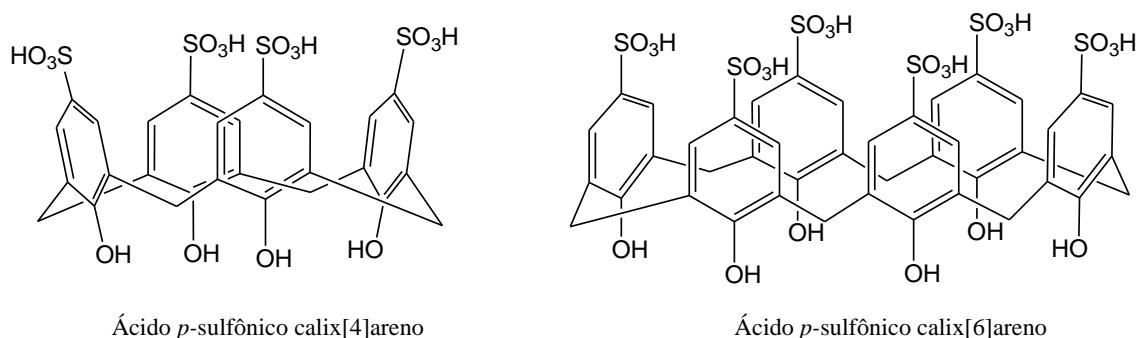


Figura 1 – Calixarenos utilizados como sistemas supramoleculares.

2 - ANESTÉSICOS LOCAIS

Existem duas classes de anestésicos, usados de acordo com o tipo de intervenção cirúrgica: anestésicos gerais e anestésicos locais. Os anestésicos gerais são drogas que agem nas transmissões sinápticas. Eles podem ser administrados por diversas vias, porém a administração por via intravenosa ou por inalação é preferida, porque a dose eficaz e o tempo de ação são mais previsíveis quando tais técnicas são empregadas (de Jong et al. 1994).

No caso dos anestésicos locais (AL) sua ação se dá na inibição da condução do estímulo nervoso, quando aplicados localmente sobre este tecido, em concentrações elevadas. Agem sobre os axônios em qualquer parte do sistema nervoso e em todo tipo de fibra nervosa. Suas principais vias de administração são: anestesia epi e peridural, bloqueios periféricos de reflexos nervosos por infiltração ou na administração tópica local (em odontologia, dermatologia e pequenas incisões).

A **Figura 2** apresenta alguns AL de uso clínico, como os da família dos ésteres (benzocaína), amino-ésteres (procaína e tetracaína) e amino-amidas - cíclicas (mepivacaína, ropivacaína e bupivacaína) e acíclicas (lidocaína, prilocaína, etidocaína e dibucaína). Esses compostos são bastante empregados tanto em clínica médica quanto odontológica, em particular os amino-amidas. (de Jong, 1994), (Covino e Vassalo, 1985), (Korsten et al. 1991), (Peretz e Bimstein, 2000) e (Eichenberger et al. 2009).

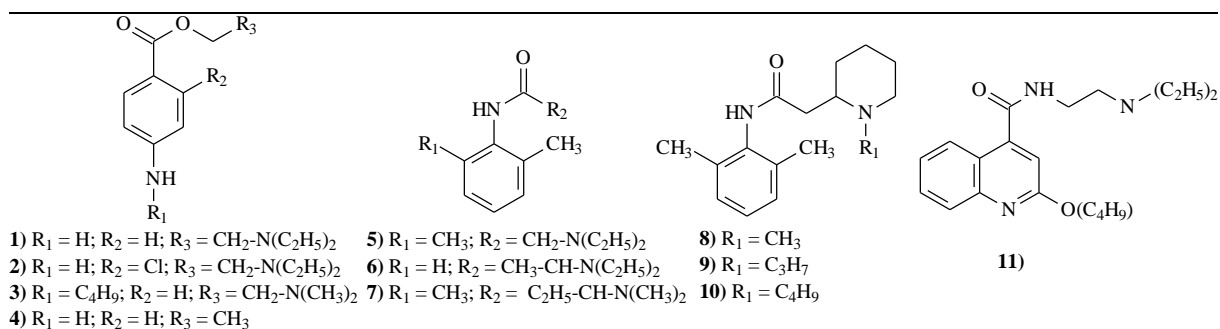


Figura 2 - Estrutura Química dos Anestésicos Locais de uso clínico **1)** Procaína; **2)** Cloroprocaína; **3)** Tetracaína; **4)** Benzocaína; **5)** Lidocaína; **6)** Prilocaína; **7)** Etidocaína; **8)** Mepivacaína; **9)** Ropivacaína; **10)** Bupivacaína; **11)** Dibucaína.

2.1 - Preparação de anestésicos de longa duração e terapia da dor

Os benefícios de uma analgesia profunda produzidos por anestésicos locais estão sendo melhor conhecidos e com isso tem havido um aumento no uso de técnicas de anestesia local e regional para aliviar a dor pós-cirúrgica. Porém seu uso ainda é limitado pela curta duração relativa das drogas disponíveis, comparadas com a duração da dor (Duncan e Wildsmith, 1995). Um AL de ação ultra-longa ideal deveria produzir analgesia por vários dias, ser livre de efeitos irritantes, ter alto índice terapêutico e afetar as fibras sensoriais, mas não as motoras (Kuzma et al. 1997), (Malamed. 2001) e (Araújo et al. 2003).

É óbvio pensar na utilização de compostos mais hidrofóbicos para aumento da disponibilidade e tempo de anestesia, porém há um limite na biodisponibilidade destes compostos, que é imposto pela sua solubilidade em água, que não pode ser

extremamente baixa (de Paula e Schreier, 1995). A síntese orgânica de compostos de longa duração, por alteração das moléculas de AL já existentes ou pela identificação de novos agentes com ação anestésica local é objeto de estudo de vários pesquisadores (Ogura e Mori, 1968), (Ross e Akerman, 1972), (Scurlock e Curtis, 1981), (Korsten et al. 1991) e (Takeda et al. 2009).

Há alguns anos, relatou-se a síntese de surfactantes com ação anestésica; esses compostos disponíveis em altas concentrações na forma de micelas teriam liberação gradual e lenta (Kuzma et al. 1997) e, segundo Matsuki et al. sua potência anestésica estaria relacionada à capacidade de alterar a tensão superficial. Seu uso clínico não teve continuidade, devido a relatos de efeitos líticos associados ao uso dos mesmos. O caráter de surfactante é compartilhado por AL de uso clínico como a tetracaína (CMC na forma protonada = 60-70 μM) (Fernandez, 1981) e a dibucaína (CMC = 10,7 μM) (Malheiros et al. 2000; Schreier et al. 2000) como mencionado anteriormente.

Outro método para aumentar a biodisponibilidade dos anestésicos locais é o encapsulamento dos mesmos em sistemas hospedeiros-hospédes (Malamed, 2001).

3 - CALIXARENOS, BREVE HISTÓRICO

Os calixarenos têm uma história que faz parte da química do fenol-formaldeído, que se iniciou com o químico Adolf Von Baeyer que em 1872 aqueceu formaldeído e fenol, tendo como produto um material resinoso, que na época não foi possível de ser identificado (Baeyer, 1872).

Anos mais tarde Leo Baekeland usou a mesma reação para preparar uma resina resistente que na época foi comercializada como “*bakelite*”. A descoberta de Baekeland deu início a inúmeras pesquisas sobre o processo de condensação de fenóis com formaldeídos. Uma das que se destacaram foi a de Alois Zinke e Erich Ziegler, que

simplificaram o problema substituindo o fenol por fenóis *p*-substituídos. A condensação utilizando fenóis *p*-substituídos, formaldeído, base e aquecimento leva a produto de alto ponto de fusão, insolúveis em alguns solventes orgânicos (acetona, etanol entre outros). Zinke descreveu essas estruturas como possíveis tetrâmeros cíclicos (Zinke et al. 1952).

Calixarenos apesar de sua longa história, suas potencialidades em química supramolecular só foram descobertas em um passado relativamente recente. Começou lentamente nos anos 70, mas rapidamente se desenvolveu nos anos seguintes. Tendo atingido um crescimento quase que exponencial. Hoje representa uma importante classe de hospedeiros sintéticos. Até 2007 foram registrados mais de 300 patentes e 8811 artigos até 2009 descrevendo aplicações de moléculas baseadas em calixarenos (Marcos e Félix, 2007).

O nome calixareno foi sugerido por Gutsche devido à semelhança por ele encontrada entre a forma de um vaso grego (*calix crater*) e o modelo molecular de um dos confômeros do tetrâmero cíclico. Assim, *calix* vem de vaso e *areno* indica a presença de anéis aromáticos (**Figura 3**) (Gutsche, 1998).

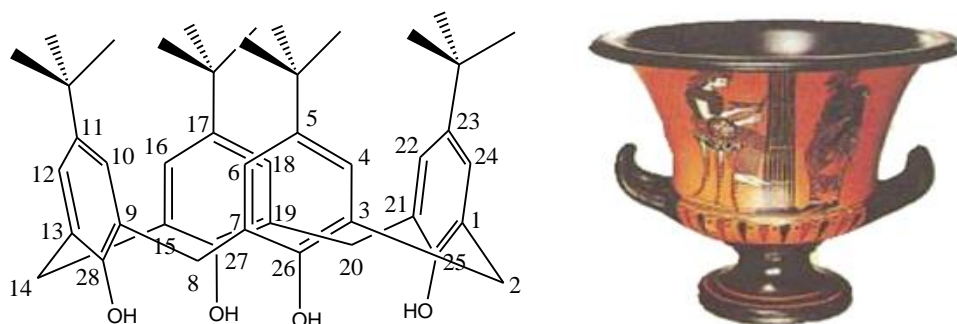


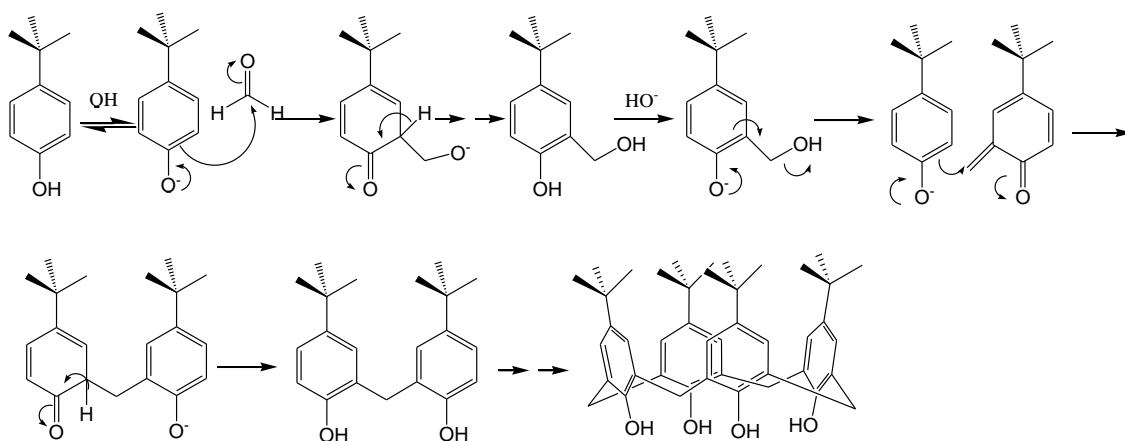
Figura 3 – Comparação feita por Gutsche entre a semelhança do *p*-*tert*-butilcalix[4]areno com a forma de um vaso grego (Gutsche, 1998).

A nomenclatura destes compostos seguindo as regras da IUPAC torna-se um trabalho bastante “arduo” devido a complexidade em dar nome a esta classe de compostos. Por exemplo, o tetrâmero cíclico derivado do *p*-*tert*-butilfenol é designado por 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetraidroxicalix[4]areno (**Figura 3**).

(Gutsche, 1998). O número das unidades fenólicas é indicado por um número entre parêntesis, inserido entre as palavras “calix” e “areno” (*p-terc*-butilcalix[*n*]areno) (Gutsche, 1998). A natureza e a posição da substituição nos anéis aromáticos são indicadas por números e prefixos apropriados. Ainda devido à semelhança com um vaso grego, as estruturas dos calixarenos são geralmente desenhadas com os substituintes *para* direcionados para cima (“coroa superior”) e com os grupos hidroxila direcionados para baixo (“coroa inferior”) **Figura 3** (Gutsche, 1998).

3.1 - Sínteses de calixarenos

A síntese de calix[*n*]arenos pode ser realizada por dois métodos principais. No processo conhecido como condensação de fragmentos sintetiza-se um produto linear de duas, três unidades que é subsequentemente ciclizado com outros fenóis ou unidades adequadamente substituídas (Gutsche et al. 1987) e (Gutsche e Iqbal, 1989). Outro método para a obtenção de calix[*n*]arenos envolve a condensação de fenóis *p*-substituídos com formaldeído em meio básico. Este método é chamado de síntese sequencial uma vez que as unidades fenólicas são acrescentadas e posteriormente ciclizadas (Hayes e Hunter, 1958), (Happel et al. 1974) e (Kammerer et al. 1978). Dentre os métodos supramencionados, o segundo é o mais utilizado uma vez que em uma única etapa é possível obter calix[*n*]arenos com bons rendimentos (**Esquema 1**).



Esquema 1 – Mecanismo para a formação do *p-tert*-butilcalix[4]areno.

3.2 - Conformações

Os calixarenos apresentam várias conformações, o *p-tert*-butilcalix[4]areno por exemplo apresenta 4 conformações distintas conforme descrito por Cornfort *et al.* 1955 (**Figura 4**). Gutsche *et al.* 1983 designou estas conformações como: cone, cone parcial, 1,2-alternada e 1,3-alternada (**Figura 4**) e à medida que o número de grupos aril aumenta mais conformações são possíveis.

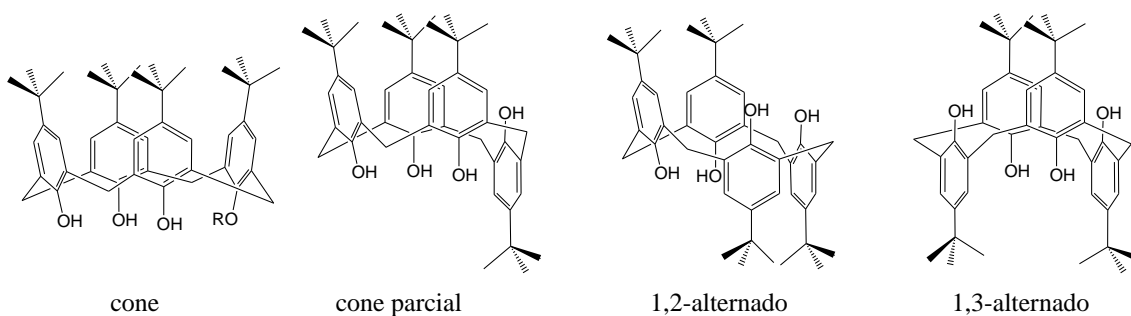


Figura 4 - Conformações adotadas pelo *p-tert*-butilcalix[4]areno em solução (Gutsche *et al.* 1983).

Essa liberdade conformacional só é possível devido à ligação entre as unidades fenólicas ser uma ligação sigma (metilênica), permitindo a livre rotação dos anéis (Ikeda e Shinkai, 1997).

Os substituintes em posição *para* tem pouca influência na barreira de energia de interconversão dos calixarenos uma vez que as hidroxilas apresentam livre rotação através do interior da cavidade dos calixarenos. Esta indiferença está de acordo com o

movimento de inversão conformacional que envolve a rotação dos grupos OH através do interior do anel, colocando para fora os substituintes em posição *para* (**Figura 5**) (Gutsche et al. 1979). Nos calix[4]arenos outro movimento possível, através da coroa superior (grupos *para*), está impedido mesmo para substituintes pequenos como os hidrogênios. A polaridade do solvente tem grande influência na barreira de interconversão dos calixarenos (Gutsche et al. 1979). Quando se passa de um solvente pouco polar como o clorofórmio para solventes mais polares como a acetona ou acetonitrila, há uma diminuição na barreira de inversão, sendo observado um efeito mais pronunciado em solventes básicos como a piridina, capaz de realizar ligação de hidrogênio intermoleculares com as hidroxilas dos calixarenos (Gutsche e Bauer, 1985).

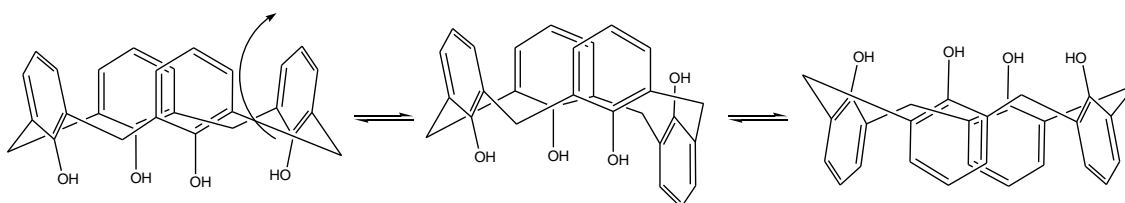


Figura 5 – Movimento de inversão conformacional do calix[4]areno.

3.3 - Propriedades Físico-Químicas

3.3.1 - Solubilidade

Calixarenos não funcionalizados são insolúveis em água, mesmo em solução básica, e pouco solúveis em solventes orgânicos, o que dificulta a purificação e caracterização dos mesmos. Substituintes na posição *para* geralmente tornam os calixarenos mais solúveis em solventes orgânicos (Gutsche, 1998). Obviamente derivatizações alteram a solubilidade, possibilitando a obtenção de calixarenos solúveis em água, como sulfonamidas-calixarenos (Gansey et al. 1994), nitro-calixarenos,

sulfonatos-calixarenos (Shinkai et al. 1987), amônio-calixarenos e carboxil-calixarenos (Arduini et al. 1984).

3.3.2 – Temperatura de fusão

Os calixarenos apresentam elevadas temperaturas de fusão, sendo que essa temperatura de fusão aumenta de acordo com o tamanho do anel. O *p-terc*-butilcalix[4]areno funde a 342-344 °C, calix[4]areno 315-318 °C, *p-terc*-butilcalix[6]areno 380-381 °C, calix[6]areno 417-418 °C e o *p-terc*-butilcalix[8]areno a 411-412 °C (**Figura 6**) (Asfari e Vicens, 1988).

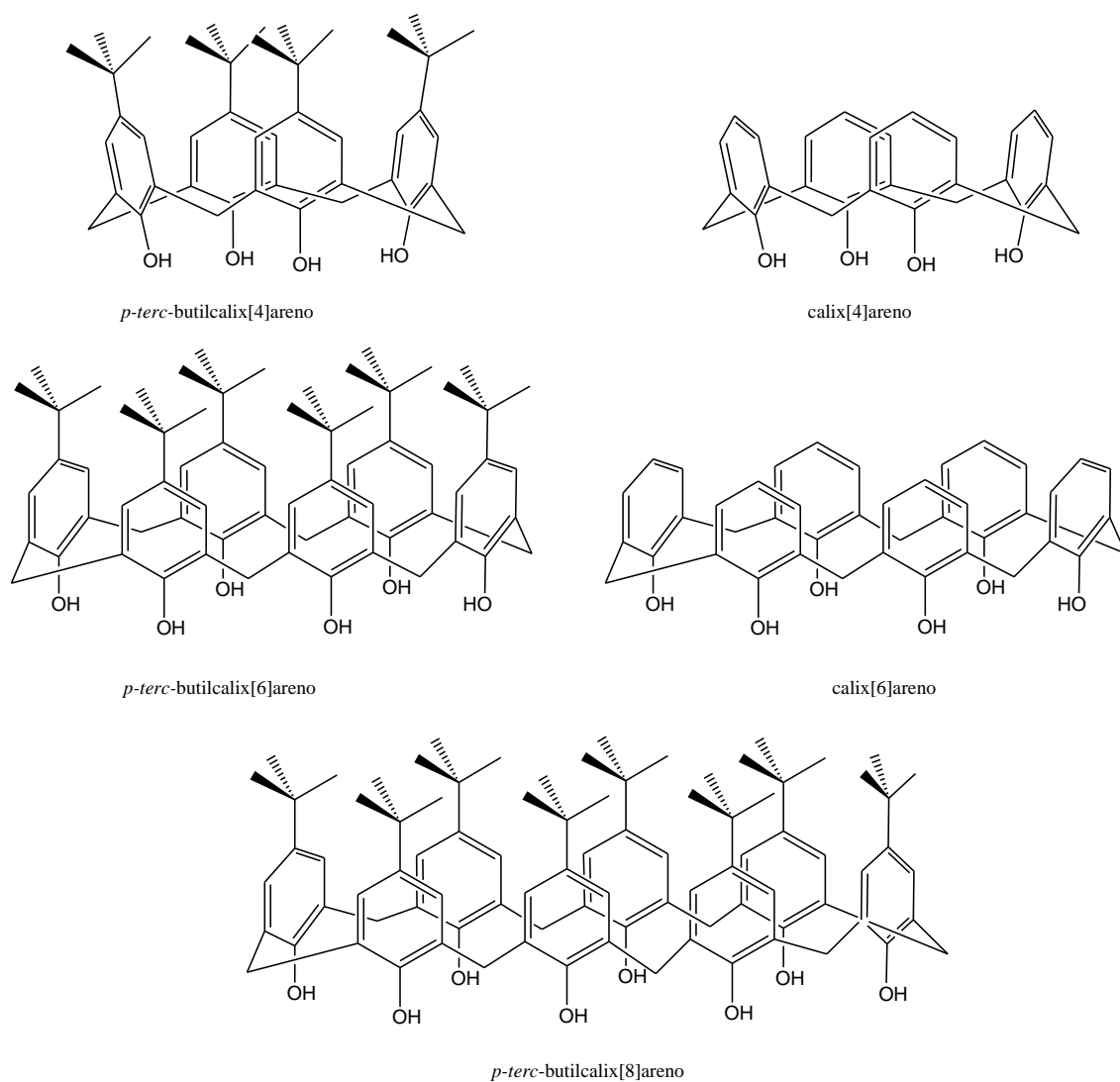


Figura 6 - Alguns calixarenos com elevados pontos de fusão (Asfari e Vicens, 1988).

3.3.3 - Propriedades Espectroscópicas dos calixarenos

As ligações de hidrogênio intramoleculares em calixarenos deslocam a banda de estiramento de OH para 3100-3300 cm^{-1} (Barbosa, 2007). Nos tetrâmeros a menor flexibilidade é devida a ligação de hidrogênio mais forte, pois em anéis menores as hidroxilas são mais próximas, ou seja, menor grau de liberdade se comparado com os hexâmeros ou octâmeros (Marcos e Félix, 2007).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são bastante simples, pois as moléculas são simétricas, apresentando poucos sinais, sendo de fácil interpretação. Os espectros dos macrociclos, *p-terc*-butilcalix[4]areno e do *p-terc*-butilcalix[6]areno são bem parecidos. Um sinal muito importante e que faz a diferenciação dos dois compostos é o sinal do CH_2 , uma vez que o *p-terc*-butilcalix[4]areno apresenta o deslocamento químico dos hidrogênios do CH_2 como par de dupletos, enquanto o *p-terc*-butilcalix[6]areno apresenta um simpleto largo. O *p-terc*-butilcalix[8]areno também apresenta um par de dupletos dos hidrogênios do CH_2 mas com deslocamento químico diferente do *p-terc*-butilcalix[4]areno, com isso é possível diferenciar os dois compostos

3.4 - Aplicações de calixarenos na área Biológica

Nas últimas duas décadas tem sido descrito na literatura inúmeras aplicações dos calix[*n*]arenos em campos relativos à Química Supramolecular e um que merece destaque é a aplicação nas áreas biológicas.

Recentemente foram publicadas excelentes revisões destacando a aplicação de calixarenos na interface entre a química e sistemas biológicos (de Fátima et al. 2009; Perret et al. 2006; da Silva et al. 2004). Estas revisões descrevem muito bem a utilização de calixarenos modificados com atividade antiviral, antifúngica,

antibacteriana, anticancerígena, antioxidante, antitrombótica, no reconhecimento de DNA, transfecção de genes e na inibição de enzimas (de Fátima et al. 2009), (Perret et al. 2006) e (da Silva et al. 2004).

Outra aplicação dos calixarenos que vem merecendo destaque nos últimos anos é o emprego como sistemas de encapsulamento e/ou carreamento de moléculas bioativas com o objetivo de aumentar sua biodisponibilidade tempo de ação, etc (Arantes et al. 2009) e (Fernandes et al. 2007). Dentre estas aplicações destacam-se "screening" de beta-adrenérgicos e beta-bloqueadores (Bazylak et al. 2004), reconhecimento de amino-ácidos (Demirtas et al. 2009), açúcares (Pietraszkiewicz et al. 2004), peptídeos (Julian et al. 2002), proteínas e drogas quirais (Zhang et al. 2004), encapsulamento de drogas como nifedipina (Zhang et al. 2004), ibuprofeno (Amrhein et al. 2002), anestésicos locais (Arantes et al. 2009) e (Fernandes et al. 2007) e seu transporte ativo para liberação na membrana celular (Rudkevich, 2002), interações com albumina (Mitra e Maitra, 2000), entre outros.

3.5 - Aplicação da RMN no estudo de complexos supramoleculares

Dentre os métodos experimentais empregados para estudar complexos supramoleculares entre calixarenos e hóspedes estão: espectroscópicos (RMN, UV e IV), espectrométricos (EM), métodos eletroquímicos (potenciometria), calorimetria e cristalografia de raio-X. Dentre estes métodos vamos focar nossos estudos empregando a RMN de ^1H como ferramenta para estudarmos os vários aspectos das interações não covalentes entre calixarenos e anestésicos locais.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é hoje uma das ferramentas analíticas, não destrutivas, mais poderosas e versáteis para o estudo estrutural de moléculas e imagens. Uma característica da RMN de ^1H é a variação no

deslocamento químico dos sinais dos hidrogênios induzidos por complexação do tipo hóspede-hospedeiro. Logo, esta análise pode dar a primeira indicação sobre a natureza das interações, fornecendo informações sobre a inclusão e os sítios e/ou posições de complexação.

Outra informação extremamente importante no estudo das interações do tipo hóspede-hospedeiro é a estequiometria dos complexos. Os métodos mais comuns empregados para a determinação da estequiometria de complexação são: **a)** variação contínua de um dos componentes (Botsi et al. 1997) e **b)** variação contínua de ambos os componentes, método de Job; (Job, 1928; Djedaini et al. 1990). O primeiro método consiste em observar a variação de deslocamentos químicos ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) dos hidrogênios do hospedeiro em soluções distintas perante a variação da razão molar do hóspede em relação ao hospedeiro, cuja concentração se mantém constante. Pela observação de $\Delta\delta_{\text{obs}}$ é possível avaliar a estequiometria através de um gráfico ($\Delta\delta_{\text{obs}}$ versus razão molar). O ponto estequiométrico é atingido quando $\Delta\delta_{\text{obs}}$ permanece constante, de forma análoga à titulação de pH (**Figura 7a**) (Botsi et al. 1997). No método de Job, as concentrações de ambos componentes (hóspede e hospedeiro) variam continuamente enquanto a soma total das concentrações permanece constante e, da mesma forma que no método anterior, a partir de dados racionalizados em gráfico ($r\Delta\delta_{\text{obs}}$ versus r ; onde $r = [\text{hóspede}]/([\text{hóspede}] + [\text{hospedeiro}])$) observa-se o ponto estequiométrico, o qual é atingido quando a variante y ($r\Delta\delta_{\text{obs}}$) do mesmo atinge o valor máximo (**Figura 7b**).

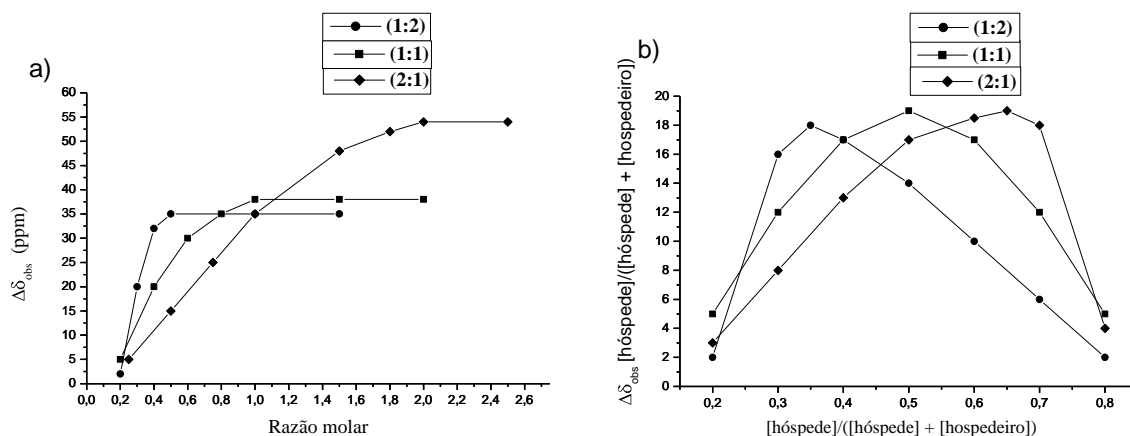


Figura 7 - Titulação por RMN de ^1H : a) método com variação contínua de um dos componentes e b) método de Job.

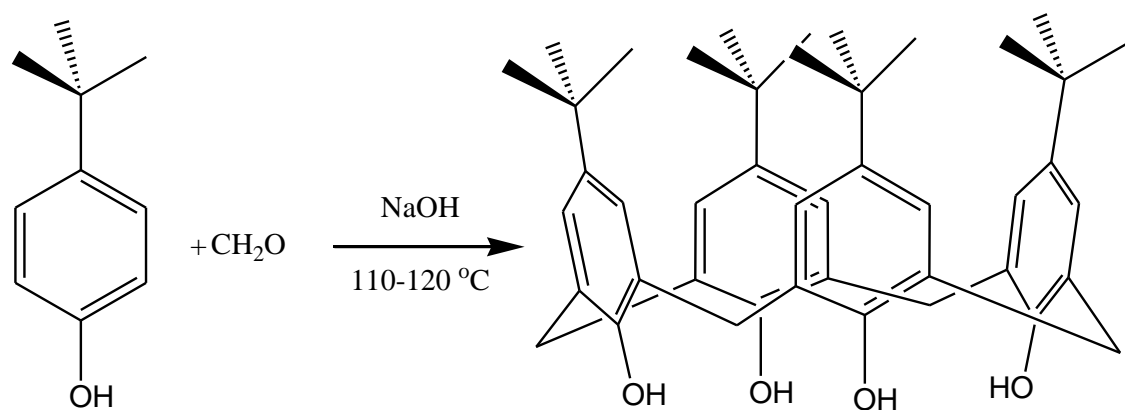
4 - OBJETIVOS

- 1) Sintetizar os ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.
- 2) Realizar a complexação e/ou encapsulamento de 4 anestésicos locais com os hospedeiros ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.
- 3) Estudar os complexos do tipo hóspede-hospedeiro entre os calixarenos e os anestésicos locais, empregando como ferramenta RMN de ^1H .

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Síntese do *p*-*terc*-butilcalix[4]areno

A síntese do *p*-*terc*-butilcalix[4]areno, foi realizada utilizando-se *p*-*terc*-butilfenol, solução de formaldeído, meio básico, sob aquecimento, conforme **Esquema 2**. Essa reação é conhecida como substituição eletrofílica aromática. O mecanismo é apresentado no **Esquema 1, pag 7**. (Gutsche, 1989).



Esquema 2 - Síntese do *p-tert*-butilcalix[4]areno.

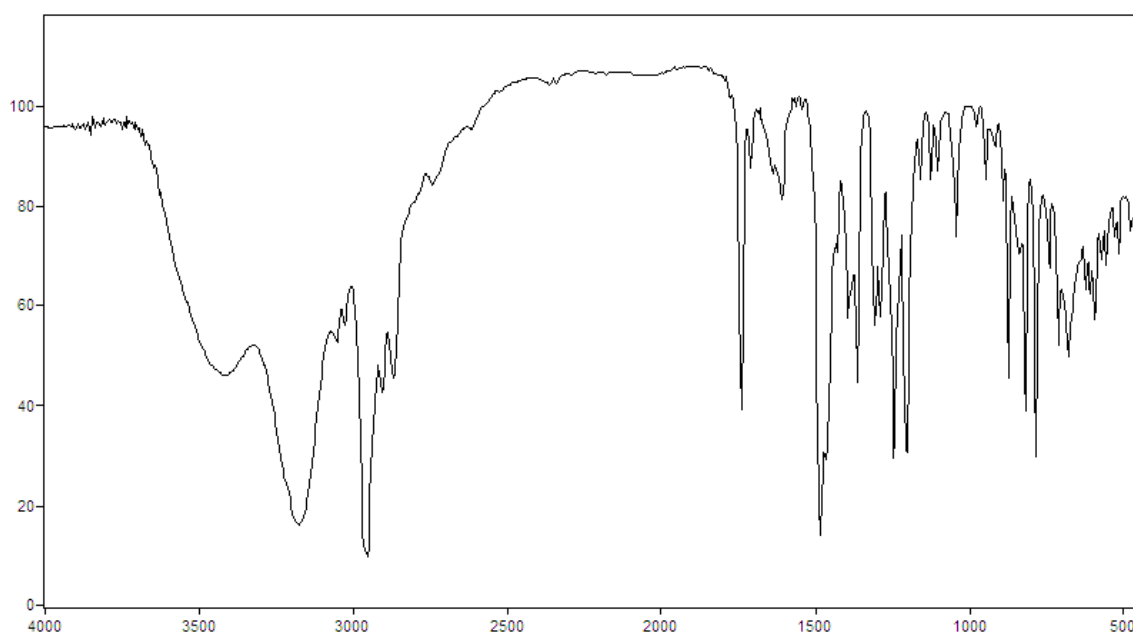


Figura 8 - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do *p-tert*-butilcalix[4]areno.

A banda em 3166 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação OH do *p-tert*-butilcalix[4]areno. Ao compararmos o espectro do reagente, no caso, 4-*tert*-butilfenol, com o do *p-tert*-butilcalix[4]areno observa-se que no primeiro a banda devido ao estiramento da ligação OH é bem mais larga e aparece num número de onda maior 3248 cm^{-1} (**Figura 9**). Essa alteração no formato e na posição das bandas está relacionada com o tipo de ligação de hidrogênio que os compostos apresentam.

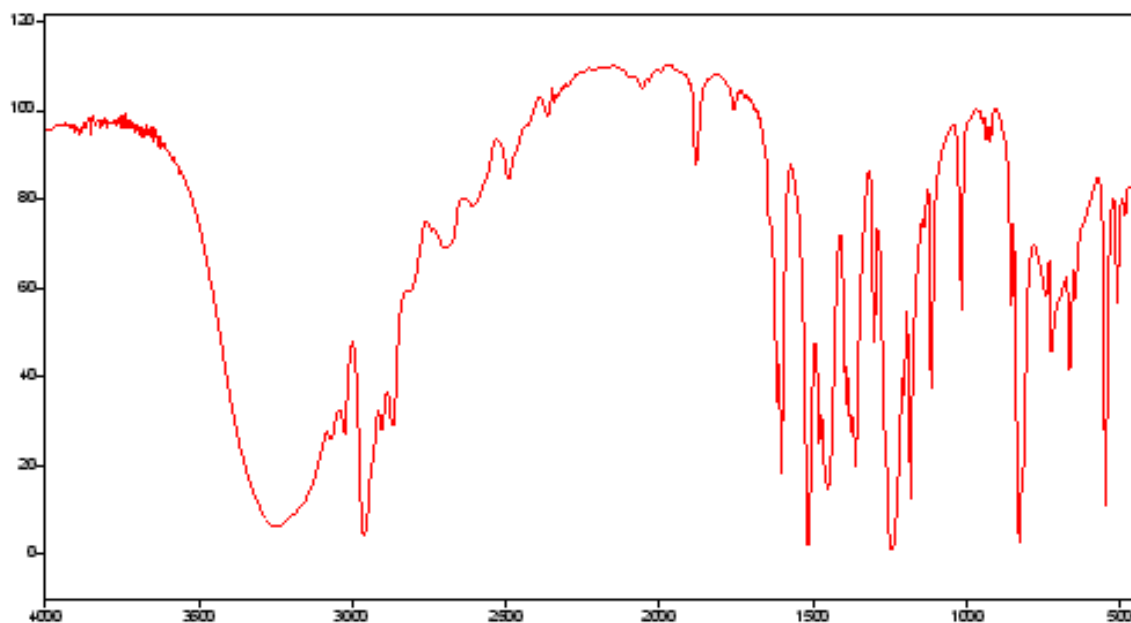


Figura 9 - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do *p*-*tert*-butilfenol.

Para o *p*-*tert*-butilfenol, as ligações de hidrogênio são do tipo intermoleculares, enquanto que as no *p*-*tert*-butilcalix[4]areno são predominantemente intramoleculares, o que justifica as diferenças observadas nos dois espectros no IV.

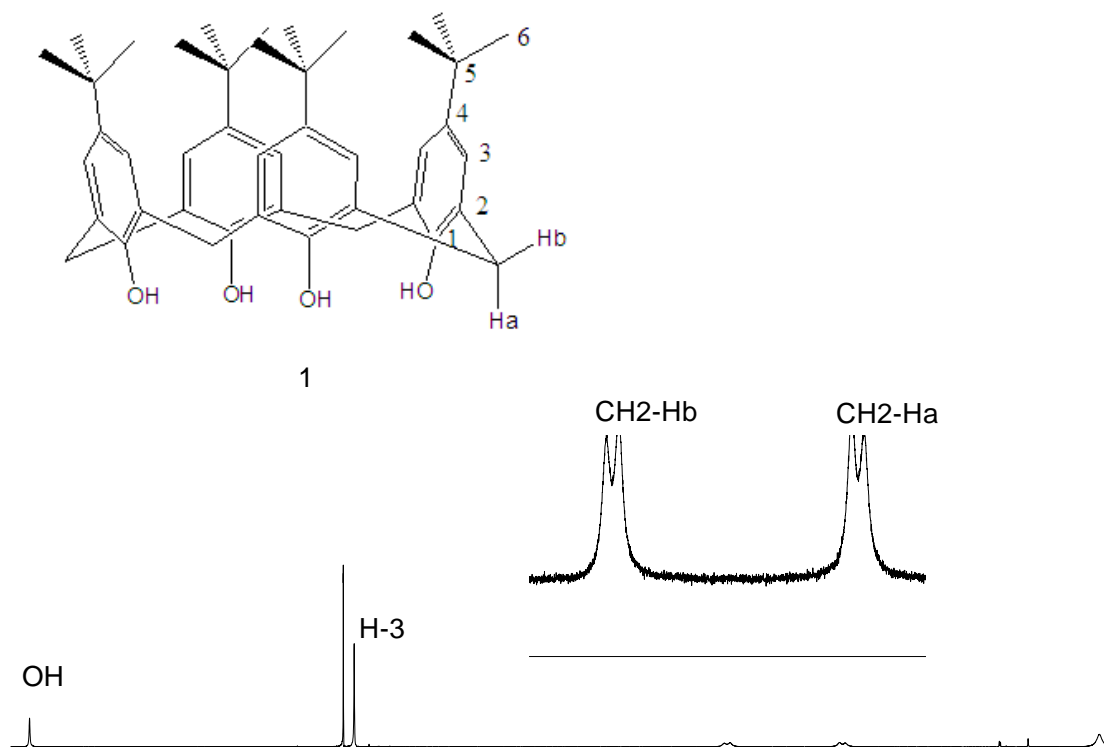


Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do *p*-*tert*-butilcalix[4]areno.

No espectro de RMN de ^1H o sinal em δ 1,25, integrado para 36 hidrogênios são referentes aos hidrogênios metílicos do grupo *terc*-butil (**H-6**), os sinais em δ 3,49 e δ 4,26 dois dupletos largos integrados para 4 hidrogênios cada são referentes aos hidrogênios metilênicos. Os hidrogênios de CH_2 -**Ha**, que estão voltados para a cavidade do calixareno apresentam-se mais blindados. Já os hidrogênios de CH_2 -**Hb**, os quais estão voltados para fora da cavidade do calixareno, apresentam-se mais desblindados. Essa diferença ocorre devido a esses hidrogênios estarem em ambientes químicos diferentes sendo eles hidrogênios etereotópicos. Estes deslocamentos químicos e as multiplicidades são diagnósticos para a identificação do *p-terc*-butilcalix[4]areno (Molins et al. 1992). O sinal em δ 7,17, um simpleto integrado para 8 hidrogênios referem-se aos hidrogênios do anel aromático (**H-3**). Observou-se ainda um sinal em δ 9,62 um simpleto integrado para 4 hidrogênios referentes aos hidrogênios das hidroxilas. Eles se encontram desblindados, já que em análogos acíclicos estes se encontram normalmente entre 7 e 9 ppm (Silverstein e Welester, 2000). Essa variação se deve ao fato de que nestes compostos a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, diminui a densidade eletrônica ao redor do hidrogênio da hidroxila e, assim, causa deslocamentos para frequências mais altas.

No espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em δ 31,62 é referente ao carbono **C-6** do grupo *terc*-butil, o sinal em δ 32,83 foi atribuído ao carbono metilênico CH_2 , o sinal em δ 34,22 foi atribuído ao carbono quaternário **C-5** do grupo *terc*-butil, os carbonos da posição *meta* no anel aromático apresentam o sinal em δ 126,15 que foi atribuído ao **C-3**, os carbonos da posição *orto* no anel aromático foram atribuído ao sinal em δ 127,91 que é referente a **C-2**. Já o sinal em δ 144,58 é referente ao **C-4**, carbono das posições *para* no anel aromático. O sinal em δ 146,88 referente à **C-1**, carbono que por estar diretamente ligado a hidroxila, se encontra desblindado.

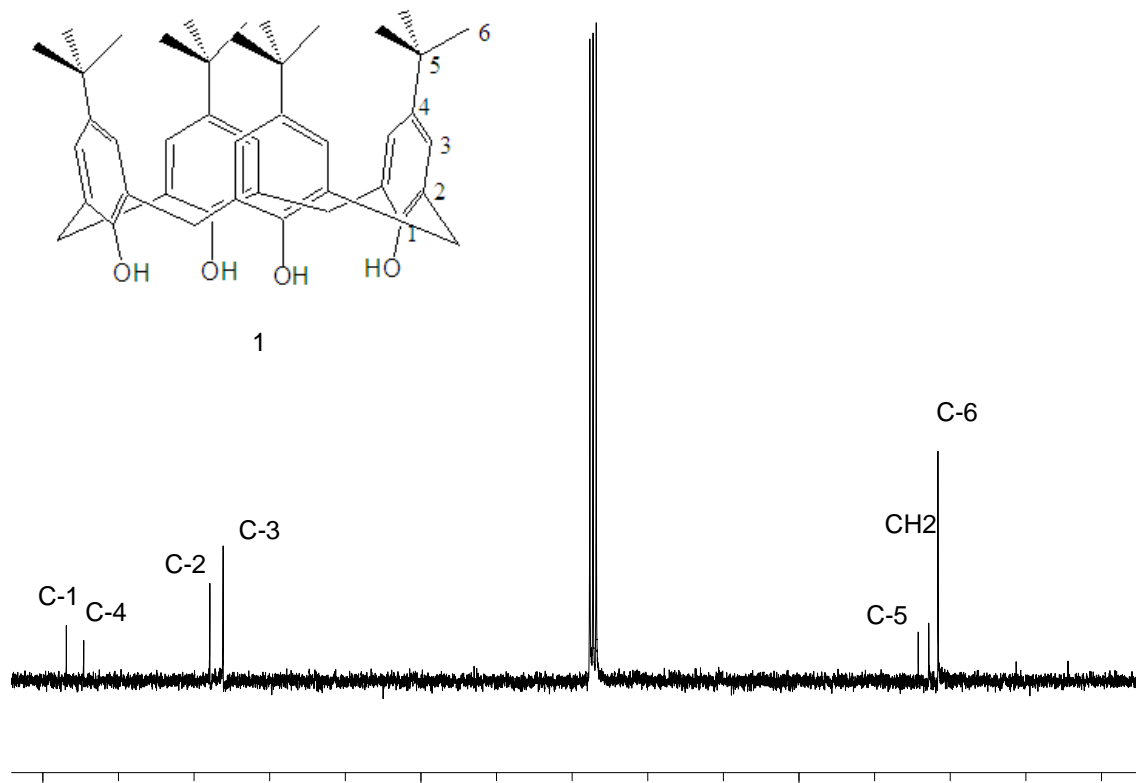
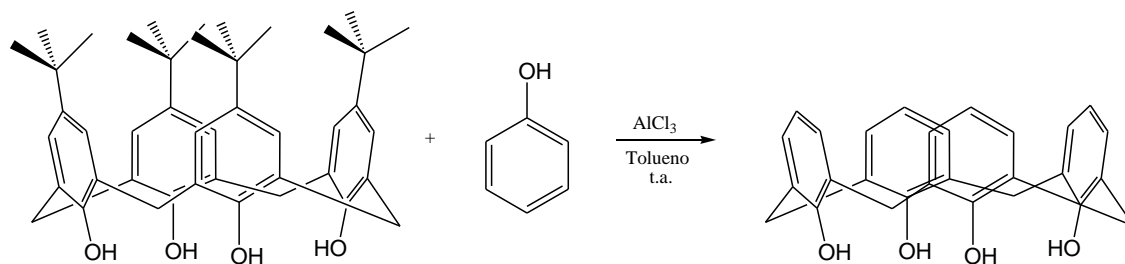


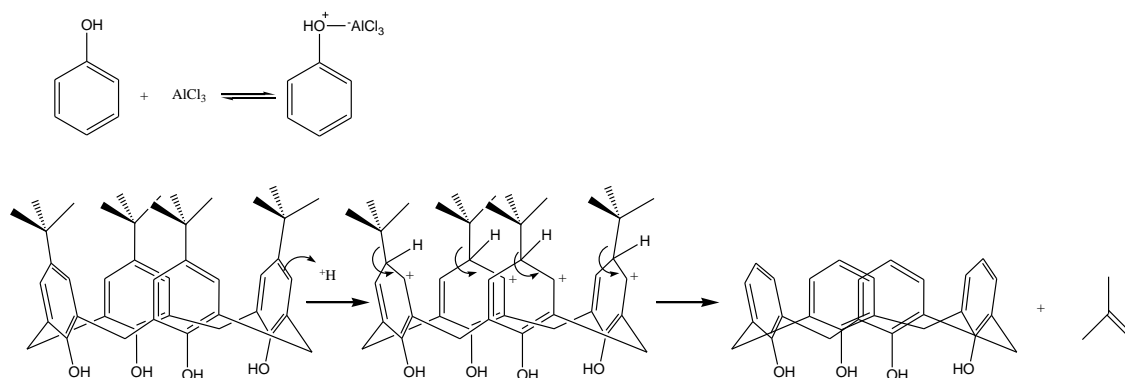
Figura 11 - Espectro de RMN de ¹³C (75,459 MHz; CDCl₃; δ_{CDCl₃} 77,00; 25 °C) do *p*-*tert*-butilcalix[4]areno

5.2 - Síntese do calix[4]areno

A síntese do calix[4]areno, foi realizada utilizando-se o *p*-*tert*-butilcalix[4]areno, adicionando-se fenol, cloreto de alumínio e tolueno seco, sendo o sistema mantido sob agitação e atmosfera de nitrogênio, conforme **Esquema 3**.



Esquema 3 - Síntese do calix[4]areno.



Esquema 4 – Mecanismo para a formação do calix[4]areno.

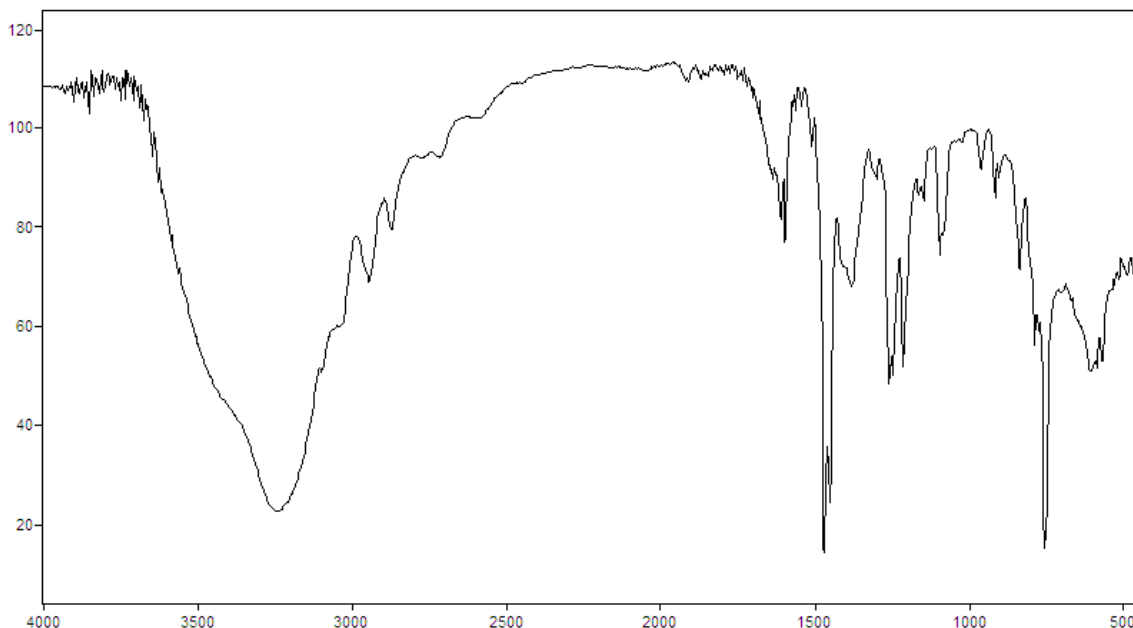


Figura 12 - Espectro no IV (pastilhas de KBr) do calix[4]areno.

Para o calix[4]areno, as ligações de hidrogênio intramolecular não é muito mais pronunciada, pois a molécula de calix[4]areno sem o grupo *terc*-butil tem maior grau de liberdade na interconversão, diminuindo a intensidade das ligações de hidrogênio intramolecular, apresentando o estiramento da ligação OH em maior número de onda 3230 cm⁻¹. Enquanto que as ligações de hidrogênio no *p-terc*-butilcalix[4]areno são predominantemente intramoleculares, o que justifica as diferenças observadas nos dois espectros no IV.

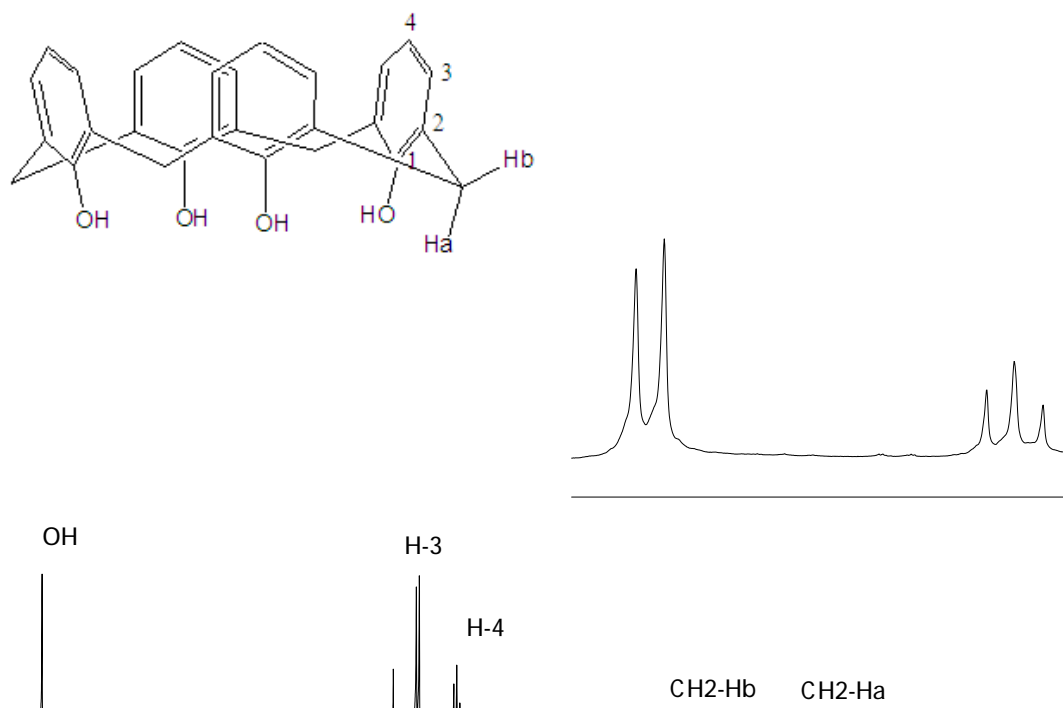


Figura 13 - Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do calix[4]areno.

No espectro de RMN de ¹H os sinais em δ 3,55, δ 4,35 são referentes a dois simpletos largos, integrados para 4 hidrogênios cada, estes sinais são atribuídos aos hidrogênios metilênicos (CH₂-**Ha** e CH₂-**Hb**, respectivamente). O sinal em δ 6,75, integrado para 4 hidrogênios são atribuídos aos hidrogênios das posições *para* nos anéis aromáticos (**H-4**). Já os hidrogênios das posições *meta* apresentaram um sinal em δ 7,25 integrado para 8 hidrogênios (**H-3**). Os sinais de **H-3** e **H-4** foram observados como duplete e tripleto respectivamente, tendo uma constante de acoplamento (³*J*) no valor de 7,6 Hz.

Um dado espectroscópico que confirma a obtenção do calix[4]areno é o sinal em δ 6,75 (**H-4**) sendo este um tripleto com ³*J* 7,2 Hz referente ao acoplamento *orto* com **H-3**.

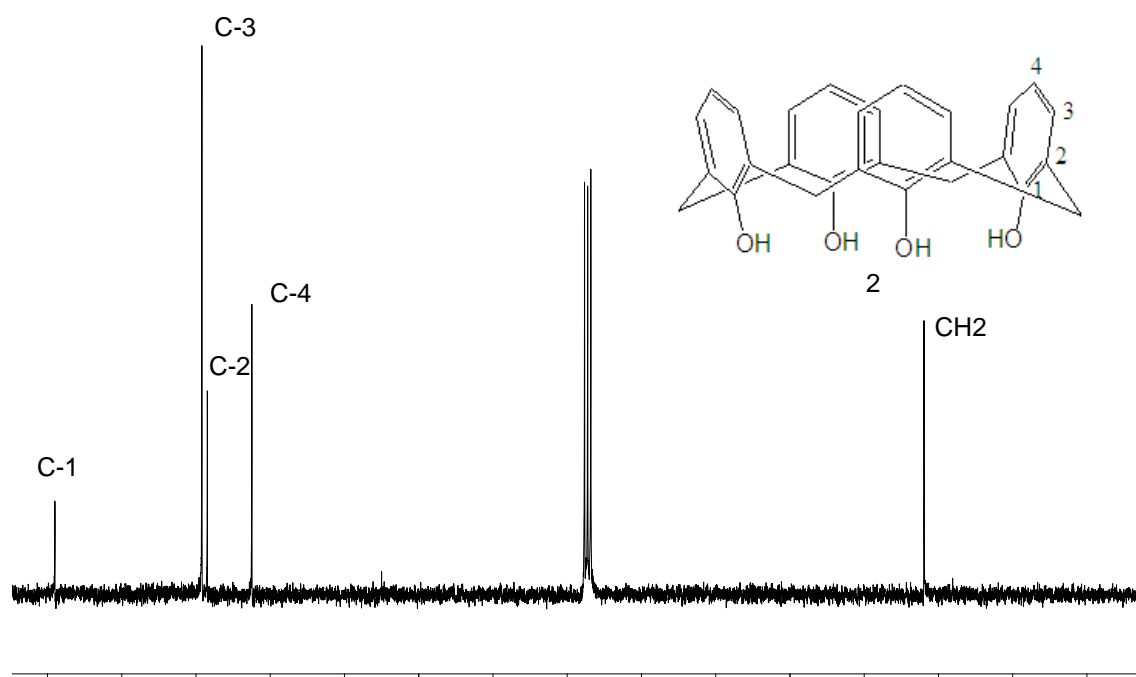
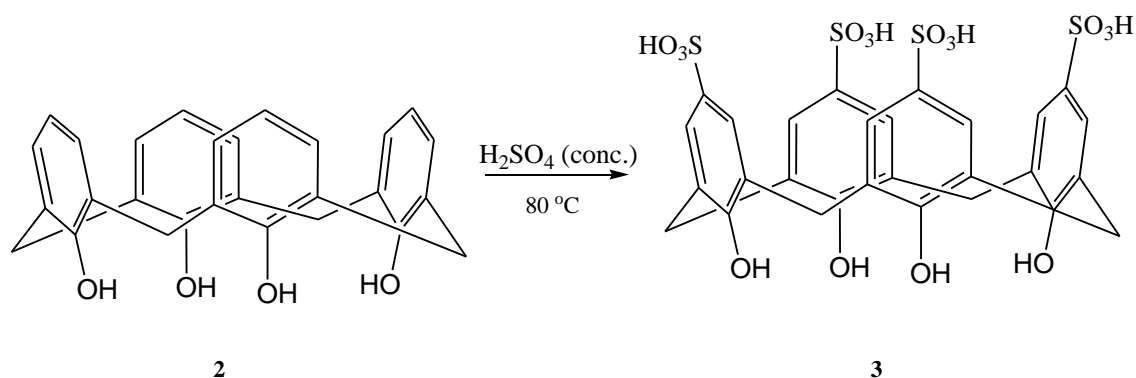


Figura 14 - Espectro de RMN de ¹³C (75,459 MHz; CDCl₃; δ_{CDCl₃} 77,00; 25 °C) do calix[4]areno.

No espectro de RMN de ¹³C, o sinal em δ 31,93 é referente aos carbonos metilênicos, o sinal em δ 122,46 é referente a C-4, carbonos da posição *para* no anel aromático; o sinal em δ 128,46 é referente a C-2, carbonos das posições *orto* no anel. Já o sinal em δ 129,20 é referente a C-3, carbonos das posições *meta* no anel aromático. Observou-se ainda um sinal em δ 149,0 referente à C-1, carbono que por estar diretamente ligado a hidroxila, se encontra desblindado.

5.3 - Síntese do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno

Para a obtenção do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, realizou-se a sulfonação do calix[4]areno, com uso de ácido sulfúrico concentrado (**Esquema 6**).



Esquema 5 - Reação de formação do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.

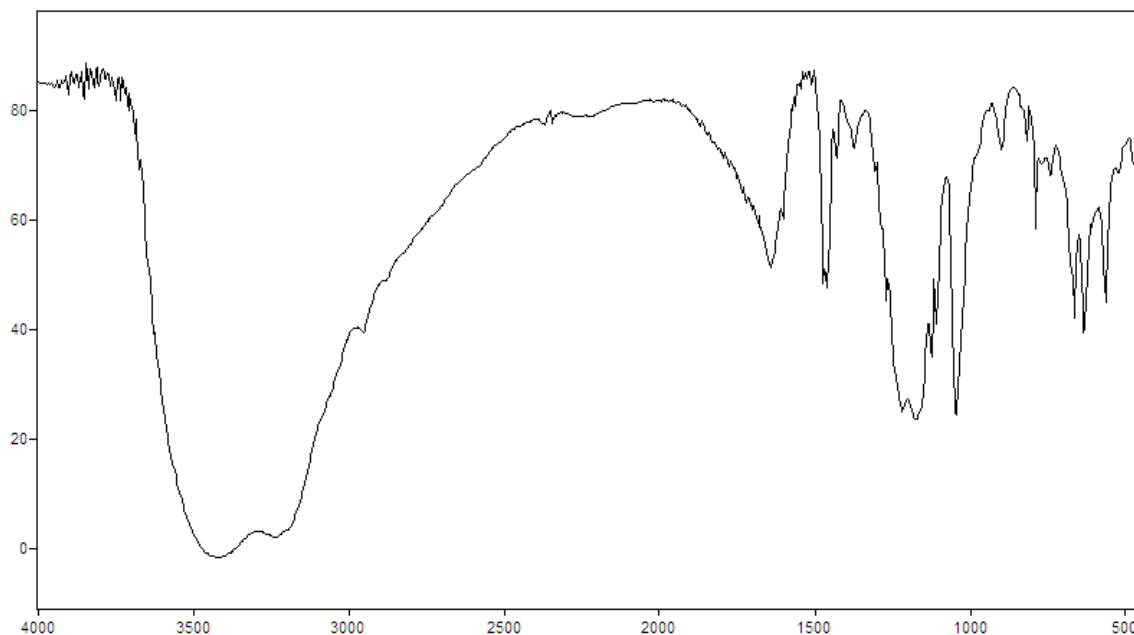


Figura 15 - Espectro no IV (pastilha de KBr) do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.

O estiramento da ligação OH do calixareno foi para um maior número de onda, perto de 3500 cm^{-1} , uma vez que agora a liberdade de rotação do calixareno sulfonado é maior.

Em 1162 cm^{-1} observa-se uma banda larga e forte, relativa ao estiramento da ligação S-O. Ao compararmos o espectro do composto obtido com o do calix[4]areno, observa-se que a banda referente ao estiramento da ligação OH do grupo fenol sofreu alargamento e aumento na frequência de absorção para 3420 cm^{-1} . Como relatado na literatura, esta diferença se deve à mudanças de conformação do calixareno, que por sua vez, influenciam no tipo e na intensidade da ligação de hidrogênio apresentada por estes compostos (Gutsche e Iqbal, 1989). Obsevou-se mudanças também na região de 900-

650 cm^{-1} , devido principalmente à mudanças no padrão de substituição dos anéis aromáticos que antes era um hidrogênio, agora é um grupo SO_3H .

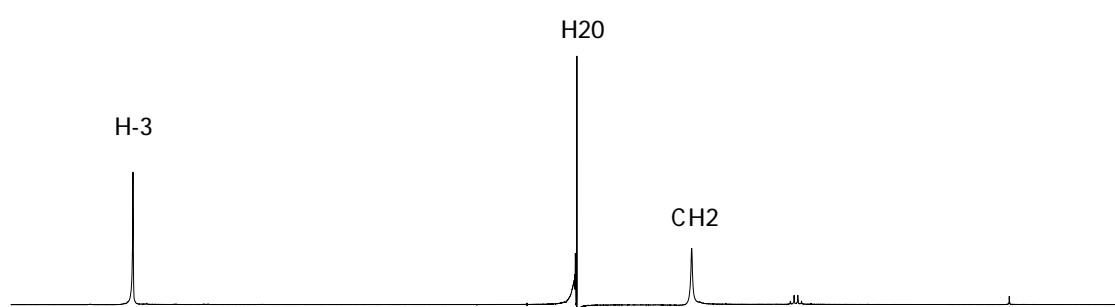
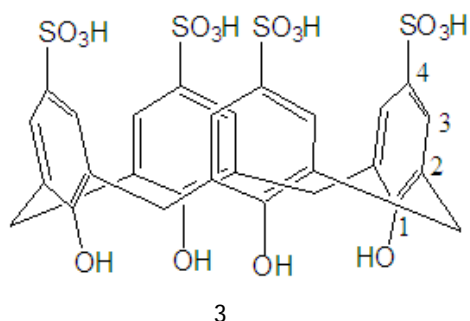


Figura 16 - Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; D₂O; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.

No espectro de RMN de ¹H, o sinal δ 3,94 integrado para 8 hidrogênios foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos. O sinal em δ 7,49 integrado para 8 hidrogênios foram atribuídos aos hidrogênios H-3 na posição *meta* dos anéis aromáticos.

Como o solvente utilizado para se obter o espectro foi o D₂O, os hidrogênios ligados aos oxigênios (OH e SO₃H) sofrem troca química rápida para a escala de tempo da ressonância, ou seja, são rapidamente substituídos por deutério.

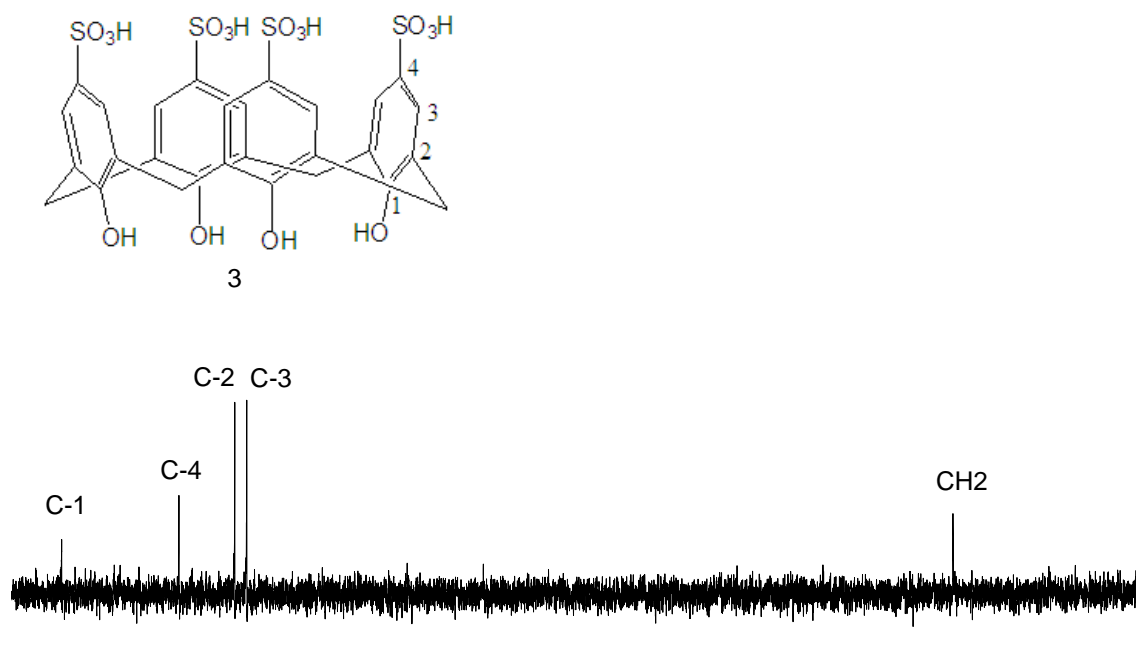
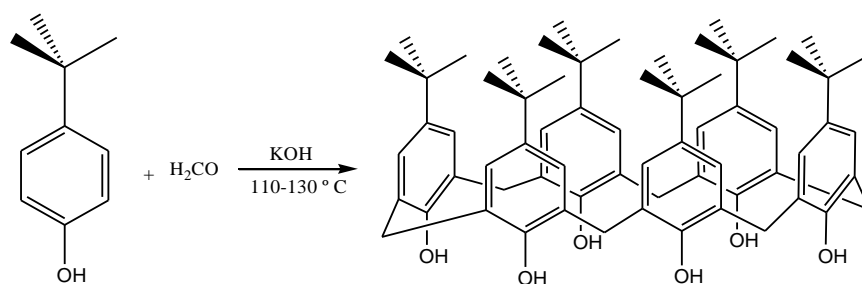


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; D_2O ; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno.

No espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em δ 30,87 foi atribuído ao carbono metilênico (CH_2), o sinal em δ 126,76 foi atribuído ao C-3, o carbono da posição *meta* no anel aromático; o sinal em δ 128,38 foi atribuído ao C-2, carbono da posição *orto* no anel. Já o sinal em δ 135,97 foi atribuído ao C-4, carbonos da posição *para* no anel aromático ligado ao enxofre. O sinal em δ 151,89 referente à C-1, carbono que por estar diretamente ligado a hidroxila, se encontra desblindado.

5.4 - Síntese do *p*-*terc*-butilcalix[6]areno

A síntese do *p*-*terc*-butilcalix[6]areno foi realizada utilizando-se o *p*-*terc*-butilfenol, solução de formaldeído, meio básico sob agitação e aquecimento (Gutsche, 1989), conforme o **Esquema 6**. O mecanismo é o mesmo apresentado para o *p*-*terc*-butilcalix[4]areno (**Esquema 1, pag. 7**).



Esquema 6 - Síntese do *p-tert*-butilcalix[6]areno.

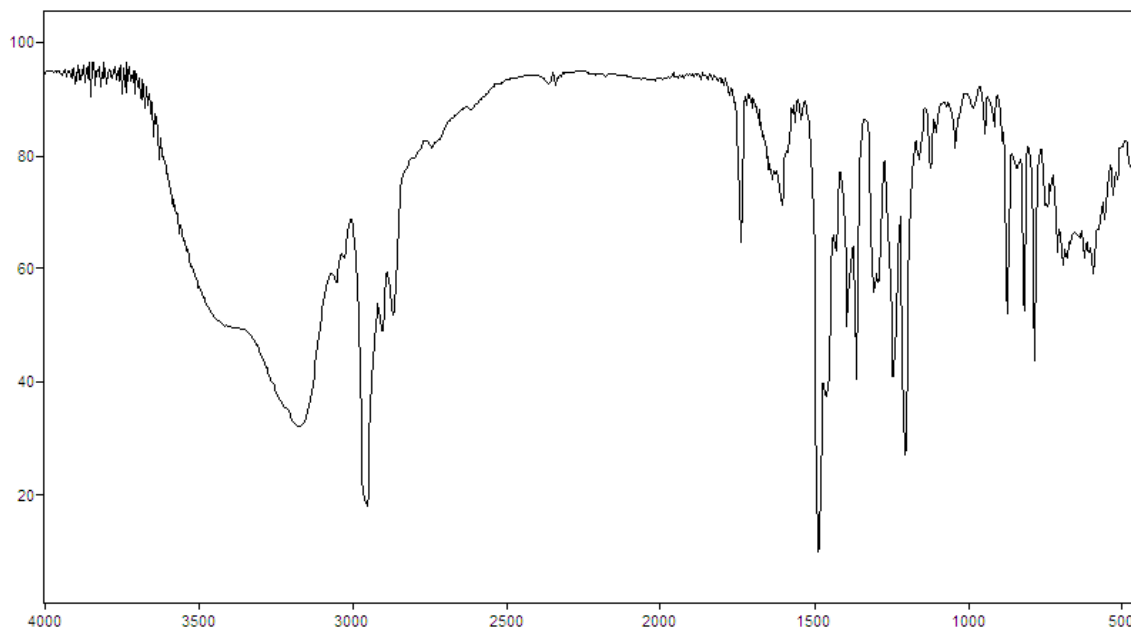
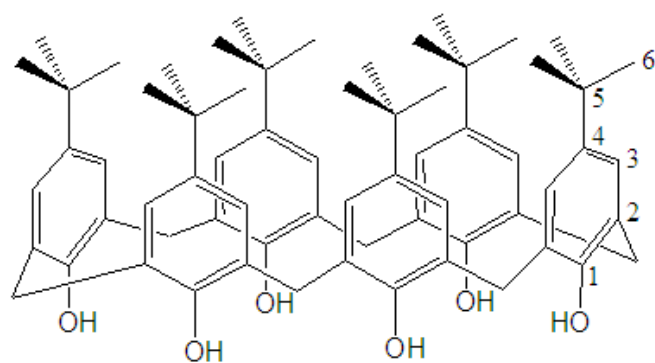


Figura 18 - Espectro no IV (pastilha de KBr) do *p-tert*-butilcalix[6]areno.

A banda larga em 3133 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação O-H do *p-tert*-butilcalix[6]areno. Ao compararmos o espectro do reagente, no caso, *p-tert*-butilfenol (**Figura 9, pag 15**), com o do *p-tert*-butilcalix[6]areno observa-se que no primeiro a banda devido ao estiramento da ligação O-H é bem mais larga e aparece num número de ondas maior 3248 cm^{-1} . Essa alteração no formato e na posição das bandas está relacionada com o tipo de ligação de hidrogênio que os compostos apresentam.

Para o *p-tert*-butilfenol (**Figura 9, página 15**) as ligações de hidrogênio são do tipo intermoleculares, enquanto que no *p-tert*-butilcalix[6]areno são predominantemente intramoleculares, o que justifica as diferenças observadas nos dois espectros no IV.



4

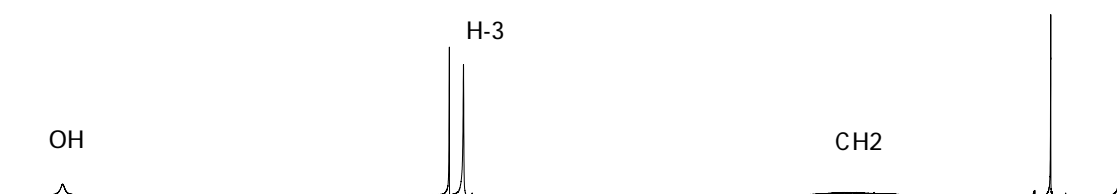


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do *p-tert*-butilcalix[6]areno.

No espectro de RMN de ^1H o sinal em δ 1,25 integrado para 54 hidrogênios é atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo *tert*-butil (H-6); o sinal em δ 3,90 um simpleto largo integrado para 12 hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos do grupo (CH_2), sendo este sinal uma evidência para a formação do *p-tert*-butilcalix[6]areno; o sinal em δ 7,14, um simpleto integrado para 12 hidrogênios, refere-se aos hidrogênios do anel aromático (H-3). Observou-se ainda um sinal em δ 10,53, um simpleto integrado para 6 hidrogênios, referente aos hidrogênios das hidroxilas.

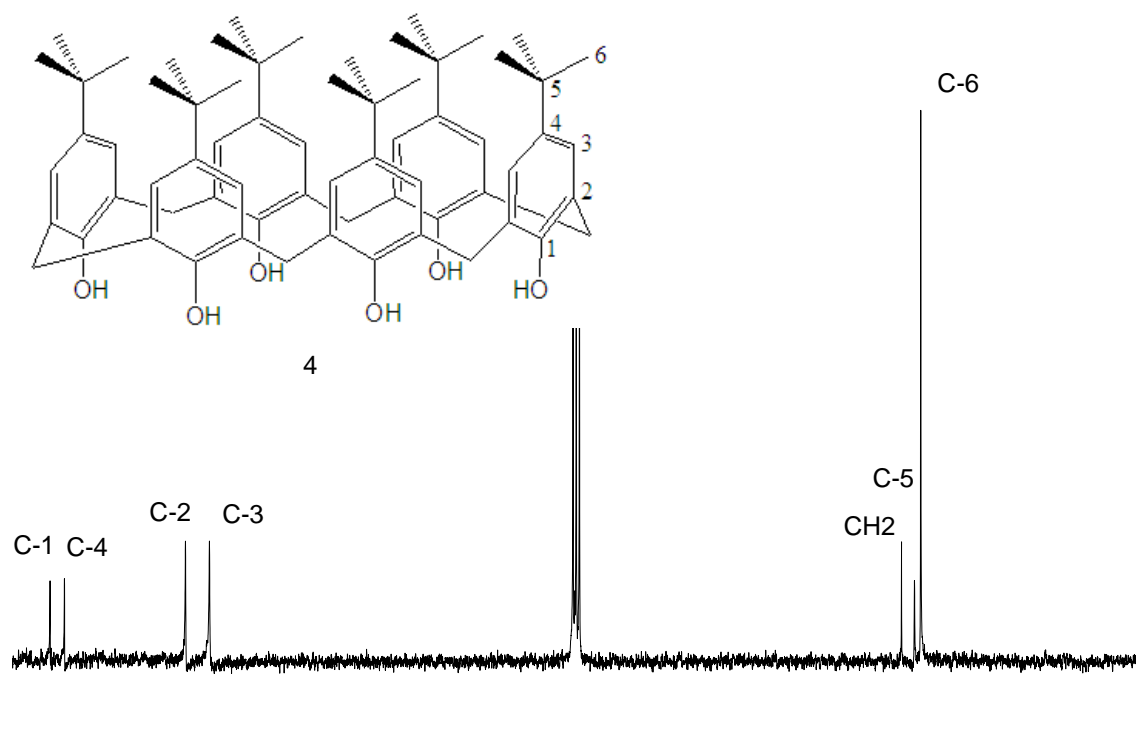


Figura 20 - Espectro de RMN de ¹³C (75,459 MHz; CDCl₃; δ_{CDCl₃} 77,00; 25 °C) do *p*-*tert*-butilcalix[6]areno.

No espectro de RMN de ¹³C, o sinal em δ 31,44 é referente ao carbono C-6 do grupo *tert*-butil, o sinal em δ 32,27 foi atribuído ao carbono quartenário C-5 do grupo *tert*-butil, o sinal em δ 33,99 é referente ao carbono metilênico. Os carbonos da posição *meta* no anel aromático apresentam o sinal em δ 125,50 referente a C-3, carbonos das posições *orto* no anel aromático atribuído ao sinal em δ 128,67 referente a C-2. Já o sinal em δ 144,67 é referente a C-4, carbonos das posições *para* do anel aromático. O sinal em δ 146,57 é referente à C-1, carbono que por estar diretamente ligado a hidroxila, se encontra desblindado.

5.5 - Síntese do calix[6]areno

A síntese do calix[6]areno, foi realizada utilizando-se o *p-terc*-butilcalix[6]areno, fenol, cloreto de alumínio e tolueno seco, sendo o sistema mantido sob agitação e atmosfera de nitrogênio.

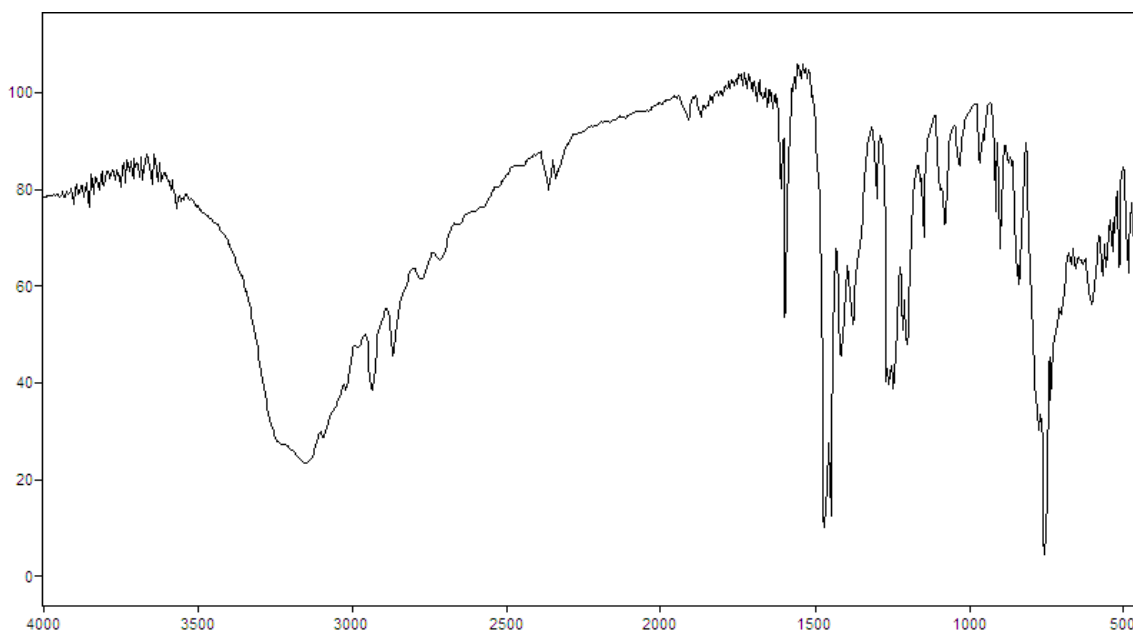


Figura 21 - Espectro no IV (pastilha de KBr) do calix[6]areno.

No espectro de RMN de ^1H o sinal em δ 3,90 um simpleto largo integrado para 12 hidrogênios, são referentes aos hidrogênios metilênicos; o sinal em δ 6,81 integrado para 6 hidrogênios são referentes aos hidrogênios das posições *para* nos anéis aromáticos (H-4). Já os hidrogênios das posições *meta* apresentaram sinal em δ 7,13 integrado para 12 hidrogênios (H-3). Os sinais de H-3 e H-4 foram observados na forma de duplete e tripleto respectivamente, mostrando assim uma constante de acoplamento (3J) no valor de 7,6 Hz.

Observou-se ainda um sinal em δ 10,38 integrado para 6 hidrogênios, referente aos hidrogênios das hidroxilas. Esses hidrogênios encontram desblindados, já que os sinais referentes ao hidrogênio dos análogos acíclicos encontram normalmente entre 7 e 9 ppm. (Silverstein e Welester, 2000) Essa variação se deve ao fato de que nestes

compostos os hidrogênios se encontram associados fortemente por ligações de hidrogênio intramolecular.

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H do *p-terc*-butilcalix[6]areno com o do composto obtido, observa-se que o sinal em δ 1,25 referente ao grupo *terc*-butil do primeiro composto não é observado no espectro do composto obtido, o que também constitui um indicativo da formação do calix[6]areno e com o aparecimento de um duplete δ 7,15 e um tripleto em δ 6,83 confirma a formação do calix[6]areno.

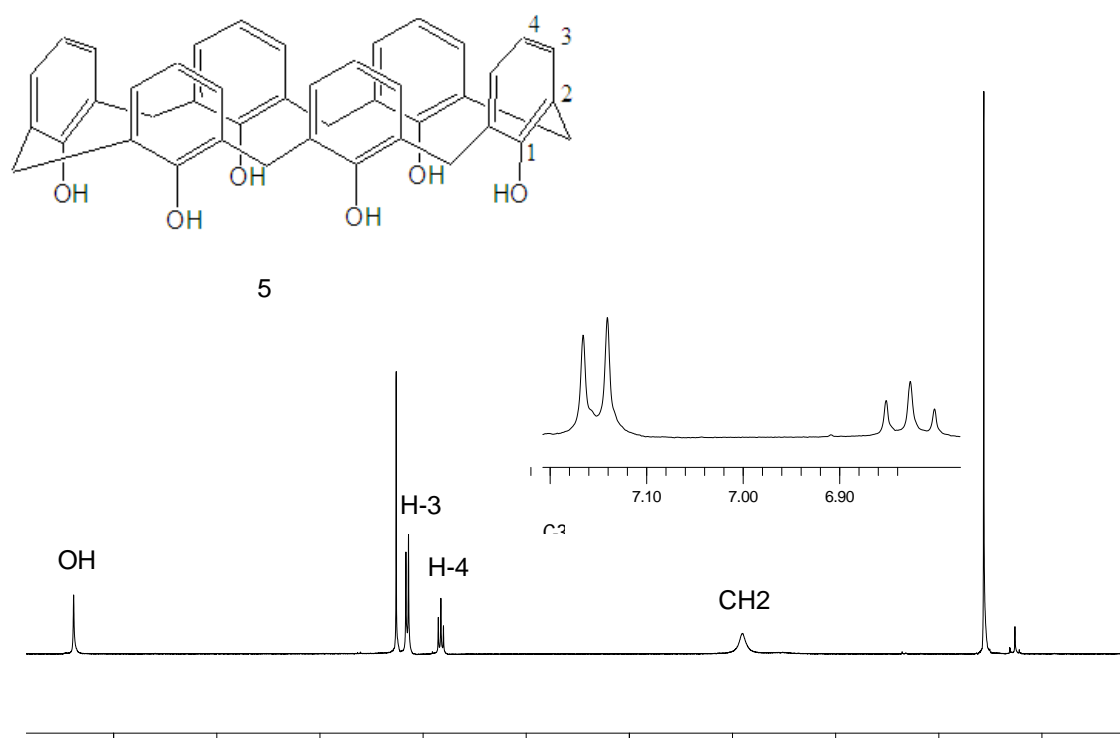


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00; 25 °C) do calix[6]areno.

No espectro de RMN de ^{13}C o sinal em δ 32,41 foi atribuído ao carbono metilênico (CH_2), o sinal em δ 122,06 foi atribuído a C-2, carbono da posição *orto* no anel aromático; o sinal em δ 127,61 foi atribuído a C-4, carbono da posição *para* do anel. Já o sinal em δ 129,69 é referente a C-3, carbono das posições *meta* no anel

aromático. Observou-se ainda um sinal em δ 149,85 referente à C-1, carbono que por estar diretamente ligado a hidroxila, se encontra desblindado.

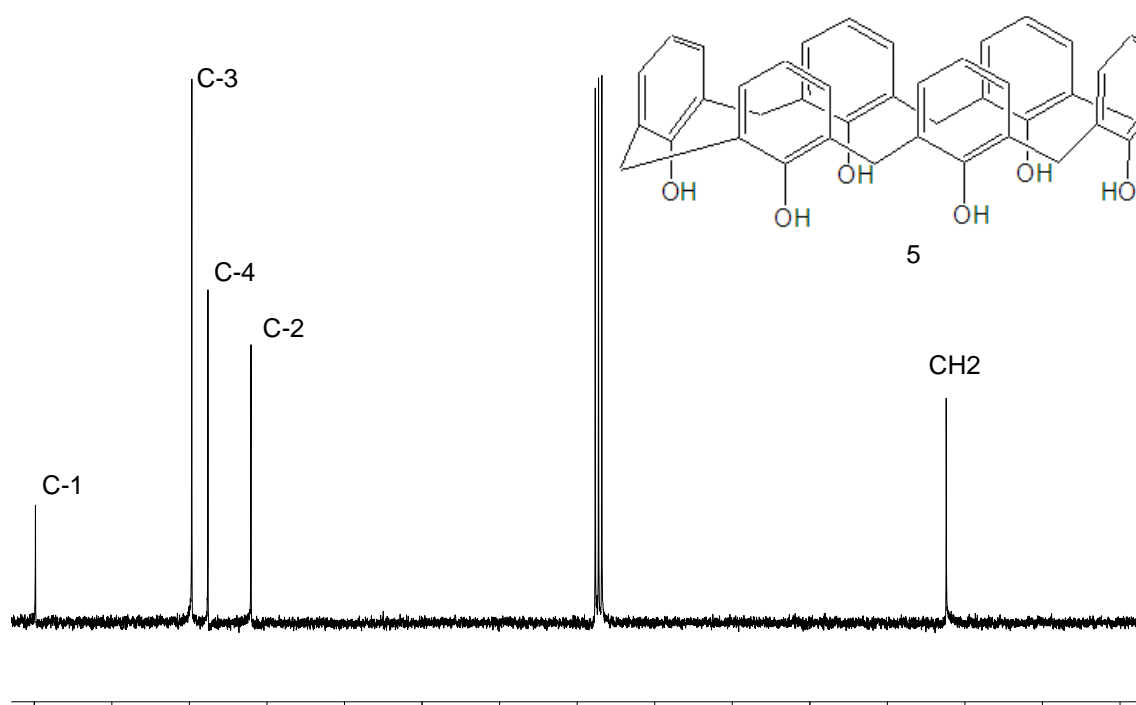


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00; 25 °C) do calix[6]areno.

5.6 - Síntese do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno

Após a obtenção do calix[6]areno, realizou-se a sulfonação, empregando como reagente ácido sulfúrico concentrado, com a mesma metodologia utilizada para o calix[4]areno. (**Esquema 5, pag. 21**).

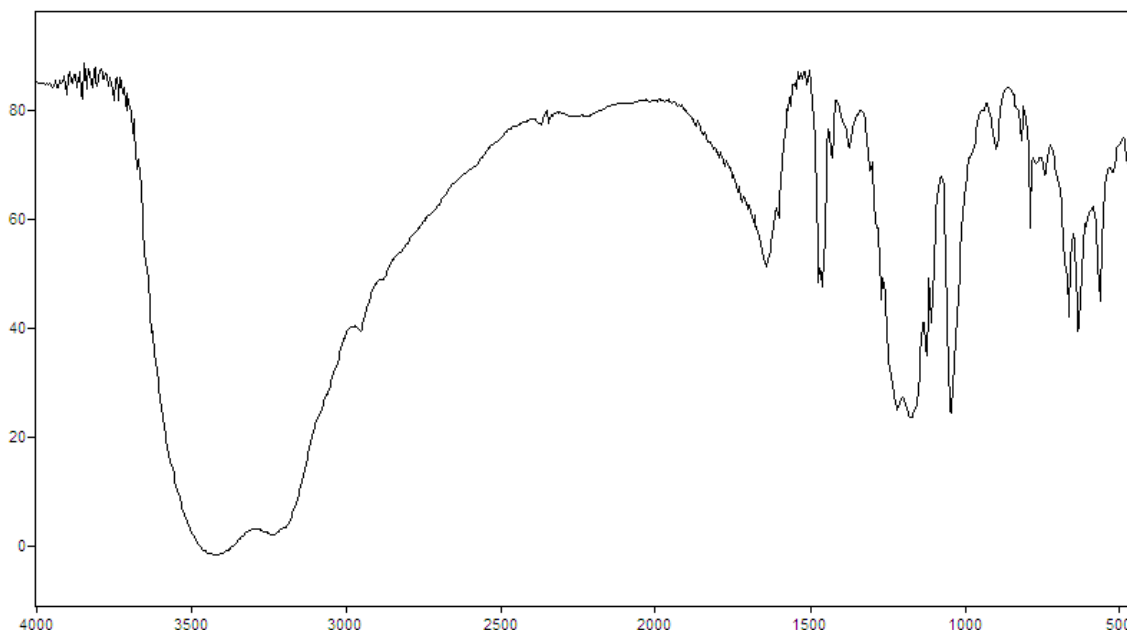


Figura 24 - Espectro no IV (pastilha de KBr) do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

Em 1167 cm^{-1} observa-se uma banda larga e forte, relativa ao estiramento da ligação S-O (Barbosa, 2007). Ao compararmos o espectro do composto obtido com o do calix[6]areno, observa-se que a banda referente ao estiramento da ligação O-H do grupo fenol sofreu alargamento e aumento na frequência de absorção para 3424 cm^{-1} . Como relatado na literatura, esta diferença se deve a mudanças conformacionais do calixareno, que por sua vez, influenciam no tipo e na intensidade da ligação de hidrogênio apresentada por estes compostos (Gutsche e Iqbal, 1989). Observaram-se mudanças também na região de $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, devido principalmente a mudanças no padrão de substituição dos anéis aromáticos.

No espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em $\delta\ 30,75$ é referente ao carbono metilênico (CH_2), o sinal em $\delta\ 126,37$ é referente a C-2, o carbono das posições *orto* no anel aromático; o sinal em $\delta\ 127,93$ é referente a C-3, carbono das posições *meta* no anel. Já o sinal em $\delta\ 135,17$ é referente a C-4, carbono das posições *para* no anel aromático ligado ao enxofre. Um sinal em $\delta\ 153,23$ referente à C-1, carbono que por estar diretamente ligado a hidroxila, se encontra mais desblindado.

O espectro de RMN de ^1H exibe um simpleto largo em δ 3,81, integrado para 12 hidrogênios, para os grupos metilênicos CH_2 e um simpleto largo em δ 7,31, integrado para 12 hidrogênios que são referentes aos hidrogênios H-3 do anel benzênicos. Como o solvente utilizado para se obter o espectro foi o D_2O , os hidrogênios ligados aos oxigênios (OH e SO_3H) sofrem troca química rápida para a escala de tempo da ressonância, ou seja, são rapidamente substituídos por deutério não apresentando sinais no espectro de RMN de ^1H .

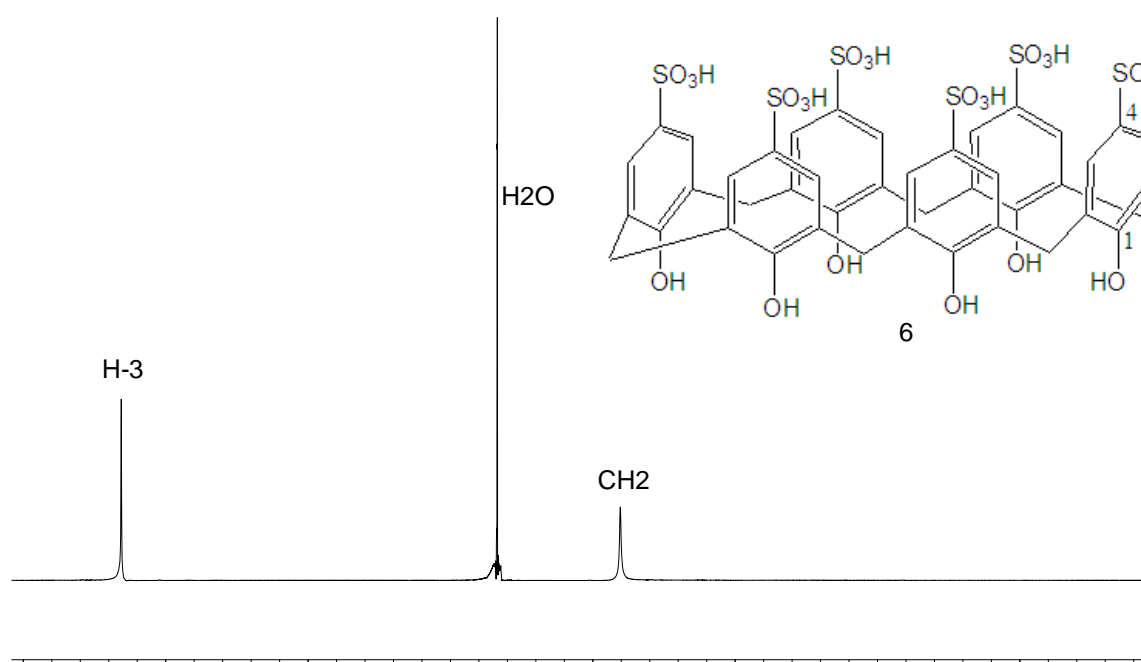


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

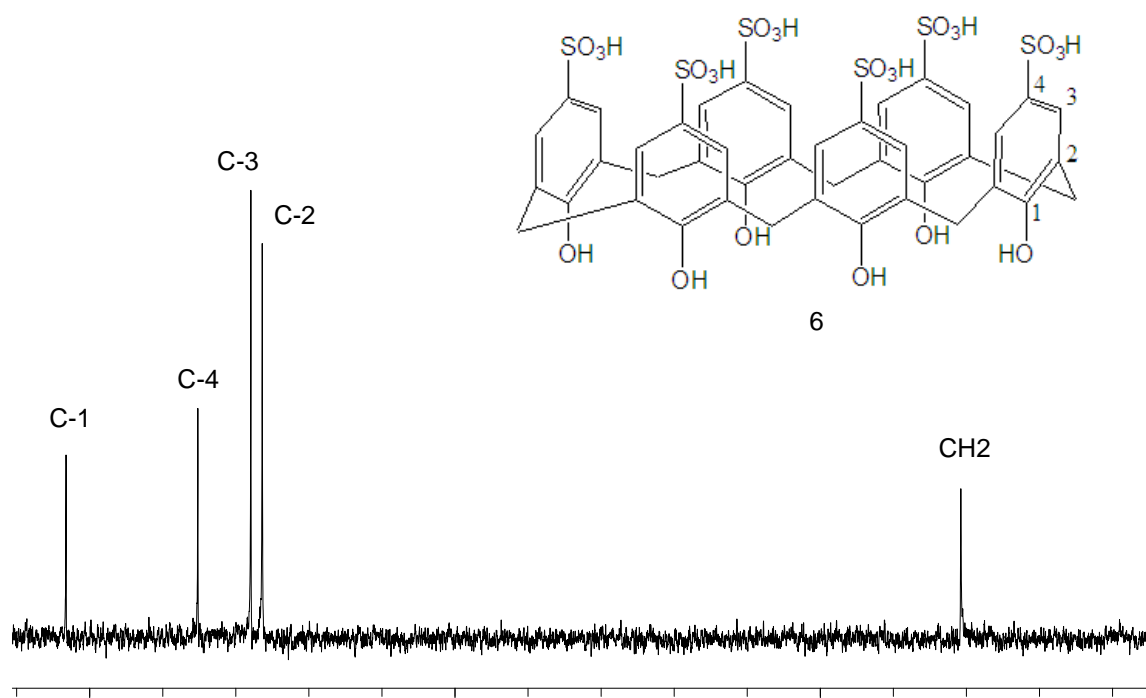
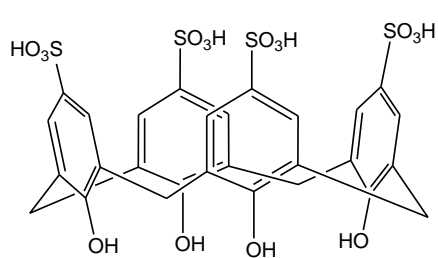


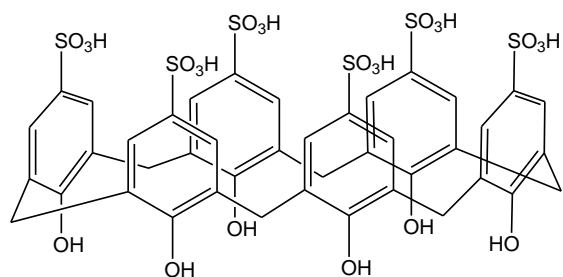
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹³C (75,459 MHz; H₂O; 25 °C) do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

6 – ESTUDOS DA COMPLEXAÇÃO ENTRE CALIXARENOS SULFONADOS E ANESTÉSICOS LOCAIS

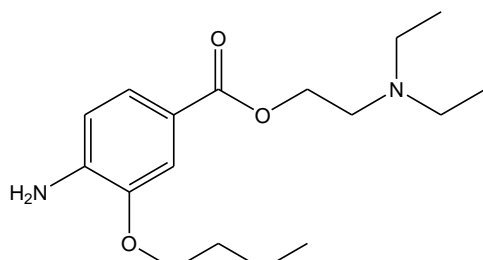
Nesta parte do trabalho foram estudados os anestésicos locais cloridrato de oxibuprocaína, tetracaína, benzocaína e proparacaína e os sistemas carreadores ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.



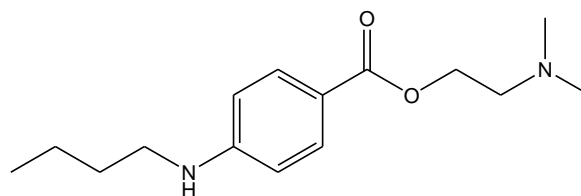
Ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (3)



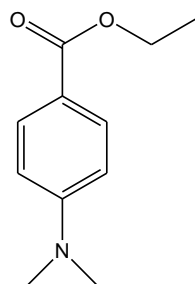
Ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (6)



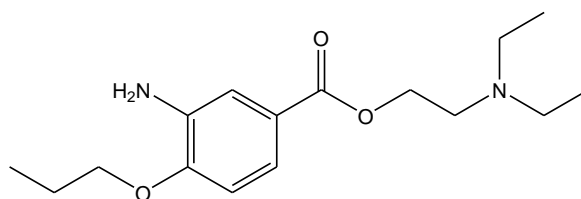
Oxibuprocaína (7)



Tetracaína (8)



Benzocaína (9)



Proparacaína (10)

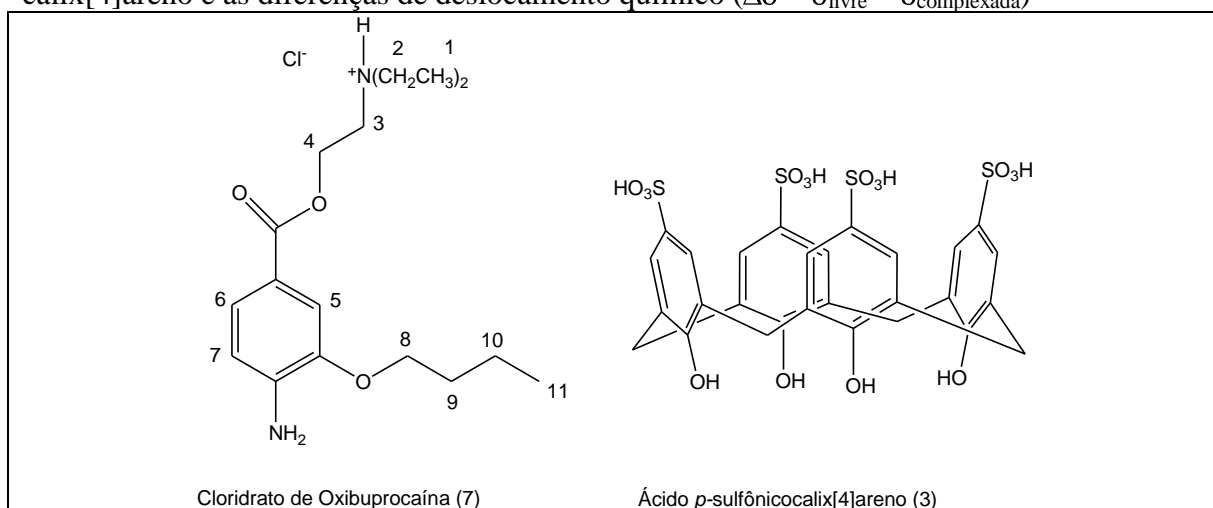
Figura 27 – Anestésicos Locais e sistemas carreadores utilizados nos estudos de RMN de ^1H .

6.1 - Complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e o cloridrato de oxibuprocaína

Como uma investigação preliminar foi avaliado a variação de deslocamento químico entre o complexo cloridrato de oxibuprocaína e ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, os hidrogênios que sofreram as maiores variações de deslocamento químico foram H-1, H-2, H-3, H-9, H-10 e H-11 ($\Delta\delta$ 0,87; 0,70; 0,35; 0,34 e 0,40), respectivamente, (**Tabela 1**) indicando interações entre o grupo amônio de 7 e o grupo o SO_3H de 3, e também entre o grupo alquil do éter de 7 com a cavidade de 3. Os

hidrogênios aromáticos H-5 e H-6 não foram avaliados devido a sobreposição dos mesmos com os hidrogênios do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno no complexo 1:1 (2 mmol L⁻¹).

Tabela 1 - Valores de deslocamento químico de RMN de ¹H do cloridrato de oxibuprocaína puro e do complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e as diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)



Hidrogênios	7	7/3	7/3
	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$
H-1	1,24	0,37	0,87
H-2	3,25	2,55	0,70
H-3	3,53	3,18	0,35
H-4	4,53	4,41	0,12
H-5	7,43	----	----
H-6	7,48	----	----
H-7	6,77	7,47	-0,70
H-8	4,03	3,95	0,08
H-9	1,69	1,40	0,29
H-10	1,38	1,04	0,34
H-11	0,84	0,44	0,40

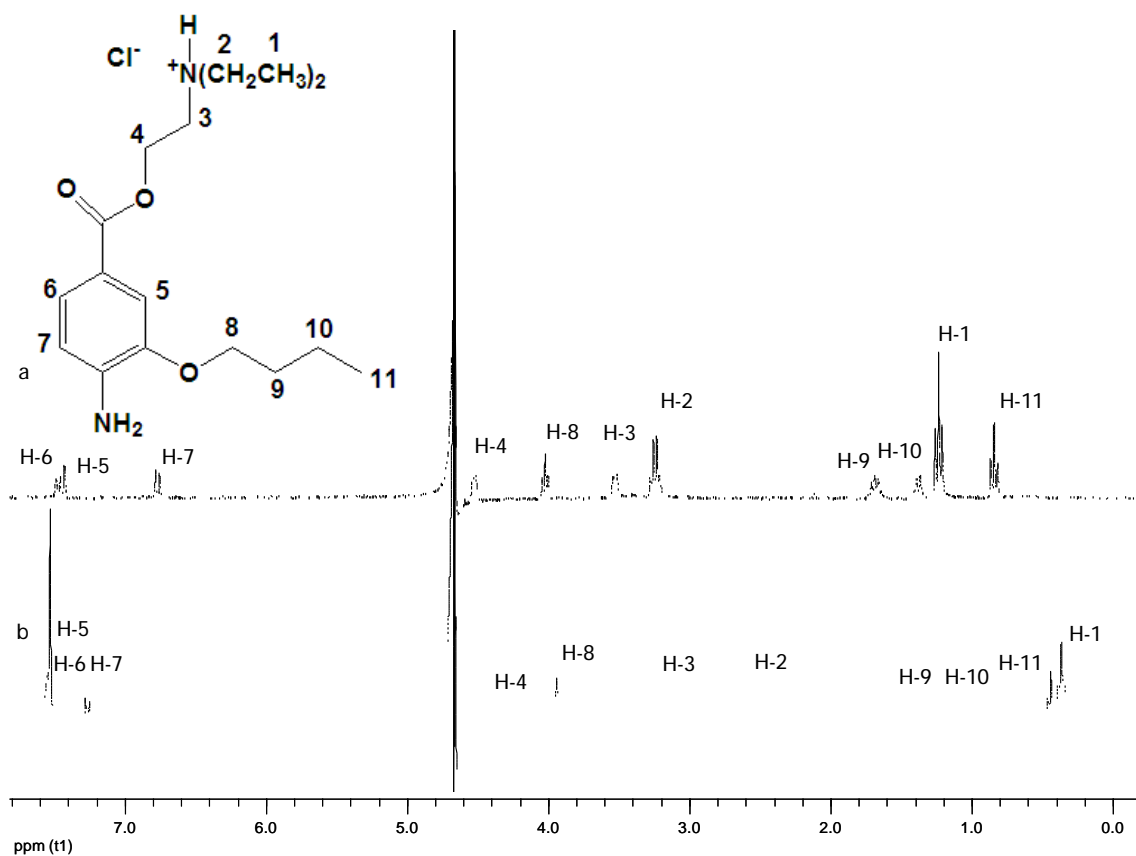


Figura 28 - Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; D₂O; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a**) cloridrato de oxibuprocaína puro e **b**) complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **7/3**.

Na tentativa de entender um pouco melhor o sistema formado (complexo **7/3**), realizamos a titulação por RMN de ¹H para o qual empregamos a variação de deslocamento químico versus a razão molar das espécies (método de Job), (Job, 1928). De acordo com o método de Job foi possível determinar a estequiometria do complexo entre o cloridrato de oxibuprocaína **7** e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3**, sendo a estequiometria do complexo de 1:1 conforme a **Figura 29**.

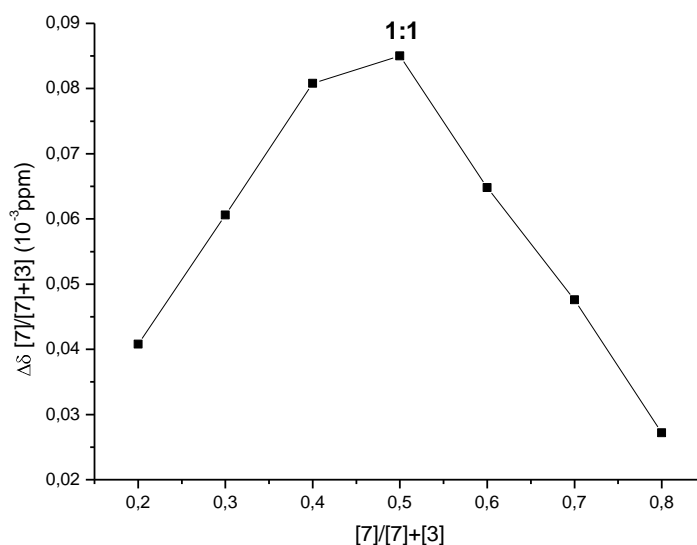


Figura 29 - Gráfico da titulação através do método de Job para o complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **7/3**.

Para entender melhor o tipo de associação entre o cloridrato de oxibuprocaína **7** e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3** realizamos experimentos de NOESY de ^1H . De acordo com os resultados de incremento de nOe observados entre H-**1** de **7** e os hidrogênios H-**3** de **3** (**Figura 30**), podemos propor que exista um equilíbrio entre as duas topologias propostas na **Figura 31** (Arantes et al. 2009; Fernandes et al. 2007). Apesar de observarmos grandes variações de deslocamento químicos (**Tabela 1** e **Figura 28**) não foi observado incrementos de nOe entre o restante da parte alquil do grupo amônio com **3** e nem entre o grupo éter com os hidrogênios do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3**. Estes resultados podem ser justificados devido a alta flexibilidade e/ou velocidade de interconversão entre uma conformação em cone do calixareno para outra conformação também em cone (Gutsche, 1998) o que dificulta a observação do efeito nuclear Overhauser, o mesmo depende da distância internuclear e do tempo de vida dos complexos (Gunther, 1994).

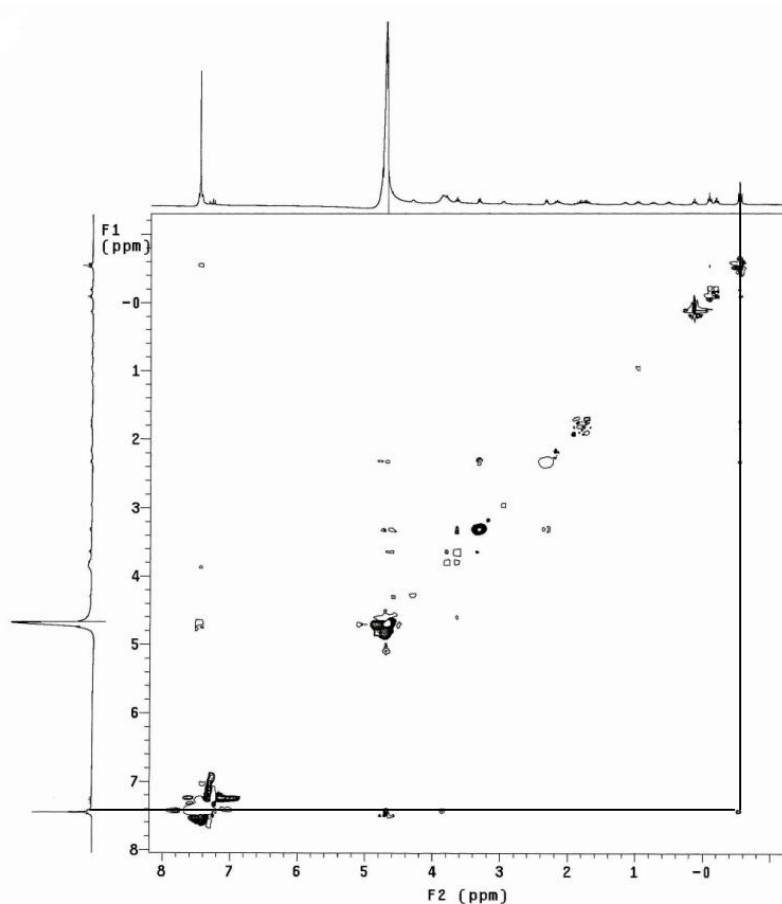


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **7/3**; 25 $^\circ\text{C}$). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de oxibuprocaína (20 mmol L^{-1}).

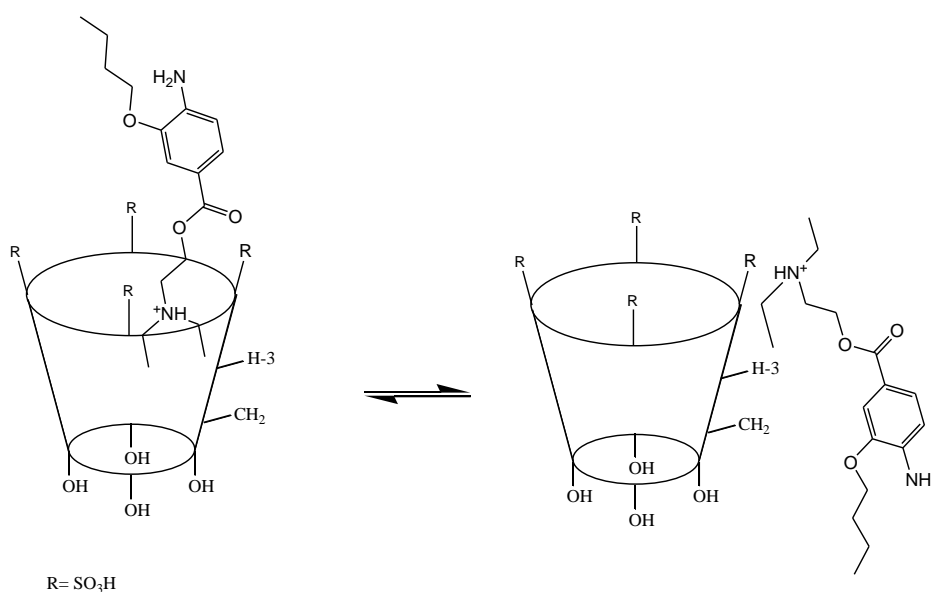


Figura 31 – Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **7/3**.

6.2 - Complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e o cloridrato de oxibuprocaína.

Para o complexo **7/6** observamos que os hidrogênios que sofreram as maiores variações de deslocamento químico foram os hidrogênios H-1, H-2, H-3 e H-8 ($\Delta\delta$ 0,58; 1,14; 1,04; 1,05, respectivamente), quando em contato com **6** (**Tabela 2** e **Figura 32**) o que nos dá indícios de uma interação forte entre o grupo amônio do cloridrato de oxibuprocaína **7** com os grupos SO₃H de **6**, e também foi observado uma variação significativa nos hidrogênios H-8 do grupo éter, sugerindo que esses hidrogênios interagem com o hospedeiro **6**. A variação de deslocamentos químicos dos hidrogênios H-5 e H-6 na região aromática não foram possíveis de serem avaliados, devido à sobreposição dos sinais com o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno.

Tabela 2 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H do cloridrato de oxibuprocaína puro e do complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

	7	7/6	7/6
Hidrogênios	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$
H-1	1,24	0,66	0,58
H-2	3,25	2,11	1,14
H-3	3,53	2,49	1,04
H-4	4,53	4,17	0,36
H-5	7,43	----	----
H-6	7,48	----	----
H-7	6,77	7,47	-0,70
H-8	4,03	2,97	1,05
H-9	1,69	1,37	0,32
H-10	1,38	1,02	0,36
H-11	0,84	0,48	0,36

Através do método de Job foi possível determinar a estequiometria do complexo entre o cloridrato de oxibuprocaína **7** e o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6**, sendo de 1:1 conforme **Figura 33**.

De acordo com o espectro de NOESY podemos observar incrementos de nOe entre o hidrogênio H-1 do anestésico **7** e os hidrogênios H-3 e CH_2 de **6**. Os resultados de nOe foram confrontados com os dados de variação de deslocamento químico e estequiometria do complexo **7/6** e com estes dados foi possível propor a topologia apresentada na **Figura 35**.

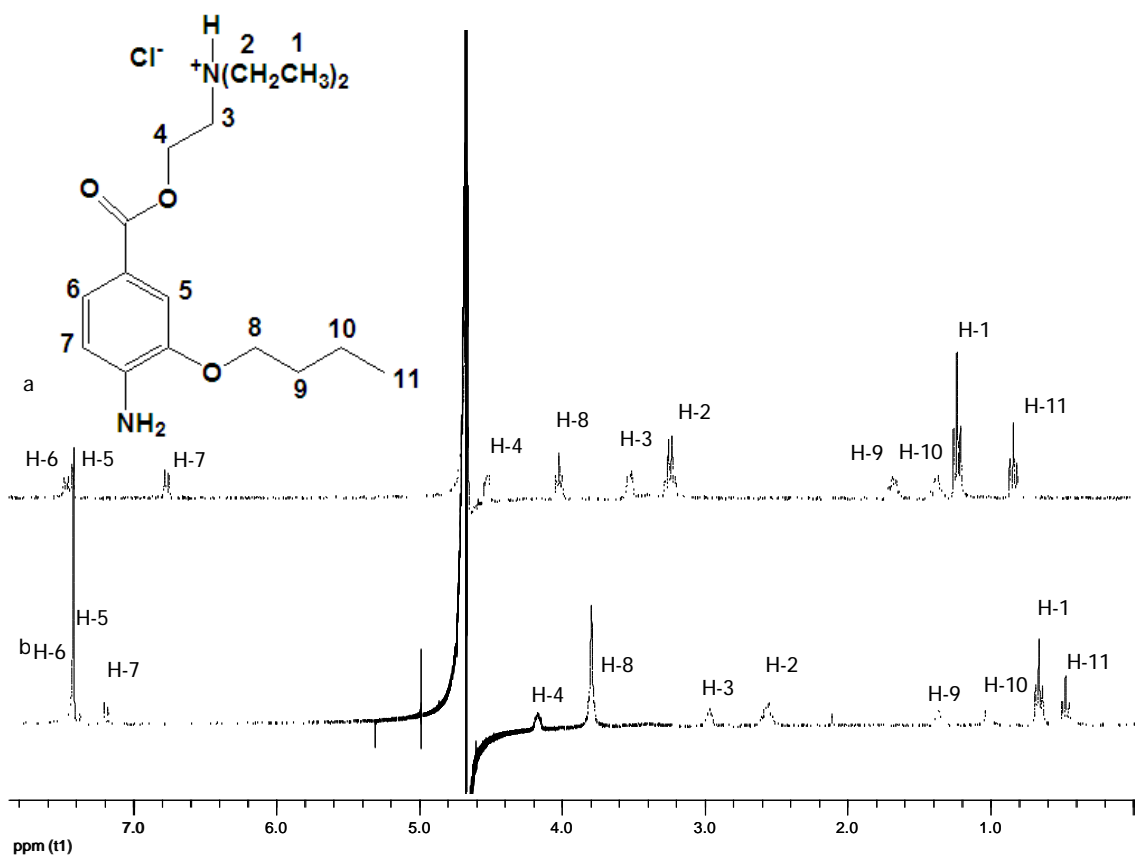


Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a**) cloridrato de oxibuprocaína pura e **b**) complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **7/6**.

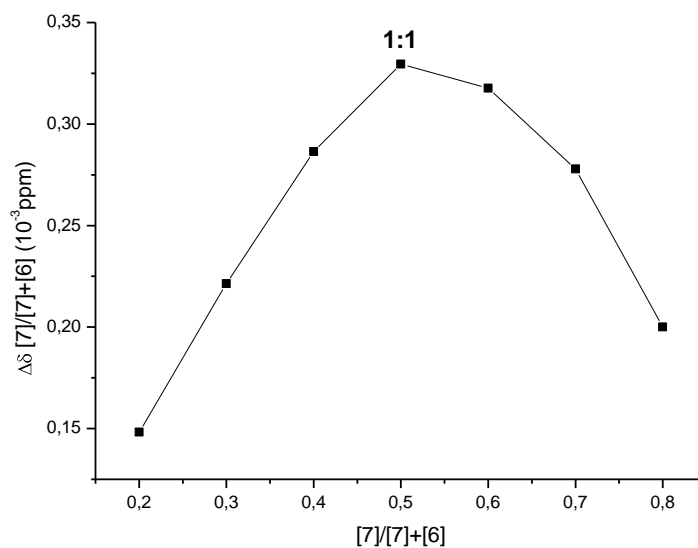


Figura 33 – Curva de titulação através do método de Job para o complexo cloridrato de oxibuprocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **7/6**.

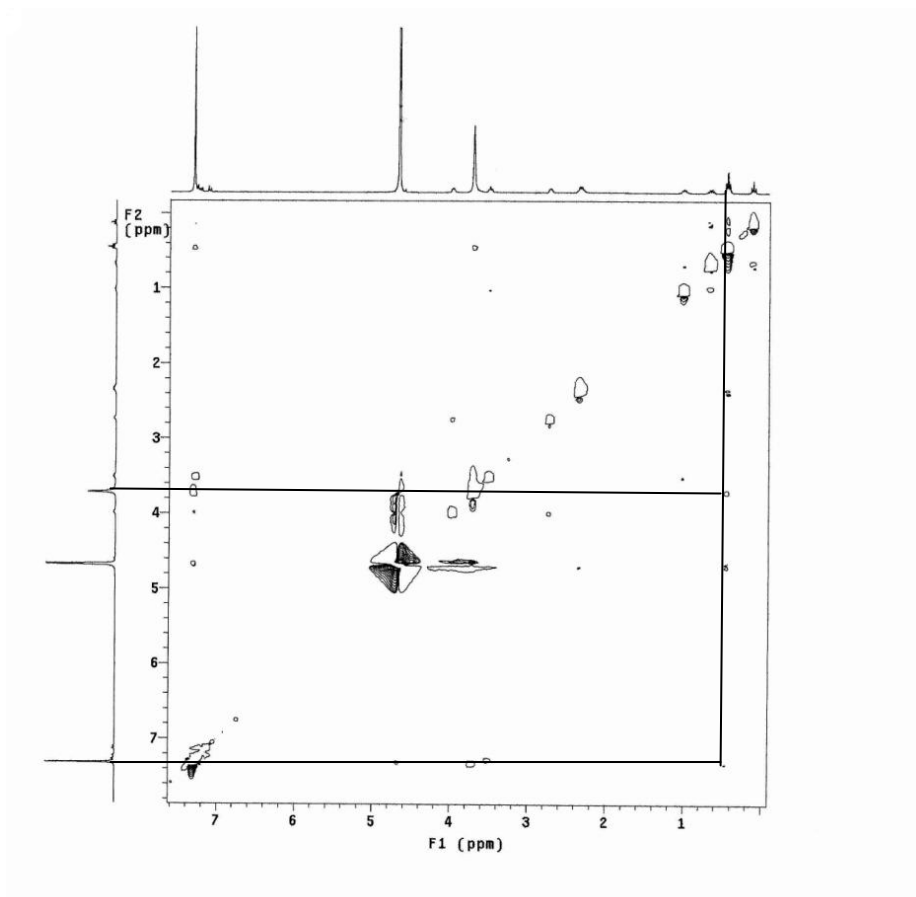


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,67; complexo **7/6**; 25 $^\circ\text{C}$). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de oxibuprocaína (20 mmol L^{-1}).

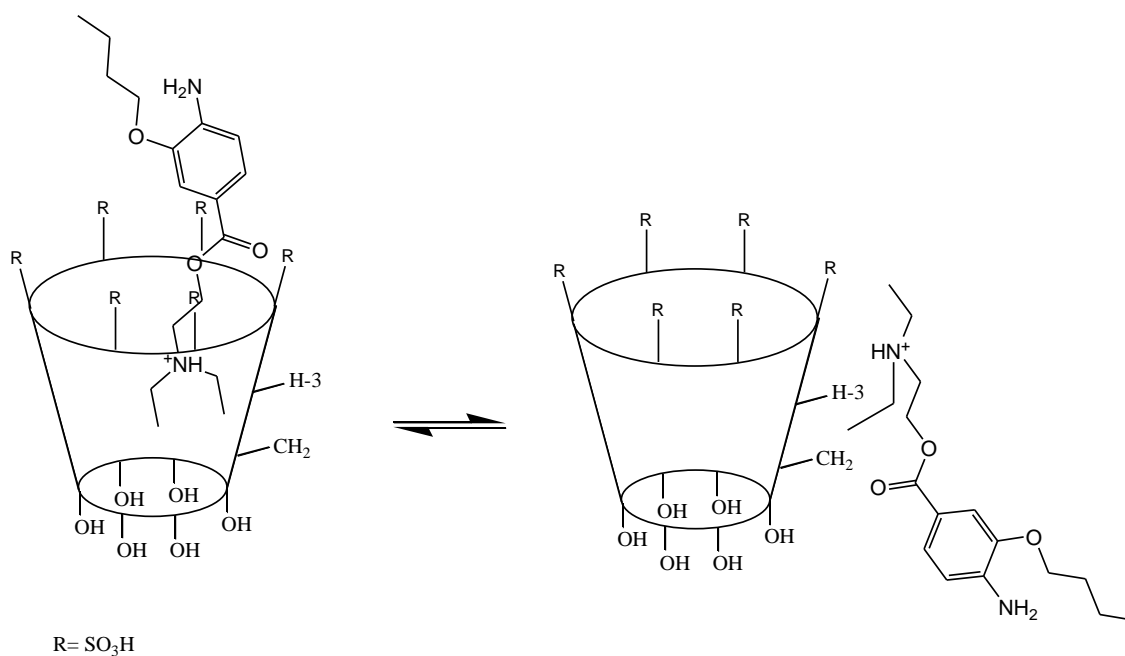


Figura 35 – Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **7/6**.

Na tentativa de realizar a complexação do anestésico local cloridrato de oxibuprocaína com os dois sistemas carreadores ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno, foram realizados estudos da variação de deslocamento químicos, determinação da estequiometria e proposta das respectivas topologias suportados em incrementos de nOe. De acordo com estes dados observamos que a maior diferença foi observada em relação ao complexo **7/6** onde tivemos incrementos de nOe entre H-1 de **7** e CH₂ de **6**. No complexo **7/6** também foi observado uma variação de deslocamento químico bastante significativa do hidrogênio H-8 $\Delta\delta = 1,05$ o que não foi observado para o H-8 no complexo **7/3** ($\Delta\delta = 0,08$).

6.3 - Complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e o cloridrato de tetracaína

A primeira avaliação da formação do complexo entre cloridrato de tetracaína e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, foi realizada analisando-se a variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos hidrogênios do complexo cloridrato de tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **8/3**, relativo ao cloridrato de tetracaína pura. De acordo com os espectros (**Figura 36**) da tetracaína pura e do complexo **8/3** podemos observar que os hidrogênios que sofreram a maior influência do hoppedeiro foram H-2, H-3, H-6, H-7, H-8, H-4'e H-6' ($\Delta\delta$ -0,27; -0,74; 0,44; 0,89; 0,34; 0,56 e 1,07) quando em contato com **3** (**Tabela 3**) o que nos dá indícios de uma interação forte entre o grupo amônio da cadeia alifática. Como já observado para os complexos descritos anteriormente os hidrogênios da porção éter também sofreram variações nos deslocamentos químicos bastante significativas.

Tabela 3 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H da tetracaína pura e do complexo cloridrato de tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

	8	8/3	8/3
Hidrogênios	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$
H-2	7,71	7,98	-0,27
H-3	6,59	7,33	-0,74
H-5	3,01	2,99	0,02
H-6	1,43	0,99	0,44
H-7	1,22	0,33	0,89
H-8	0,74	0,40	0,34
H-3'	4,45	4,25	0,20
H-4'	3,45	2,89	0,56
H-6'	2,90	1,83	1,07

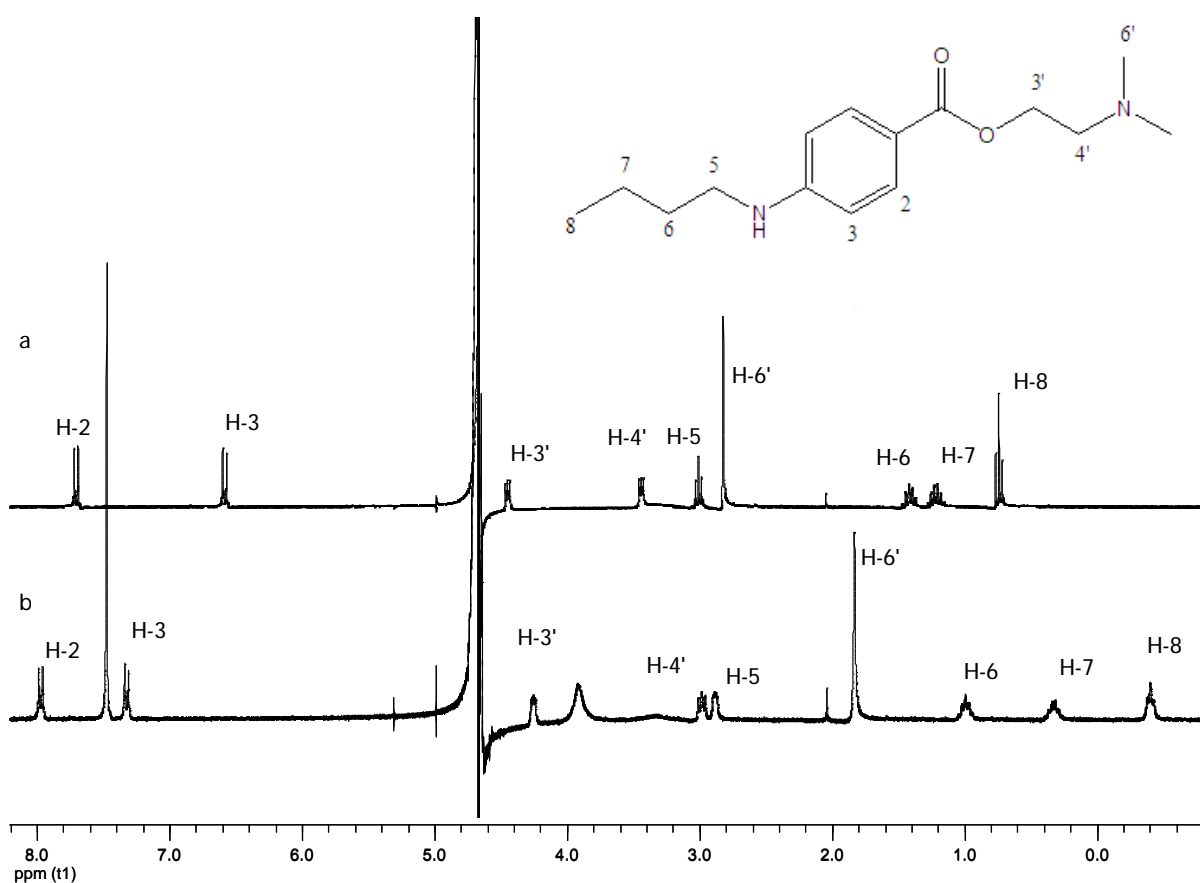


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a)** cloridrato de tetracaína pura e **b)** complexo cloridrato de tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **8/3**.

Realizando a titulação por RMN de ^1H empregando o método de Job observamos de acordo com a **Figura 37** que a estequiometria do complexo **8/3** é de 1:1. Uma explicação para o método de Job não ter definido muito bem a estequiometria de complexação, pode ser a existência da formação de agregados de tetracaína conforme descritos por (Fernandez, et al.1981; Schreier et al. 2000), havendo uma disputa entre o complexo e a forma agregada do sal de tetracaína.

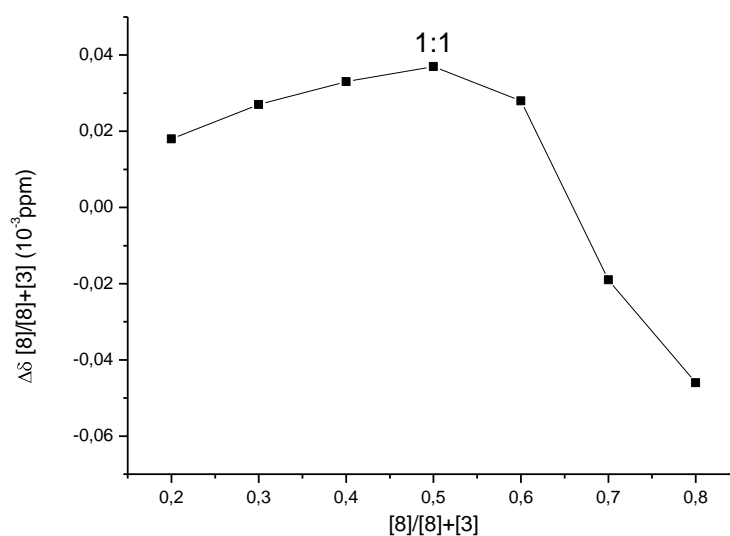


Figura 37 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo tetracaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **8/3**.

De acordo com o espectro de NOESY (**Figura 38**) pudemos observar incrementos de nOe entre os hidrogênios H-2, H-3, H-3' e H-6 do cloridrato de tetracaína e o hidrogênio H-3 do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno. De acordo com os dados de incremento de nOe, variação de deslocamento químico e estequiometria podemos propor que a arquitetura do complexo **8/3** seja a proposta na **Figura 39**.

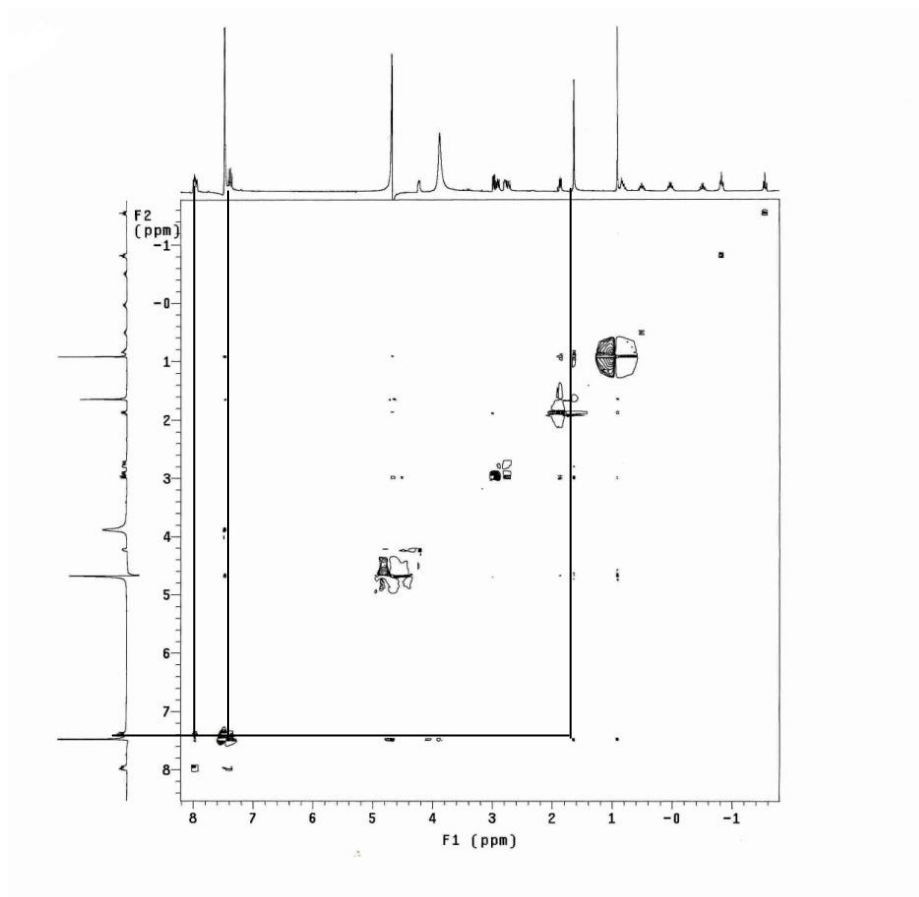


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,67; complexo **8/3**; 25°C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de tetracaína (20 mmol L^{-1}).

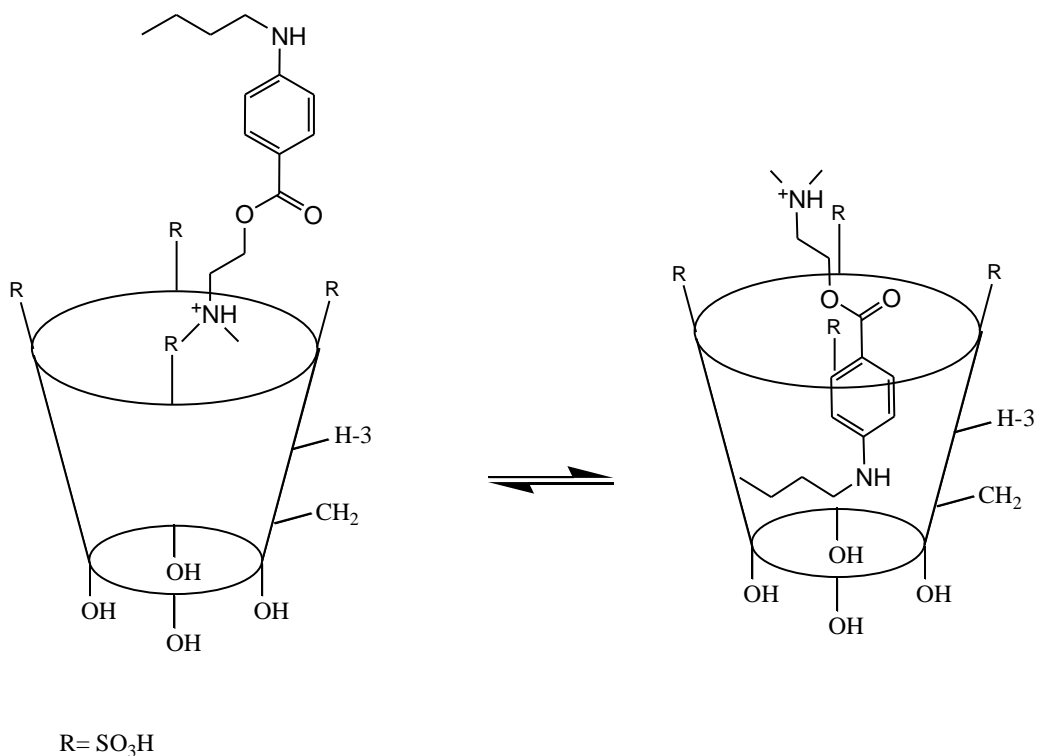


Figura 39 – Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e incrementos de nOe do complexo **8/3**.

O complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e o cloridrato de tetracaína já foi publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Grupo de Química Supramolecular e Biomimética), na revista *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57, 395.

Na complexação do anestésico local cloridrato de tetracaína com o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, foi realizado estudos da variação de deslocamento químicos, determinação da estequiometria e proposta da respectiva topologia suportado por dados de incremento de nOe . De acordo com estes dados observamos que a diferença maior com relação a publicação de Fernandes *et al.* (2007) foi nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anestésico quando em contato com o hospedeiro **3** causando uma variação de deslocamento químico muito mais efetiva. Já a estequiometria dos complexos e a topologia proposta são bastante similares.

6.4 - Complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a benzocaína

Com a complexação entre a benzocaína e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **9/3**, podemos perceber que os hidrogênios do anestésico **9** que sofreram as maiores influências da presença do hospedeiro **3** foram os hidrogênios H-**3**, H-**3'** e H-**4'** ($\Delta\delta$ - 0,61; 0,41; 0,67, **Figura 40** e **Tabela 4**). Estas variações de deslocamento químico nos dão indícios de que a porção alquil éster e a porção aromática estão inseridas na cavidade do hospedeiro **3**.

Tabela 4 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H da benzocaína pura e do complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e as diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

	9	9/3	9/3
Hidrogênios	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$
H-2	7,75	7,95	-0,20
H-3	6,72	7,33	-0,61
H-3'	4,23	3,82	0,41
H-4'	1,25	0,58	0,67

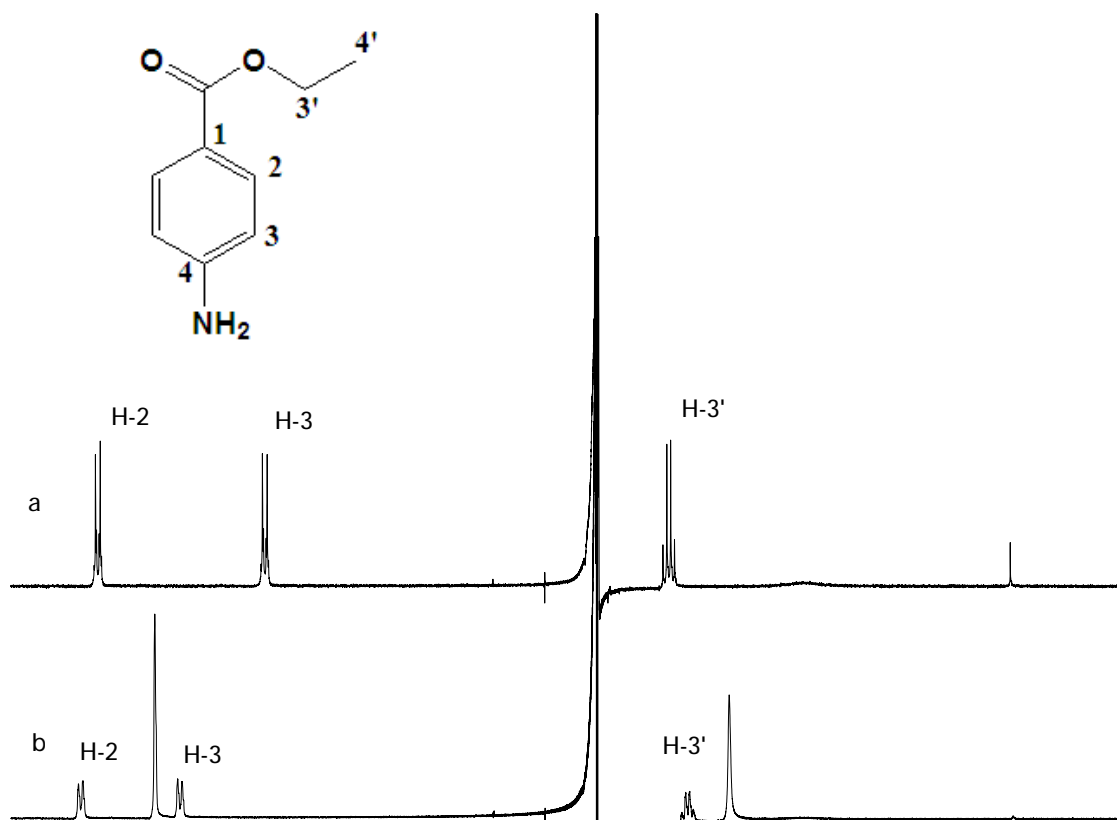


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) a) benzocaína pura e b) complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **9/3**.

Através do método de Job foi possível determinar a estequiometria do complexo entre a benzocaína **9** e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3**, sendo a mesma de 1:1 conforme **Figura 41**.

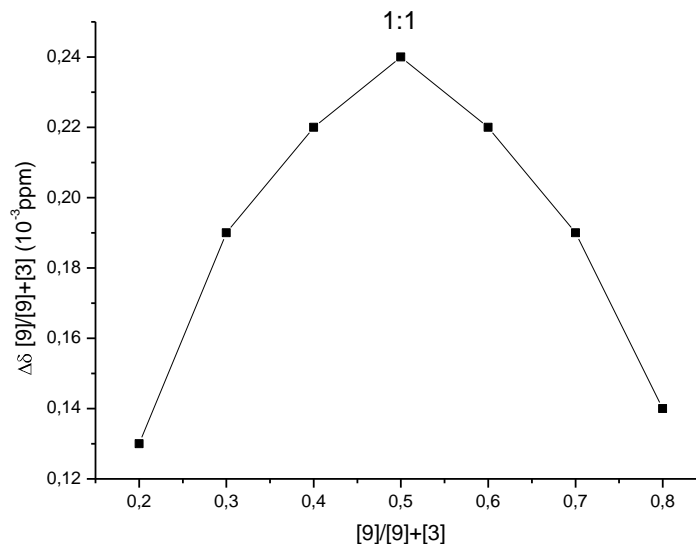


Figura 41 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **9/3**.

De acordo com o espectro de NOESY (**Figura 42**) foram observados incrementos de nOe entre os hidrogênios H-2 e H-3 da benzocaína **9** e os hidrogênios H-3 do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3**. Com as informações obtidas com os dados de incrementos de nOe, variação de deslocamento químico e estequiometria do complexo podemos propor a topologia do complexo **9/3** (**Figura 43**).

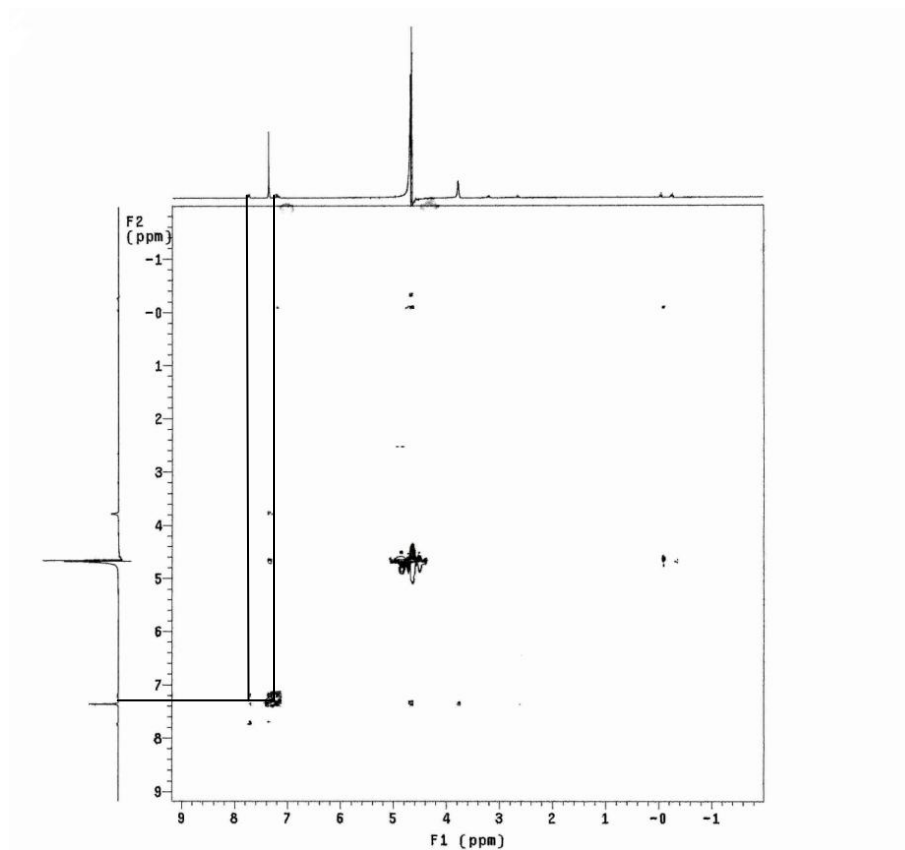


Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **9/3**; 25 $^\circ\text{C}$). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e benzocaína (20 mmol L^{-1}).

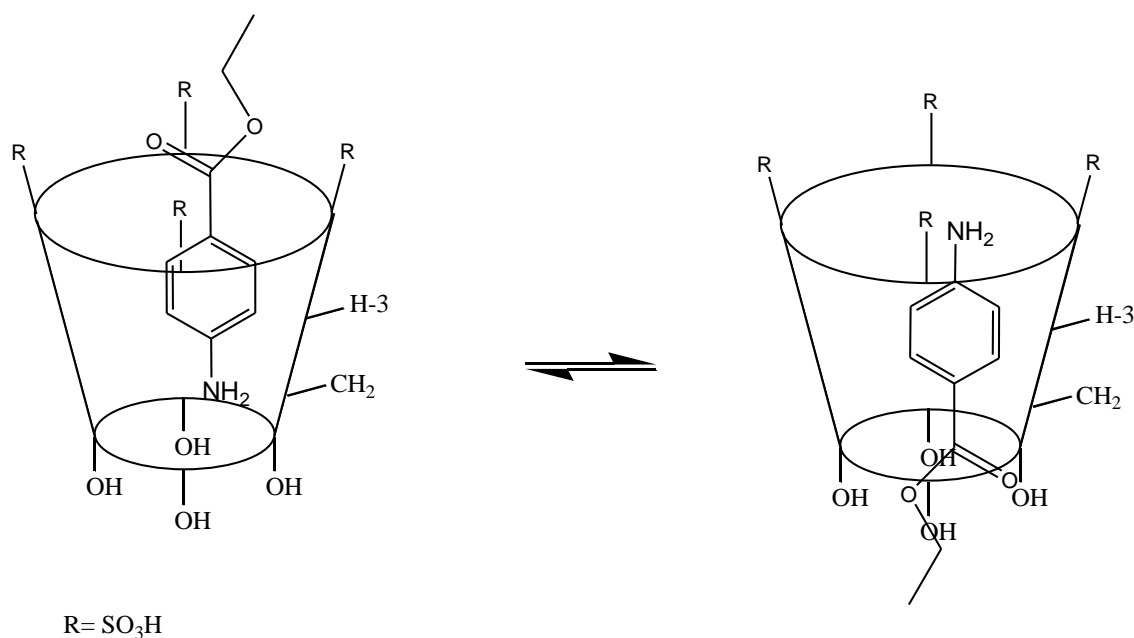


Figura 43 – Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **9/3**.

6.5 - Complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e a benzocaína

A complexação da benzocaína **9** com o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6** indicam que os hidrogênios do anestésico que sofreram as maiores variações de deslocamento químico na presença de **6** foram H-4', H-3' e H-3 ($\Delta\delta$ 0,25; 0,16; -0,51) (Tabela 5 e Figura 44). De acordo com as variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anestésico **9** nos dá indícios que o anestésico **9** com a porção alquil éster e também a porção aromática estão inseridas na cavidade do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6**.

Tabela 5 - Valores de deslocamento químico de RMN de ^1H da benzocaína pura e do complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

	9	9/6	9/6
Hidrogênios	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$
H-2	7,75	7,83	-0,08
H-3	6,72	7,23	-0,51
H-3'	4,23	4,07	0,16
H-4'	1,25	1,00	0,25

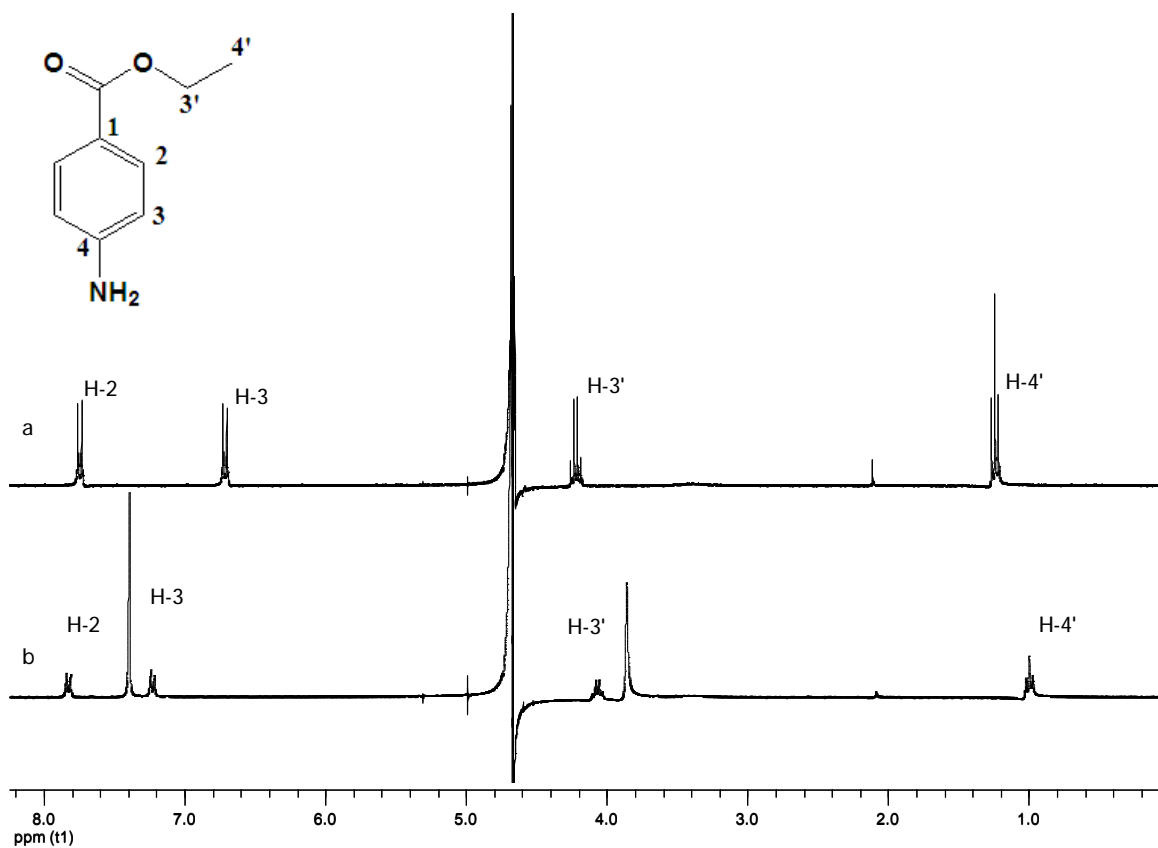


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a)** benzocaína pura e **b)** complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **9/6**.

Através do método de Job foi possível determinar a estequiometria do complexo entre a benzocaína **9** e o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6**, sendo a estequiometria predominante de 1:1 conforme **Figura 45**.

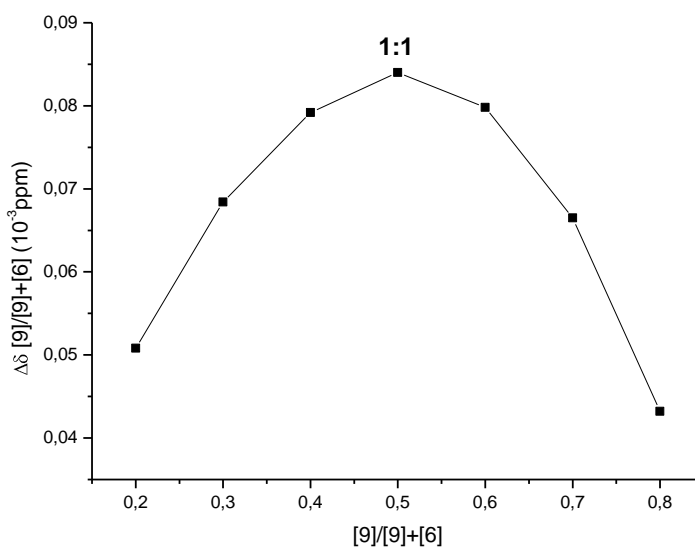


Figura 45 - Curva de titulação através do método de Job para o complexo benzocaína/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **9/6**.

Interpretando os dados obtidos com os espectros de NOESY (**Figura 46**) foi possível observar incrementos de nOe entre os hidrogênios H-2 e H-3 da benzocaína **9** e os hidrogênios H-3 do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6**. Também pudemos observar incrementos de nOe entre o hidrogênio H-4' da benzocaína **9** com CH₂ do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6**. Uma vez com os dados de incremento de nOe, variação de deslocamento químico e estequiometria podemos propor a topologia do complexo **9/6** (**Figura 47**).

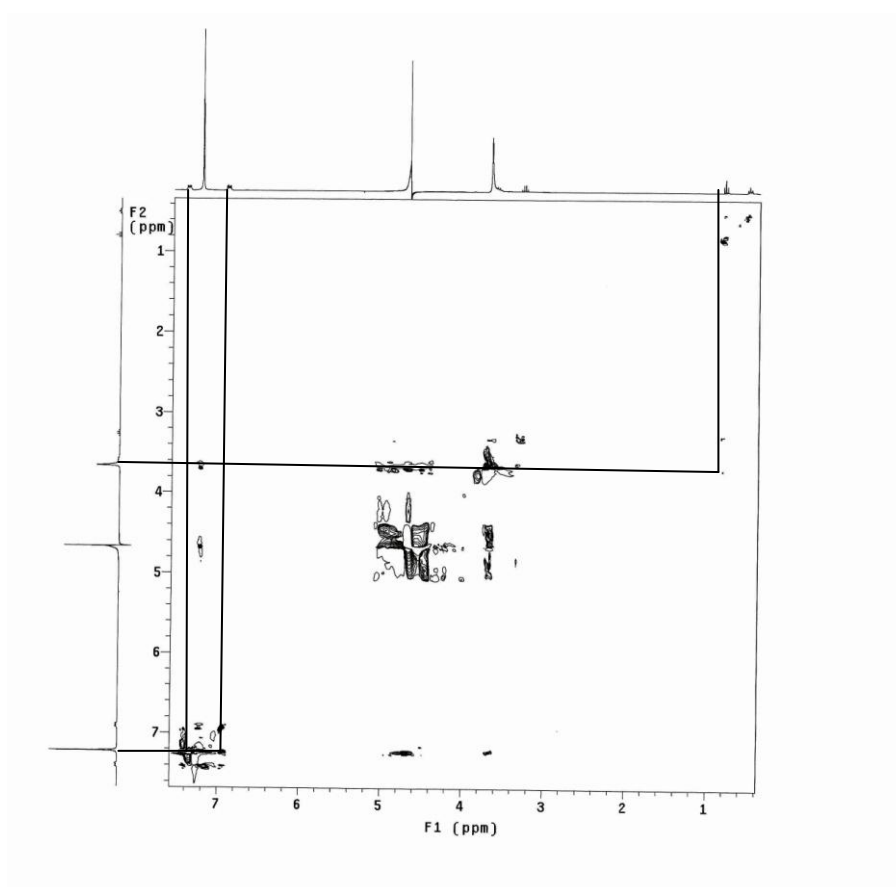
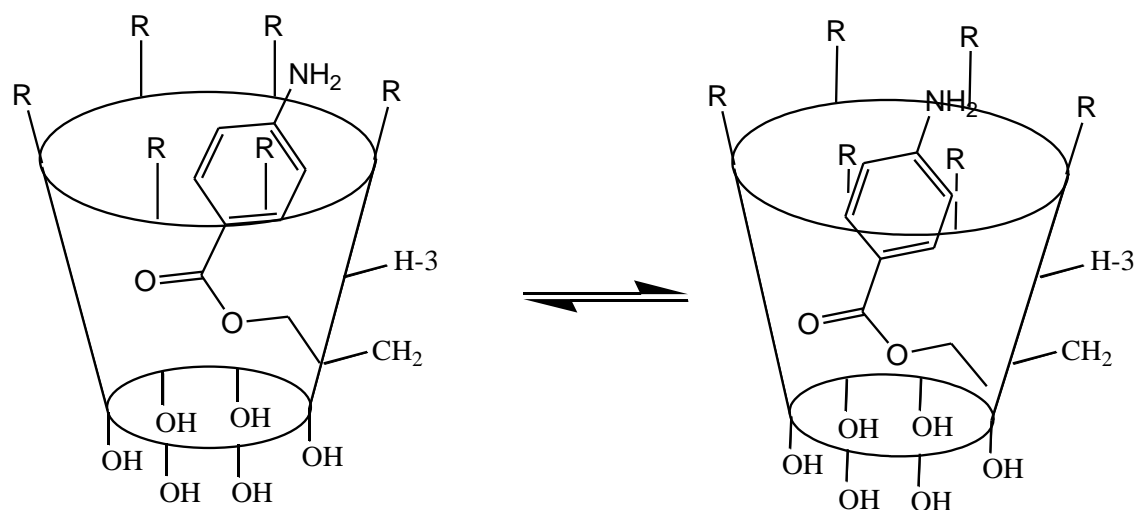


Figura 46 - Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; D₂O; δ_{HDO} 4,67; complexo **9/6**; 25 °C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (40 mmol L⁻¹) e benzocaína (20 mmol L⁻¹).



R= SO₃H

Figura 47 – Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **9/6**.

Ao realizar a complexação do anestésico local benzocaína com os dois sistemas carreadores ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno observamos que houve incrementos de nOe entre os hidrogênios H-4 do anestésico benzocaína **9** e CH₂ do hospedeiro ácido *p*-sulfônico calix[6]areno **6**. Já os dados de variação de deslocamento químico e estequiometria foram muito similares para os dois complexos.

6.6 - Complexo entre o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e o cloridrato de proparacaína

A avaliação da formação do complexo entre o cloridrato de proparacaína e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, foi realizada empregando primeiramente a variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos hidrogênios do cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, relativo ao cloridrato de proparacaína pura. De acordo com a complexação do cloridrato de proparacaína **10** com o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3** os hidrogênios do anestésico **10** que mais são afetados pela presença do hospedeiro são

H-2, H-6, H-9, H-10, H-4', H-6' e H-7' ($\Delta\delta$ -0,52; -0,55; 0,48; 0,91; 0,51; 0,99 e 0,79, respectivamente **Tabela 6** e **Figura 48**). Observando estas variações de deslocamento químico podemos verificar indícios de uma interação forte entre o grupo amônio da proparacaína e o grupo SO₃H de **3**, mas também verificamos variações de deslocamento químico significativas dos hidrogênios da porção alqui éter do cloridrato de proparacaína **10** indicando que esta porção também sofre influência do hospedeiro.

Tabela 6 - Valores de deslocamento químico de RMN de ¹H do cloridrato de proparacaína pura e do complexo cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e a diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$)

	10	10/3	10/3
Hidrogênios	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexada}}$
H-2	7,38	7,90	-0,52
H-5	6,93	7,08	-0,15
H-6	7,45	8,00	-0,55
H-8	4,02	3,79	0,23
H-9	1,73	1,25	0,48
H-10	0,92	-0,01	0,91
H-3'	4,54	4,33	0,21
H-4'	3,53	3,02	0,51
H-6'	3,25	2,26	0,99
H-7'	1,24	0,45	0,79

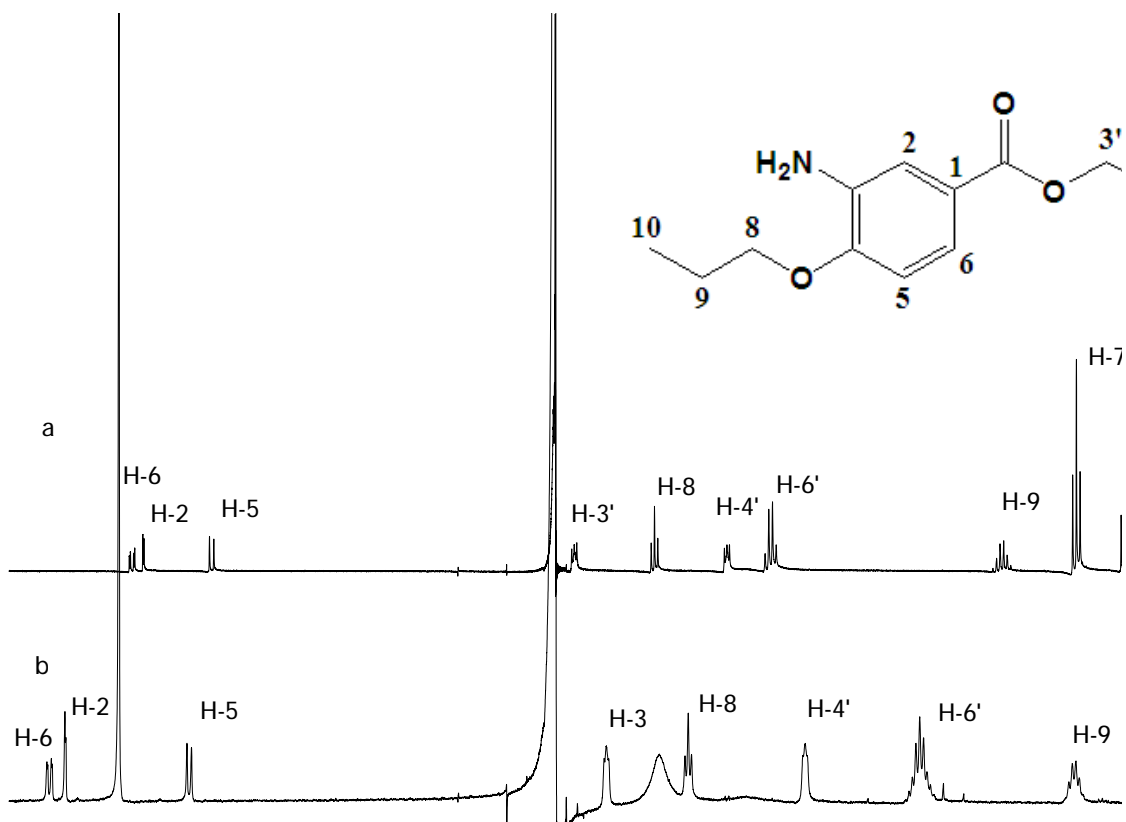


Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; 25 °C) **a)** cloridrato de proparacaína pura e **b)** complexo cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **10/3**.

Realizado a titulação por RMN de ^1H e empregando o método de Job observamos de acordo com a **Figura 49** que a estequiometria predominante para o complexo **10/3** é de 1:1. Uma explicação para o método de Job não ter definido muito bem a estequiometria de complexação, pode ser a existência da formação de agregados do cloridrato de proparacaína **10**, o que já foi relatado para o cloridrato de tetracaína **8** (Fernandez, et *al.* 1981; Schreier et *al.* 2000), o que poderia causar uma disputa entre a formação do complexo e a forma agregada do cloridrato de proparacaína.

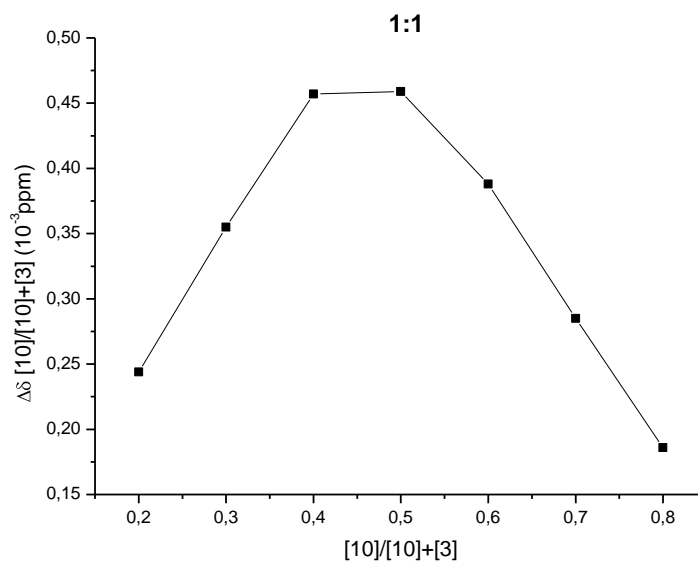


Figura 49 – Gráfico da titulação através do método de Job para o complexo de cloridrato de proparacaína/ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **10/3**.

De acordo com os dados de NOESY (**Figura 50**) pode-se observar incrementos de nOe entre os hidrogênios H-2 e H-4' do anestésico **10** com os hidrogênios H-3 do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3**. Também foi observado incrementos de nOe entre o hidrogênio H-8 do anestésico **10** com os hidrogênios CH₂ do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno **3**. De posse das informações de incrementos de nOe, estequiometria do complexo e variações nos deslocamento químicos de hidrogênios, foi proposto a topologia do complexo **10/3** como sendo a da **Figura 51**.

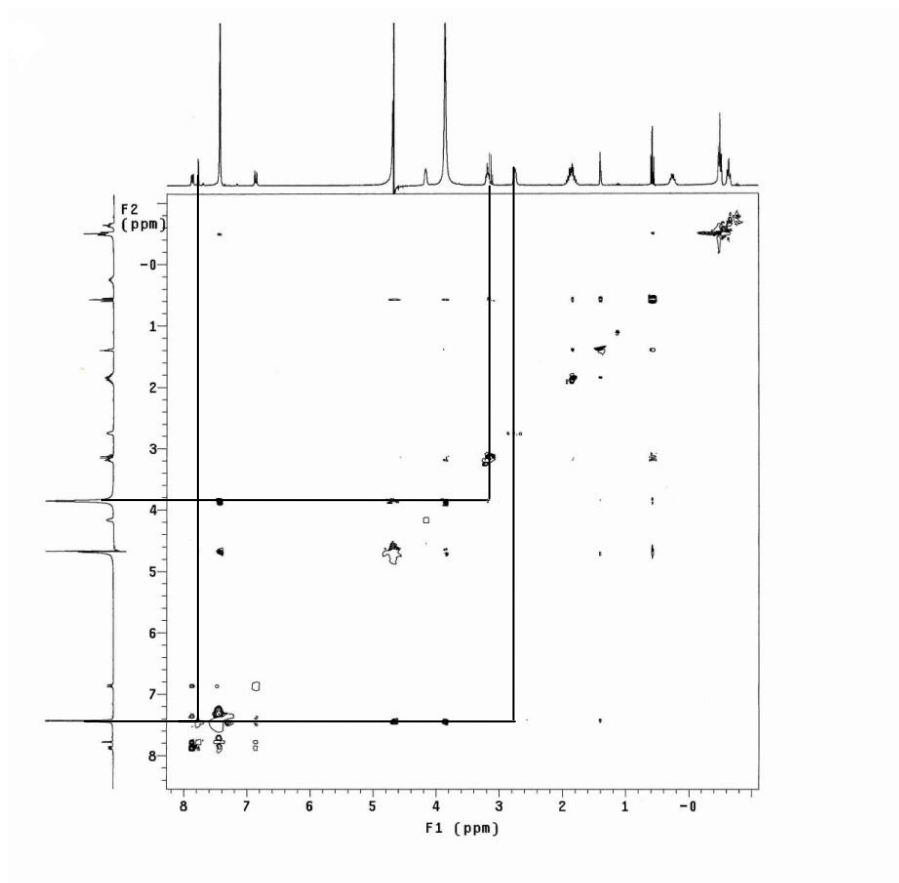
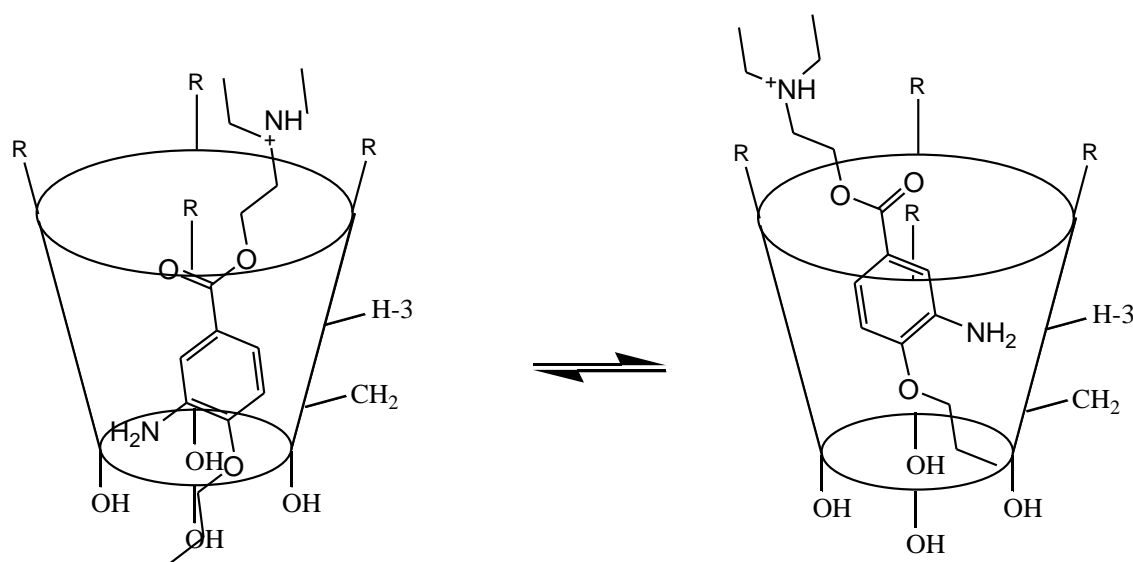


Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67; complexo **10/3**; 25 °C). Experimento de NOESY do complexo ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (40 mmol L^{-1}) e cloridrato de proparacaína (20 mmol L^{-1}).



$\text{R} = \text{SO}_3\text{H}$

Figura 51 – Topologia proposta baseado nos dados de variação de deslocamento químico, estequiometria e nOe do complexo **10/3**.

A complexação do anestésico local cloridrato de proparacaína com o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno, foram realizadas e estes dados já encontram-se publicados Arantes *et al.* **2009**, 47, 757-763 (publicação encontra-se em anexo). O complexo entre o cloridrato de proparacaína e o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno demonstrou resultados muito próximos dos publicado por Arantes *et al.* (2009).

7 - CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados 6 calixarenos, dos quais dois são solúveis em água. Os calixarenos solúveis em água, são os ácido *p*-sulfônico calix[4]areno e ácido *p*-sulfônico calix[6]areno, que foram empregados como hospedeiros moleculares para quatro anestésicos locais.

A técnica empregada para avaliar os complexos supramoleculares (hóspede-hospedeiro) foi a ressonância magnética nuclear de ^1H que se mostrou como uma ferramenta eficiente para entender melhor os vários aspectos dos complexos formados. Empregando a RMN de ^1H foi possível determinar a estequiometria dos complexos empregando o método de Job onde foi observado que todos os complexos apresentaram estequiometria de 1:1 para todos anestésicos locais empregados aos dois hospedeiros. A topologia dos complexos foi determinada por experimentos de NOESY, revelando que as forças que atuam na complexação são diferentes: interações hidrofóbicas e par-iônico.

Outra técnica fundamental neste trabalho foi a difusão por RMN através da qual determinou-se os coeficientes de difusão das espécies puras e do complexo formado, sendo também obtido de maneira indireta a porcentagem de população complexada ($\%p_{\text{compl}}$) e a constante de associação aparente (K_{ap}).

Na tentativa de racionalizar estes dados pode-se concluir que foram obtidos complexos do tipo hóspede-hospedeiro em solução e que os hospedeiros moleculares empregados se mostraram bastante promissores como veículos de encapsulamento.

Fica claro que a versatilidade e limitações dos calixarenos como veículos de encapsulamento de anestésicos locais devem ser melhor investigados realizando-se os testes de toxicidade, e de liberação controlada.

8 - PARTE EXPERIMENTAL

8.1 – Instrumentação e Condições

8.1.1 – Espectroscopia no infravermelho

Todos os espectros no infravermelho foram realizados em espectrofotômetro PERKIM ELMER SPECTRUM 1000 (Departamento de Química – UFV).

8.1.2 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos unidimensionais de RMN foram realizados em espectrometro *Varian Mercury 300 MHz* ($B_0 = 7 T$), operando a 300,069 MHz para 1H e 75,459 MHz para ^{13}C . Espectrometro *Varian Mercury 300 MHz* ($B_0 = 7 T$), é equipado com sondas de 5 mm para detecção direta e estações de trabalho Sun para processamento de espectros.

Todos os espectros unidimensionais de RMN foram adquiridos a $25,0 \pm 0,1$ °C. As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. O sinal do deutério do solvente foi utilizado como trava.

Os experimentos unidimensionais foram adquiridos utilizando “softwares” padrão Varian sob condições típicas, como seguem o programa *VNMR* do equipamento (Varian, Inc.).

8.1.3 – Técnicas unidimensionais

RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos com pulsos de 45° (largura 2,5-4,0 μs), largura de varredura de 4,5 kHz (número de pontos 16 K), tempos de aquisição (at) e espera de reciclagem (d1) de 3,64 e 2,0 s, respectivamente. Foram acumuladas cerca de 32-128 transientes e a resolução digital do espectro de 0,25 Hz/ponto. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm, tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano 0,3 % (TMS, 0,00 ppm ou o sinal HDO, 4,67 ppm). Os sinais obtidos foram caracterizados como: s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, dl = duplete largo, t = tripleto, q = quarteto, m = mutiplete. As constantes de acoplamento (J) foram citadas em Hz.

RMN de ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos com pulsos de 45° (largura:4-6 μs), empregando desacoplamento em faixa larga (sequência de WALTZ), sob uma janela de 18 kHz, com um número de 64 k pontos (tempo de aquisição: 0,87 s) e tempo de espera para reciclagem (d1) de 1,2 s. Nestes experimentos foram acumulados 3000-5000 *scans*, com resolução digital de 1,0 Hz/ponto. Os deslocamentos químicos foram registrados em δ (ppm), tornando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm), CDCl_3 (77,00).

8.1.4 – Experimentos de nOe (efeito nuclear Overhauser)

A sequência de pulso utilizada é NOESY 2D disponível no *Varian Mercury 300 MHz (7 T)*.

Os espectros foram obtidos com largura espectral de 4,5 kHz (número de dados: 64 k pontos), tempos de aquisição (at), reciclagem (d1) mix e ni, 0,23 s, 2 s, 0,4 e 128 respectivamente.

8.2 - Preparo das amostras

8.2.1 - Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes, para uso em síntese orgânica. Sempre que necessário os reagentes e solventes foram submetidos aos métodos gerais de purificação, descritos na literatura (Perrin *et al.* 1980). Os anestésicos locais foram adquiridos da Aldrich com grau de pureza acima de 99% e os solventes deuterados (CDCl₃ 99,80% e D₂O 99,75%) adquiridos junto a TediaBrazil.

8.2.2 – Preparo das amostras para estudo de espectroscopia no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr, empregando-se um espectrofotômetro PERKIM ELMER SPECTRUM 1000 (Departamento de Química – UFV).

8.2.3 – Preparo das amostras para estudos de RMN de ¹H

Os complexos entre cloridrato de oxibuprocaína, cloridrato de tetracaína, proparacaína, benzocaína e seus carreadores ácido *p*-sulfônico calix[4]areno, ácido *p*-sulfônico calix[6]areno, foram preparados solubilizando-se quantidades equimolares do

hospedeiro e do hóspede (2 mmol L^{-1} , cada) em 0,6 mL de D_2O e mantidos em contato por 72 h antes da realização dos experimentos.

8.2.4 – Preparo das amostras para estudos de RMN de ^1H (NOESY)

As amostras dos complexos para espectroscopia de RMN de ^1H (NOESY) foram preparadas em soluções contendo 40 mmol L^{-1} do hospedeiro e 20 mmol L^{-1} do hospede em 0,6 mL de água deuterada (D_2O).

8.2.5 - Experimentos de titulação

8.2.5.1 - Estequiometria

Método de Job

As soluções a serem tituladas foram preparadas a partir de soluções estoque dos hospedeiros e dos hóspedes, diluindo-as através da variação contínua das concentrações das espécies, de tal forma que a soma das concentrações das mesmas se mantivesse constante ($[\text{hospedeiro}] + [\text{hóspede}] = 2 \text{ mmol L}^{-1}$). Foram empregadas soluções nas razões de [12:3]; [10,5:4,5]; [9:6]; [7,5:7,5]; [6:9]; [4,5:10,5] e [3:12] de cada componente conforme esta apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 7 – Tabela de titulação (Método de Job)

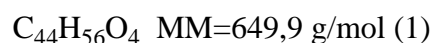
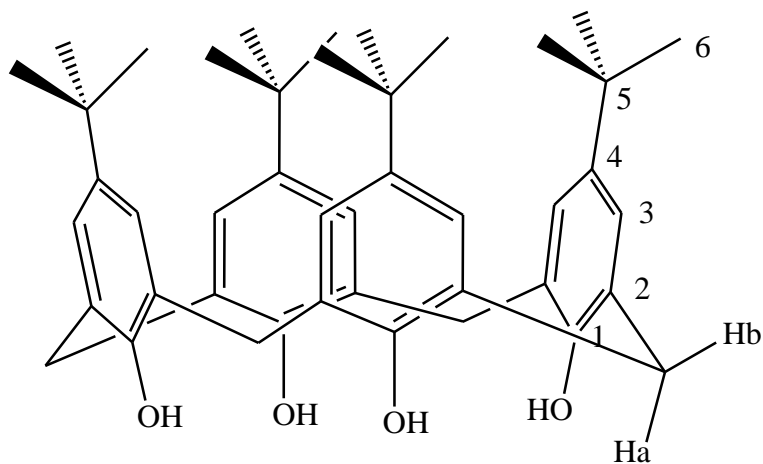
Razão molar	V _{AL}	V _{SO₃HC_{xn}}	V _{total}
15:0	0,60	0	0,60
12:3	0,48	0,12	0,60
10,5:4,5	0,42	0,18	0,60
9:6	0,36	0,24	0,60
7,5:7,5	0,30	0,30	0,60
6:9	0,24	0,36	0,60
4,5:10,5	0,18	0,42	0,60
3:12	0,12	0,48	0,60
0:15	0	0,60	0,60

*V_{AL} e V_{SO₃HC_{xn}} são volumes utilizados na titulação, entre os anestésicos locais (V_{AL}) e dos calixarenos (V_{SO₃H}).

Após colocarmos em contato o hospedeiro e o hóspede, o volume foi completado para 0,6 mL e os mesmos foram deixados em contato por 72 h antes da análise. Os espectros de RMN de ¹H das amostras tituladas foram referenciados no sinal do solvente (HDO). Os valores de $\Delta\delta_{\text{obs}}$ de alguns sinais dos hóspedes foram correlacionados com as concentrações das espécies tituladas através de gráficos ($\Delta\delta_{\text{obs}}$ [hóspede]/([hospedeiro] + [hóspede]) versus [hóspede]/([hospedeiro] + [hóspede])). A primeira avaliação da formação dos complexos entre anestésicos locais e os carreadores foi realizada pela variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos hidrogênios do anestésico local/ácido *p*-sulfônico calix[4 e 6]areno, relativo ao anestésico local puro.

9 – DESCRIÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

9.1 - Síntese do *p-tert*-butilcalix[4]areno (1)



O *p-tert*-butilfenol (25 g), uma solução de formaldeído (40%) 16 mL e 0,3 g de hidróxido de sódio foram transferidos para um balão de três bocas equipado com um agitador mecânico. A mistura reacional foi aquecida a (110-120 °C) por 2 horas sob agitação mecânica. Com o progresso da reação, a solução originalmente clara (transparente) tornou-se amarelo limão luminoso e, com a remoção da água, a mistura reacional muda para uma massa espessa amarelo dourado tornando-se uma goma consistente, devido a eliminação de água. Durante este período um pouco de espuma foi observado, e a mistura reacional se expandiu um pouco antes de voltar ao volume original. Após este período adicionou-se a mistura reacional 250 mL de difenil éter e manteve-se a agitação por mais 1 hora. Após esse tempo a mistura foi refluxada sob fluxo de nitrogênio durante 2 horas para remoção de água com auxílio de condensador e dean stark e capsulas de porcelanas. Durante o refluxo nota-se a formação de um precipitado mudando de amarelo para marrom escuro e em seguida a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente. A essa mistura foram adicionados 375 mL de

acetato de etila e agitada por 30 min. O material sólido foi filtrado em um funil de buchner, lavado com acetato de etila (2 x 25 mL), ácido acético (50 mL), e água (2 x 25 mL), (Gutsche et *al.* 1981). O produto desejado foi obtido como um pó branco (16,55 g; 25,46 mmol) com rendimento de 61,3%.

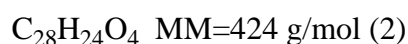
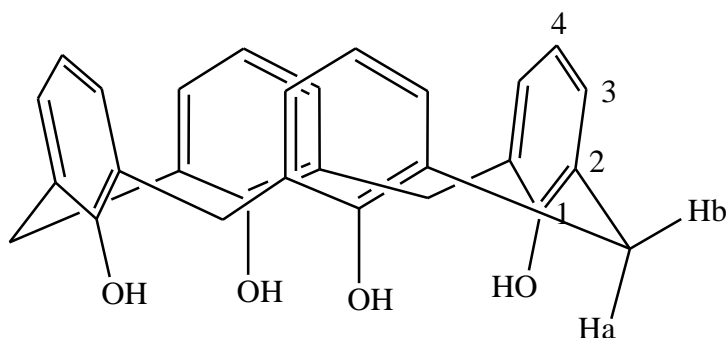
Dados espectroscópicos:

IV (KBr) ν (cm^{-1}); 3161, 2953, 1604, 1482, 1465, 1391,1362, 1239, 1200, 871, 817, 782.

RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00) δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição); 1,29 (36H, s, H-6); 3,50 (4H, d, $\text{CH}_2\text{-H-a}$); 4,26 (4H, d, $\text{CH}_2\text{-H-b}$); 7,05 (8H, s, H-3); 10,34 (4H, s, OH).

RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00): (δ , atribuição); 31,62 (C-6); 32,83 (CH_2); 34,22 (C-5); 126,15 (C-3); 127,91 (C-2); 144,58 (C-4); 146,68 (C-1).

9.2 - Síntese do calix[4]areno (2)



O *p-tert*-butilcalix[4]areno (5,07 g; 7,80 mmol), fenol (3,13 g; 33,34 mmol) e tolueno (50 mL) foram transferidos para um balão de duas bocas sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida foi adicionado cloreto de alumínio (6,00 g; 44,90 mmol), e a mistura reacional foi mantida sob agitação por uma hora à temperatura ambiente, a solução tornou-se vermelho intenso.

Após este período, a reação foi interrompida por adição de 500 mL de água gelada, e a fase orgânica foi separada. O tolueno foi removido por evaporação, e o resíduo foi lavado com 300 mL de metanol. O material foi recristalizado em metanol-clorofórmio fornecendo um pó branco com (2,72 g; 6,40 mmol) 82% de rendimento (Bocchi *et al.* 1982).

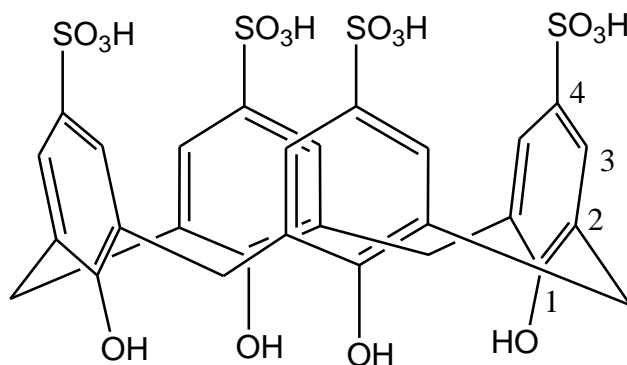
Dados espectroscópicos:

IV (KBr) ν (cm^{-1}); 3145, 3091, 2933, 1465, 1448, 1376, 1212, 773, 752.

RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00) δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição); 3,55 (4H, dl, $^3J = 12,6$ Hz, H-a); 4,35 (4H, dl, $^3J = 13,2$ Hz, H-b); 6,75 (4H, t, $^3J = 7,2$ Hz, H-4); 7,25 (8H, d, $^3J = 7,5$ Hz, H-3); 10,34 (4H, s, OH).

RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00): (δ , atribuição); 31,93 (CH_2); 122,4 (C-4); 128,46 (C-2); 129,20 (C-3); 149,0 (C-1).

9.3 - Síntese do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (3)



Transferiu-se para um balão de 25 mL, (0,87 g; 2,05 mmol) de calix[4]areno e 9 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%). A mistura reacional foi colocada sob aquecimento e agitação magnética a uma temperatura de 80 °C, a mistura reacional tornou-se marrom escuro.

Após 4 horas de reação, retirou-se uma alíquota e testou sua solubilidade em água, quando essa foi totalmente solúvel a reação foi considerada completa.

Após o término da reação, filtrou-se a vácuo em um funil G4. O produto foi obtido na forma de um sólido (0,73 g; 0,98 mmol) com rendimento de 48% do ácido *p*-sulfônico calix[4]areno (3) (Shinkai et al. 1987).

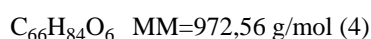
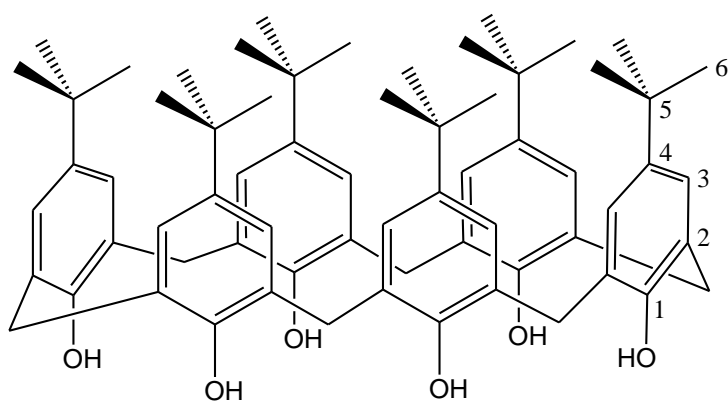
Dados espectroscópicos:

IV (KBr) ν (cm^{-1}); 3234, 1636, 1599, 1162, 630.

RMN de ^1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67) δ (integração, multiplicidade, atribuição); 3,87 (8H, sl, **CH₂**), 7,42 (8H, sl, **H-3**).

RMN de ^{13}C (75,459 MHz; D_2O): (δ , atribuição); 30,87 (**CH₂**); 126,76 (**C-3**); 128,38 (**C-2**); 135,97 (**C-4**); 151,89 (**C-1**).

9.4 - Síntese do *p*-*tert*-butilcalix[6]areno (4)



O *p-tert*-butilfenol (3,00 g), uma solução de formaldeído (40%) (4,1 mL) e hidróxido de potássio (0,45 g) foram transferidos para um balão de duas bocas. O aquecimento e agitação são iniciados, e após 15 min um fluxo de nitrogênio foi inserido ao sistema reacional para facilitar a remoção da água, sendo mantido por duas horas a 110-130 °C. Com o progresso da reação, a solução originalmente clara (transparente) tornou-se amarelo limão luminoso e, com a remoção da água, a mistura reacional muda para uma massa espessa amarelo dourado tornando-se uma goma consistente. Durante este período um pouco de espuma foi observado, e a mistura reacional se expandiu um pouco antes de voltar ao volume original. Após este período foi adicionado à mistura reacional xileno (200 mL) para dissolver a massa semi-sólida, dando uma solução amarela que imediatamente foi colocada sob refluxo. Depois de 30 min um precipitado começou a se formar, e a cor da mistura reacional mudou de amarelo para laranja. O refluxo foi mantido por três horas, e após este período a mistura reacional foi deixada esfriar até a temperatura ambiente. A mistura foi filtrada a frio em um funil de Buchner e o precipitado foi lavado com xileno a frio dando um produto menos colorido. O material foi pulverizado, transferido para um erlenmeyer, dissolvido em 100 mL de clorofórmio (não foi completamente solúvel), e tratado com 25 mL de ácido clorídrico (1 mol L⁻¹). Após 10-15 min de agitação a solução tornou-se amarelo-alaranjada, a agitação foi mantida por mais 10 min, e então a mistura foi transferida para um funil de

separação. A fase orgânica foi separada, a fase aquosa lavada com 3 x 25 mL de clorofórmio e as frações orgânicas foram reunidas, e em seguida, foi adicionado sulfato de sódio para a remoção da água residual. O sulfato de sódio foi removido por filtração, a solução de clorofórmio foi concentrada para aproximadamente 60 mL por aquecimento e 60 mL de acetona quente foi adicionado à solução de clorofórmio fervente. A mistura foi deixada esfriar e filtrada dando 2,4 g (80%) do produto como um pó branco (Gutsche et *al.* 1981).

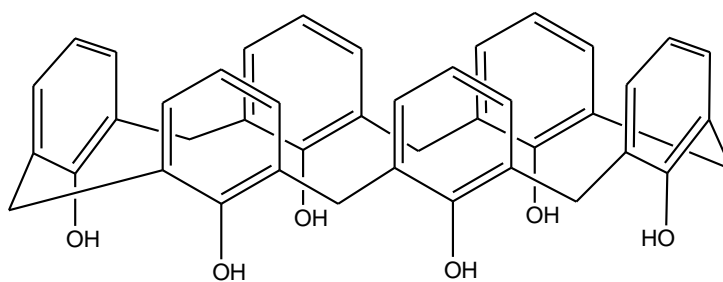
Dados espectroscópicos:

IV (KBr) ν (cm^{-1}); 3133, 3049, 2960, 1484, 1393, 1362, 1203, 872, 808, 747.

RMN de ^1H (300,069 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00) δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição); 1,29 (54H, s, H-6); 3,90 (12H, s, CH_2); 7,16 (12H, s, H-3); 10,42 (6H, s, OH).

RMN de ^{13}C (75,459 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00): (δ , atribuição); 31,44 (C-6); 32,27 (CH_2); 33,99 (C-5); 125,5 (C-3); 128,67 (C-2); 144,67 (C-4); 146,57 (C-1).

9.5 - Síntese do calix[6]areno (5)



$\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{O}_6$ MM=636,75 g/mol (5)

O *p-tert*-butilcalix[6]areno (0,50 g), fenol (0,29 g) e tolueno (6 mL) foram transferidos para um balão de duas bocas sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida foi adicionado cloreto de alumínio (0,56 g), e a mistura reacional foi mantida sob agitação

por uma hora à temperatura ambiente, tornando-se vermelho intenso com liberação de vapores de HCl.

Após este período, a reação foi interrompida por adição de 50 mL de água gelada, e a fase orgânica foi separada. O tolueno foi removido por evaporação, e o resíduo foi triturado em 30 mL de metanol dando um produto menos colorido. O material foi recristalizado em metanol-clorofórmio dando 0,246 g de um pó branco com 75% de rendimento. (Bocchi et al. 1982)

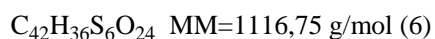
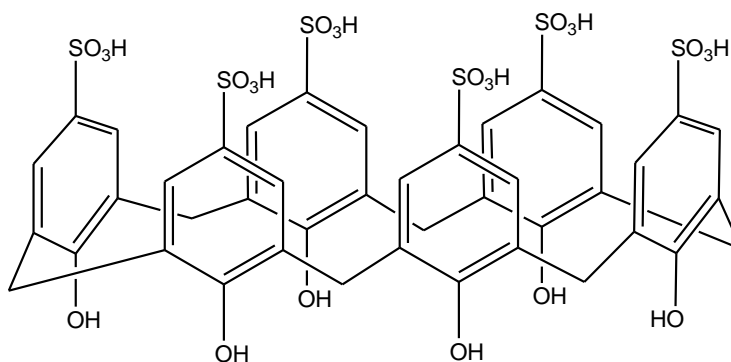
Dados espectroscópicos:

IV (KBr) ν (cm^{-1}); 3167, 2950, 1609,1590, 1465, 1259, 1210, 1160, 1081, 958, 834, 773, 751.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 ; δ_{TMS} 0,00) (δ , integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição); 3,89 (12H, sl, **CH₂**); 6,81 (6H, t, $^3J = 7,6$ Hz, **H-4**), 7,13 (12H, d, $^3J = 7,6$ Hz, **H-3**); 10,36 (6H, s, **OH**).

RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3 ; δ_{CDCl_3} 77,00): (δ , atribuição); 32,41 (**CH₂**); 122,06 (**C-4**); 127,61 (**C-2**); 129,69 (**C-3**); 149,85 (**C-1**).

9.6 - Síntese do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (6)



O ácido *p*-sulfônico calix[6]areno foi preparado por tratamento do calix[6]areno (1 g) com 10 mL de H_2SO_4 concentrado e a mistura reacional foi aquecida a 100 °C por três horas sob agitação magnética. Após 4 horas de reação, retirou-se uma alíquota e testou sua solubilidade em água, quando essa foi totalmente solúvel a reação foi considerada completa.

Após o término da reação, filtrou-se a vácuo em um funil G4, onde o sólido foi recolhido. O precipitado obtido passou por um processo de secagem obtendo 1,23 g com rendimento de 70% do ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (Shinkai et al. 1987).

Dados espectroscópicos:

IV (KBr) ν (cm^{-1}); 3424, 2600, 1592, 1166, 623.

RMN de 1H (300,069 MHz; D_2O ; δ_{HDO} 4,67): (δ , integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição); 3,81 (12H, sl, **CH₂**), 7,37 (12H, sl, **H-3**).

RMN de ^{13}C (75,459 MHz; D_2O) (δ , integração) 30,75 (**CH₂**); 126,37 (**C-3**); 127,93 (**C-2**); 135,19 (**C-4**); 153,23 (**C-1**).

10 - REFERÊNCIAS

- Adams, H.J.; Mastri, A.R.; Eicholzer, A.W.; Kilpatrick, G. *Anesth. Analg.* **1974**, 53, 904.
- Arantes, L.M.; Scarelli, C.; Marsaioli, A.J.; de Paula, E.; Fernandes, S.A. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47, 757.
- Araújo, D.R.; Pinto, L.M.A.; Braga, A.F.A.; de Paula, E. *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2003**, 53, 653.
- Arduini, A.; Pochini, A.; Reverberi, S.; Ungaro, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 981.
- Amrhein, P.; Shivanyuk, A.; Johnson, D. W.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10349.
- Asfari, Z.; Vicens, J. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2659.
- Baeyer, A. *Ber.* **1872**, 5, 25.
- Baeyer, A. *Ber.* **1872**, 5, 280.
- Baeyer, A. *Ber.* **1872**, 5, 1094.
- Barbosa, L.C.A. **2007**. *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Universidade Federal de Viçosa (UFV)
- Bazylak, G.; Nagels, L.J.; Geise, H.J. *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **2004**, 7, 345.
- Bocchi, V.; Foina, D.; Pochini, A.; Ungaro, R.; Andreotti, G.D. *Tetrahedron* **1982**, 38, 373.
- Boljka, M.; Kolar, G.; Vidensek, J. *Br. J. Ophthalmol.* **1994**, 78, 386.
- Botsi, A.; Perly, B.; Hadjoudis, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2.* **1997**, 89.
- Botsi, A.; Yannakopoulou, K.; Perly, B.; Hadjoudis, E. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4017.
- Co, T.F.W.; Preiss, A.L.; Barcham, I.; Nevin, M.I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 81, 209.
- Cornforth, J.W.; D'Arcy Hart, P.; Nicholls, G.A.; Rees, R.J.W.; Stock, J.A. *Br. J. Pharmacol.* **1955**, 10, 73.
- Courtney, K. R.; Strichartz, G. R. **1987**. Structural elements which determine local anesthetics activity In: *Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology*, (Strichartz G.R. ed.), vol. 81, cap. 3, Springer-Verlag, Berlin.

Covino, B. G.; Vassalo, H. G. **1985**. *Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico*, Colina, Rio de Janeiro.

Cram, D.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 1009.

da Silva, E.; Lazar, A.N.; Coleman, A.W. *J. Drug del. Sci. Tech.* **2004**, 14, 3.

de Fátima, A.; Fernandes, S.A.; Sabino, A.A. *Curr. Drug Disc. Technol.* **2009**, 6, 151.

de Jong, R. H. (**1994**). *Local Anesthetics*, C. C. Thomas, Springfield, Illinois.

de Paula, E.; Schreier, S. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 25, 1240.

de Paula, E.; Schreier, S. *Braz. J. Med. Res.* **1996**, 877.

Demirtas, H.N.; Bozkurt, S.; Durmaz, M.; Yilmaz, M.; Sirit, A. *Tetrahedron.* **2009**, 65, 3014.

Djedaini, F.; Lin, S.Z., Perly, B.; Wouessidjewe, D. *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 643.

Duncan, L.; Wildsmith, J.A.W. *Br. J. Anaesth.* **1995**, 75, 260.

Eichenberger, U.; Stockli, S.; Marhofer, P.; Huber, G.; Willmann, P.; Kettner, S.C.; Pleiner, J.; Curatolo, M.; Kapral, S. *Regional Anesthesia And Pain Medicine.* **2009**, 34, 242.

Fernandes, S.A.; Cabeça, L.F.; Marsaioli, A.J.; de Paula E. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57, 395.

Fernandez, M.F. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 27, 647.

Fernandez, M.F. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 83, 597.

Gansey, M.H.B.G.; Verboom, W.; Reinhoudt, D.N. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7127.

Gunther, H. *NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons: Chichester, 2 ed. **1994**, cap. 6 e 10.

Gupta, S.P. *Chem. Rev.* **1991**, 1109.

Gutsche, C.D.; Muthukrishnan, R.J.; No, K.H. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 2213.

Gutsche, C.D. And Bauer, L.J. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 4763.

Gutsche, C.D.; Dhawan, B.; No, K.H.; Muthukrishnan, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3782.

Gutsche, C.D.; Dhawan, B.; Levine, J.A.; No, K.H. Bauer, L.J. *Tetrahedron*, **1983**, 39, 409.

Gutsche, C.D.; Bauer, L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6052.

- Gutsche, C.D.; Dhawan, B.; Chen, S. *Makromol. Chem.* **1987**, 921.
- Gutsche, C.D.; Iqbal, M. *Org. Synth.* **1989**, 68, 234.
- Gutsche, C.D. **1998**. *In Calixarenes Revisited*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Happel, G.; Mathiasch, B.; Kammerer, H. *Makromol. Chem.* **1974**, 176, 3317.
- Hayes, B.T.; Hunter, R.F. *J. Appl. Chem.* **1958**, 8, 743.
- Ikeda, A.; Shinkai, S. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1713.
- Job, P. *Ann. Chim.* **1928**, 9, 113.
- Julian, R.R.; Akin, M.; May, J.A.; Stoltz, B.M.; Beauchamp, J.L. *Int. J. Mass Spect.* **2002**, 220, 87.
- Takeda, K.; Okunoa, H.; Hatab, T.; Nishimotoa, M.; Matsukia, H.; Kaneshinaa, S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2009**, 72, 135.
- Kammerer, H.; Happel, G.; Bohmer, V.; Rathay, D. *Monatsh. Chem.* **1978**, 109, 767.
- Konovalov, A.I.; Antipin, I.S. *Mendeleev Commun.* **2008**, 18, 229.
- Korsten, H.H.; Ackerman, E.W.; Grouls, R.J.; van Zundert, A.A.; Boon, W.F.; Bal, F.; Crommelin, M.A.; Ribot, J.G.; Hoefsloot, F.; Sloof, J.L. *Anesthesiol.* **1991**, 75, 950.
- Kuzma, P.J.; Kline, M.D.; Calkins, M.D.; Staats, P.S. *Reg. Anesth.* **1997**, 22, 543.
- Lehn, J.M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1988**, 89, 112.
- Malamed, S.F. **2001**. Manual de anestesia local. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Malheiros, S.V.P.; Meirelles, N.C.; de Paula, E. *Biophys. Chem.* **2000**, 83, 89.
- Marcos, P.M.; Félix, S. *Química.* **2007**, 107, 31.
- Matsuki, H.; Shimada, K.; Kaneshima, S.; Kamaya, H.; Ueda, I. *Coll. Surf B: Biointerfaces* **1998**, 11, 287.
- Mitra, S.; Maitra, A.N. *J. Surf. Sci. Technol.* **2000**, 16, 316.
- Molins, M.A.; Nieto, P.M.; Sanchez, C.; Prados, P.; de Mendoza, J.; Pons, M. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6924.
- Ogura, Y.; Mori, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **1968**, 3, 58. b) Ross, S.B.; Akerman, B.A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1972**, 182, 351.
- Pedersen, C.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 1021.
- Peretz, B.; Bimstein, E. *J. Dentistry For Children.* **2000**, 67, 263.

- Perret, F.; Lazar, A.N. Coleman.A.. *Chem. Commun.* **2006**, 23, 2425.
- Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.; Perrin, D.R. **1980** – *Purification of Laboratory Chemicals*, 2th Ed., Pergamon Press, New York.
- Pietraszkiewicz, M.; Prus, P.; Pietraszkiewicz, O. *Tetrahedron.* **2004**, 60, 10747.
- Reinhoudt, D.N.; Crego-Calama M. *Science*, **2002**, 2403.
- Rudkevich, D.A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, 3, 393.
- Silverstein, R.M.; Welester, F.X. **2000**. Identificação de compostos orgânicos. 6 ed.
- Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Some, T.; Manabe, O. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5315.
- Shinkai, S. *Pure & Appl. Chem.* **1986**, 58, 1523.
- Shinkai, S.; Araki, K.; Tsubaki, T.; Some, T.; Manabe, O. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1987**, 2297.
- Schreier, S.; Malheiros, S.V.P.; de Paula, E. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1508, 210.
- Scurlock, J.E.; Curtis, B.M. *Anesthesiol.* **1981**, 54, 265.
- Zhang, C.; Zheng, Y.S.; Mei, F.M.; Li, G.X. *Progress in Chem.* **2004**, 16, 934.
- Zinke, A.; Ziegler, E. *Ber.* **1941**, B74, 1729; *ibid.*, **1944**, 2644.
- Zinke, A.; Kretz, R.; Leggewie, E.; Hossinger, K. *Monatsh.* **1952**, 83, 1213 .

11 – ANEXO

11.1 - Artigo publicado

11.1.1 - Proparacaine complexation with β -cyclodextrin and *p*-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied ¹H-NMR approaches. *Magn. Reson. Chem.* **2009, *47*, 757 (DOI . 10.1002/mrc.2460)**

Proparacaine complexation with β -cyclodextrin and *p*-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied $^1\text{H-NMR}$ approaches

Lucas Micquéias Arantes,^a Camilla Scarelli,^c Anita Jocelyne Marsaioli,^b Eneida de Paula,^c and Sergio Antonio Fernandes^{a*}

This study focused on the use of NMR techniques as a tool for the investigation of complex formation between proparacaine and cyclodextrins (CDs) or *p*-sulfonic acid calix[6]arene. The pH dependence of the complexation of proparacaine with β -CD and *p*-sulfonic acid calix[6]arene was studied and binding constants were determined by $^1\text{H NMR}$ spectroscopy [diffusion-ordered spectroscopy (DOSY)] for the charged and uncharged forms of the local anesthetic in β -CD and *p*-sulfonic acid calix[6]arene. The stoichiometries of the complexes was determined and rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy (ROESY) 1D experiments revealed details of the molecular insertion of proparacaine into the β -CD and *p*-sulfonic acid calix[6]arene cavities. The results unambiguously demonstrate that pH is an important factor for the development of supramolecular architectures based on β -CD and *p*-sulfonic acid calix[6]arene as the host molecules. Such host–guest complexes were investigated in view of their potential use as new therapeutic formulations, designed to increase the bioavailability and/or to decrease the systemic toxicity of proparacaine in anesthesia procedures. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: proparacaine; cyclodextrin; calixarenes; NMR

Introduction

The formulation of drugs is an important topic in pharmaceutical sciences. Many therapeutically active molecules are chemically and biologically fragile; so they need to be encapsulated in a drug carrying system to improve their physicochemical stability. The desirable features of drug carriers in drug-delivery systems include controlled release, targeting and absorption enhancing abilities. From the safety point of view, bio-adaptability is an important requirement for drug carrier systems, as well as high quality and low cost.^[1,2] These carriers protect the loaded drug against degradation, the guest molecule being transported effectively in biological media.^[3] The development of such systems include cyclodextrins (CDs),^[4–9] calix[*n*]arenes,^[10–15] micelles,^[16] liposomes,^[17,18] micro-^[19] and nanoparticles^[20] and solid lipid nanoparticles^[21–23] as drug carriers.

CD was one of the first molecular receptors ('host' molecule) whose ability to bind organic (guest) compounds was recognized and extensively studied by various experimental techniques.^[24–26] Consequently, CDs have pharmaceutical applications as high performance biomaterials in drug-delivery systems due to their ability to change physical, chemical and biological properties of guest molecules through the formation of inclusion complexes.^[27–29]

Surprisingly, calix[*n*]arenes,^[30] organic macrocyclic host molecules formed by the *ortho*-condensation of *para*-substituted phenols and formaldehyde, are well investigated in supramolecular chemistry but less studied with respect to their drug-delivery properties.^[10]

The characterization of the delivery systems formed by complexation of the local anesthetic proparacaine **1**, in β -CDs **2** or

p-sulfonic acid calix[6]arene **3** (Scheme 1) provides important information to optimize its possible future use, which requires a better knowledge of the molecular properties of the complexes.^[31] Crucial information for the characterization of these complexes include the stoichiometry, the complexed population (% p_{bound}), the formation/dissociation constant (K_a) and the relative positioning of the carrier/guest inclusion complex, which can be determined from pulsed field gradient spin-echo (PGSE)^[32–36] and nuclear Overhauser effect (NOE)^[37] experiments, respectively.

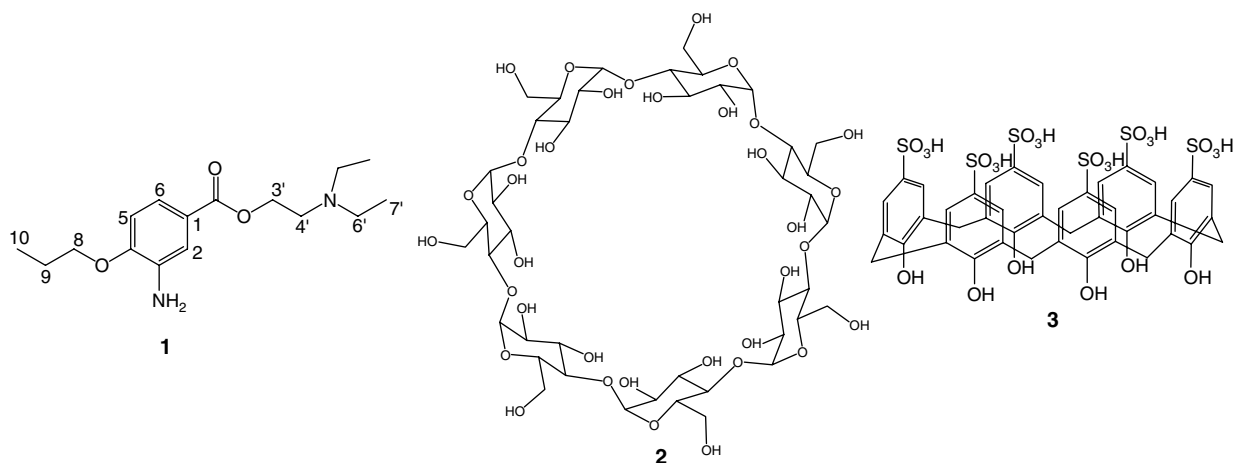
The main objective of this investigation was the analysis of the complexation by β -CDs **2** or *p*-sulfonic acid calix[6]arene **3** (Scheme 1) of the local anesthetic proparacaine **1** in an aqueous medium under various experimental conditions (pH 5 and pH 10). Using the Job plot method, PGSE and NOE NMR approaches, we obtained large variety of information about the molecular interactions that drive the complexation process of proparacaine.

* Correspondence to: Sergio Antonio Fernandes, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, Avenida P.H. Rolfs, s/n, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil. E-mail: santonio@ufv.br

a Grupo de Química Supramolecular e Biomimética (GQSB), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 36570-000, MG, Brazil

b Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

c Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brazil



Scheme 1. Chemical structure of proparacaine (1), -cyclodextrin (2) and *p*-sulfonic acid calix[6]arene (3).

Results and Discussion

We determined the ionization constant of proparacaine by the pH-titration method as 8.33. From that we designed experiments at pH 5 and 10 to evaluate the complexation of charged and uncharged proparacaine **1** species, with β -CDs **2** or *p*-sulfonic acid calix[6]arene **3**. Both anesthetic forms seem to be important for the anesthesia mechanism, with the uncharged species binding more strongly to the membranes while the protonated form has the necessary water solubility for the anesthetic to cross the biological compartments and reach the targeted axonal membranes in sufficient concentration.^[38–40]

We started our investigation by analyzing the complexation-induced hydrogen chemical shifts ($\Delta\delta$) in the **1/2** and **1/3** complexes, relative to free **1**.

The hydrogens of **1** displayed discrete chemical shift variations (≤ 0.04 ppm) in the presence of **2** complex (**1/2**) in pH 5 (Table 1). When the (**1/2**) complex was prepared in pH 10, the hydrogen chemical shift variations of **1** were more pronounced (up to 0.12 ppm, Table 2). This fact can be rationalized by the smaller water solubility of the uncharged proparacaine **1** species at pH 10, which favors the inclusion of **1** into the hydrophobic cavity of β -CD **2** at alkaline but not at acidic pH.

Complexation between **1** and **3** at acidic pH induced large shielding effects in all hydrogens of **1**, mainly H-3', H-4', H-6' and H-7' ($\Delta\delta = 0.74, 0.38, 0.84$ and 0.42 ppm, respectively – Table 1), revealing interactions between the charged ammonium group of **1** (pH 5) and the SO₃H group of **3** (Table 1).^[10,41]

As expected, smaller hydrogen chemical shifts changes were observed between free **1** and **1/3** complex at pH 10, when proparacaine is in its neutral form (Table 2) than at pH 5.

We further established the stoichiometries for the **1/2** and **1/3** complexes (pH 5 and pH 10), using the Job plot method.^[42,43] The plots obtained from the NMR analyses indicated the predominant formation of 1:1 complexes, for **1/2** and **1/3**, at both pH. A representative Job plot experiment is illustrated in Fig. 1.

Diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) NMR experiments were pivotal to demonstrate that **1/2** and **1/3** form stable complexes. These experiments allow distinguishing compounds or complexes by their differences in diffusion coefficients.^[14] Representative spectra are given in Figs 2 and 3 for pure **1** and for the **1/2** complex (2 mmol l⁻¹ samples, 298 K, respectively). The diffusion coefficients of pure **1**, **2** and **3** (at pH 5 and 10) were first

determined ($D_{1 \text{ (pH 5)}} = 5.30 \times 10^{-10}$, $D_{2 \text{ (pH 5)}} = 3.27 \times 10^{-10}$, $D_{3 \text{ (pH 5)}} = 3.05 \times 10^{-10}$, $D_{1 \text{ (pH 10)}} = 4.72 \times 10^{-10}$, $D_{2 \text{ (pH 10)}} = 3.16 \times 10^{-10}$ and $D_{3 \text{ (pH 10)}} = 3.08 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively, Table 3). In the presence of **2** or **3**, compound **1** showed a significant reduction in its diffusion rate ($D_{1/2 \text{ (pH 5)}} = 4.73 \times 10^{-10}$, $D_{1/3 \text{ (pH 5)}} = 3.32 \times 10^{-10}$, $D_{1/2 \text{ (pH 10)}} = 4.13 \times 10^{-10}$ and $D_{1/3 \text{ (pH 10)}} = 4.36 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, Table 3), indicating that **1** forms *host-guest* complexes with either **2** or **3**, at both pH. Moreover, the diffusion rate values (Table 3) of **1** in the **1/2** complex at pH 10 is in agreement with the assumption of a strong association. In the case of the **1/3** complex a more pronounced variation was observed in the diffusion coefficient of compound **1** at pH 5 (Table 3).

Taking into account that we are dealing with a system under fast equilibrium on the NMR scale, both chemical shifts and diffusion coefficients of **1** are the average values of the free and bound species. From these diffusion coefficients, and applying a well established methodology^[44] we have calculated the complexed population ($\%p_{\text{bound}}$) and apparent binding constants (K_a) of the complexes (Table 3). $\%p_{\text{bound}}$ was found to be 22 and 29% for **1/2**, and 73 and 14% for **1/3** at pH 5 and pH 10, respectively. The values of K_a at both conditions (181 and 288 M^{-1} for **1/2**, respectively) confirmed that more association took place between the neutral form of proparacaine (pH 10) and β -CD than between charged **1** and **2** (pH 5). In an earlier work, conducted at pH 7, an association constant ($K_a = 208 \text{ M}^{-1}$) has been reported for the **1/2** complex, in good agreement with the values found in this study.^[18] Studies conducted for **1/3** revealed a strong association between the charged proparacaine species **1** and *p*-sulfonic acid calix[6]arene **3** ($K_a = 5007 \text{ M}^{-1}$ at pH 5) and a diminished association between the uncharged proparacaine **1** and **3** ($K_a = 11 \text{ M}^{-1}$). The results obtained from measurements in an acidic medium (pH 5) show that the protonated proparacaine molecule forms strong complexes with *p*-sulfonic acid calix[6]arene **3**, as opposed to the association of charged **1** with β -CD **2**.

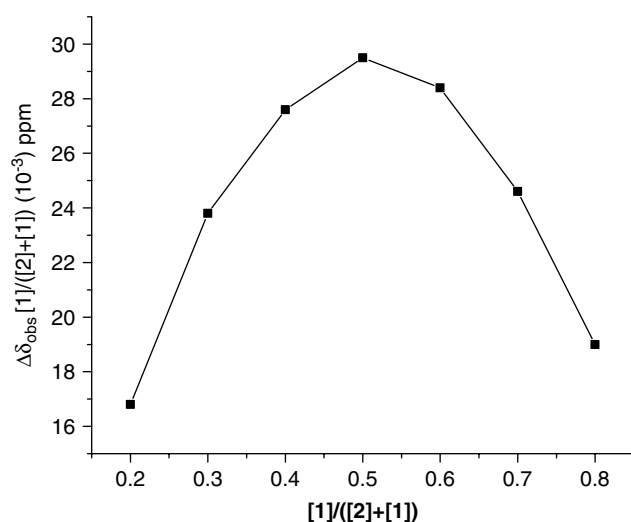
On the other hand, neutral molecules of proparacaine **1** (pH 10) showed a higher affinity for the β -CD cavity than those bearing formal charges. Moreover, the ester group of **1** became fully protected from nucleophilic attack of HO⁻, the complexed drug being unreactive to alkaline hydrolysis (not shown) as observed earlier for another ester-type local anesthetic, tetracaine.^[10] Further details on the **1/2** (pH 10) and **1/3** (pH 5) molecular complexation were obtained from rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy (ROESY)-NMR experiments.

Table 1. ^1H NMR: Chemical shifts (δ) and chemical shift differences ($\Delta\delta = \delta_{1 \text{ free}} - \delta_{1 \text{ complex}}$) of pure **1** and its complexes with β -CD **1/2** or *p*-sulfonic acid calix[6]arene **1/3**, at pH 5 (2 mmol l^{-1} samples, 298 K)

Hydrogen	1	1/2	1/2	1/3	1/3
	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{1 \text{ free}} - \delta_{1 \text{ complex}}$	δ	$\Delta\delta = \delta_{1 \text{ free}} - \delta_{1 \text{ complex}}$
H-10	0.92	0.92	0.00	0.65	0.27
H-7'	1.24	1.24	0.00	0.83	0.42
H-9	1.73	1.73	0.00	1.61	0.12
H-6'	3.25	3.25	0.00	2.41	0.84
H-3'	3.54	3.55	0.01	2.80	0.74
H-8	4.02	4.02	0.00	3.87	0.15
H-4'	4.55	4.56	0.01	4.17	0.38
H-5	6.93	6.89	0.04	6.83	0.10
H-2	7.38	7.38	0.00	7.39	-0.01
H-6	7.46	7.44	0.02	7.46	0.00

Table 2. ^1H NMR: Chemical shifts (δ) and chemical shift differences ($\Delta\delta = \delta_{1 \text{ free}} - \delta_{1 \text{ complex}}$) of pure **1** and its complexes with β -CD **1/2** or *p*-sulfonic acid calix[6]arene **1/3**, at pH 10 (2 mmol l^{-1} samples, 298 K)

Hydrogen	1	1/2	1/2	1/3	1/3
	δ	δ	$\Delta\delta = \delta_{1 \text{ free}} - \delta_{1 \text{ complex}}$	δ	$\Delta\delta = \delta_{1 \text{ free}} - \delta_{1 \text{ complex}}$
H-10	0.91	0.92	-0.01	0.74	0.17
H-7'	1.01	1.02	-0.01	0.89	0.12
H-9	1.72	1.73	-0.01	1.68	0.04
H-6'	2.68	2.65	0.03	2.38	0.30
H-3'	2.95	2.91	0.04	2.75	0.20
H-8	4.01	4.02	-0.01	3.96	0.05
H-4'	4.35	4.35	-0.00	4.22	0.13
H-5	6.92	6.85	0.07	6.86	0.06
H-2	7.37	7.32	0.05	7.33	0.04
H-6	7.44	7.32	0.12	7.40	0.04

**Figure 1.** Representative Job plot for the complex formed between propracaine **1** and β -CD **2**. Chemical Shifts were measured at 499.885 MHz in D_2O , at 298 K and pH 10, in 2 mmol l^{-1} samples).

Specific rOe signals were observed between H-2/H-5, H-6 and H-8 of **1** (pH 10), and H-3 (enhancement of 0.57, 1.36, 0.47%, respectively) and H-5 (0.80, 1.73, 0.36% of signal enhancement

respectively) of β -CD **2**. At pH 5, the same increments were observed in the rOe between the hydrogens of propracaine **1** and β -CD **2**, but with smaller intensities. We therefore suggested the presence of two species, **A** and **B** (Fig. 4) on the basis of molecular models and the nuclear Overhauser enhancements. The proposed topologies are in agreement with a recent work published by Marsaioli and collaborators.^[18]

The signal enhancements in **1/3** (rOe between H-6' and H-7' of propracaine **1** (1.27 and 0.52%, respectively, at pH 5) and H-Ar of the *p*-sulfonic acid calix[6]arene **3** indicate the binding of the ammonium group of **1** with the SO_3H group of **3**. This was confirmed by experiments performed at pH 10.0, which revealed that the association constant between **1** and **3** decreased for $K_a = 11 \text{ M}^{-1}$ in relation to that in pH 5 ($K_a = 5007 \text{ M}^{-1}$). The two proposed topologies, **C** and **D** (Fig. 5) for the **1/3** complexes at pH 5 were established using ROESY 1D.

Conclusion

Several noncovalent weak forces, including electrostatic, hydrophobic, π - π interaction and van der Waals, cooperatively contribute to the formation of the supramolecular complexes. Among these, electrostatic and hydrophobic interactions as well as structural matching effect are thought to play principal roles in forming the supramolecular systems **1/2** and **1/3**.

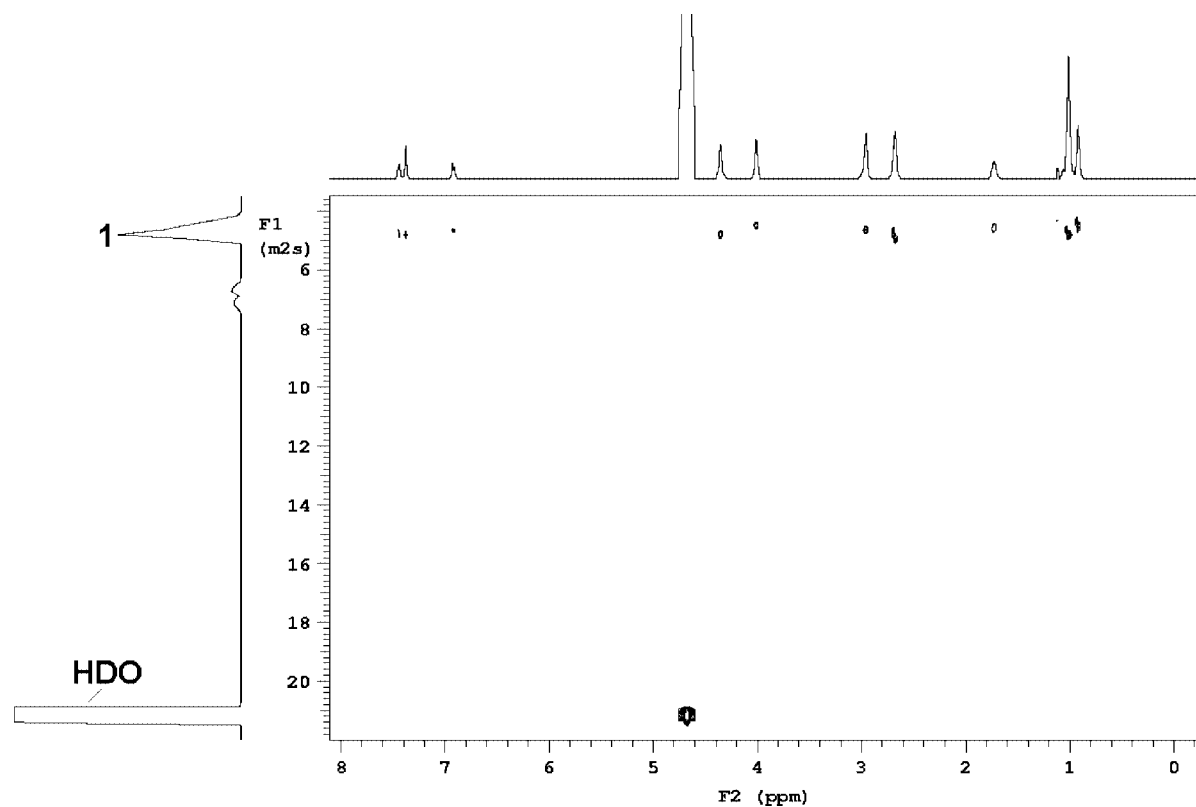


Figure 2. Representative ^1H DOSY NMR experiment of pure **1** (499.885 MHz, D_2O , 298 K, pH 10, 2 mmol l^{-1}).

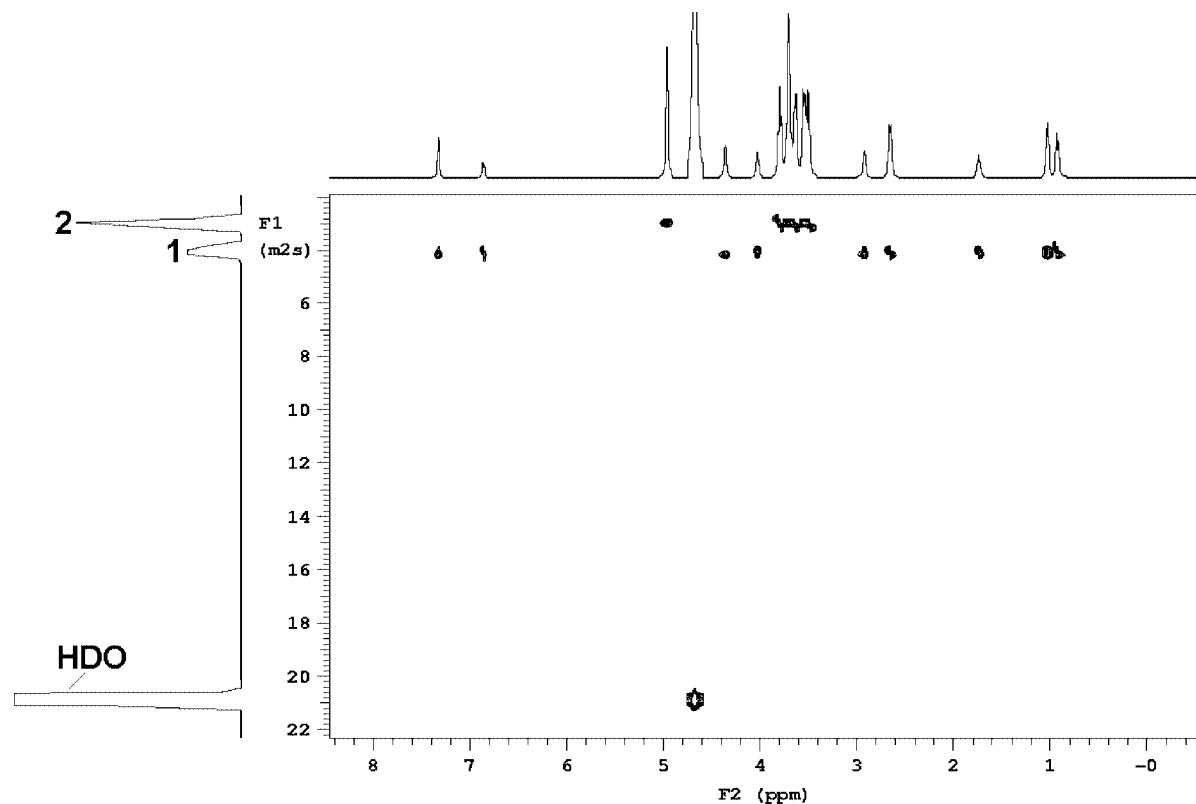
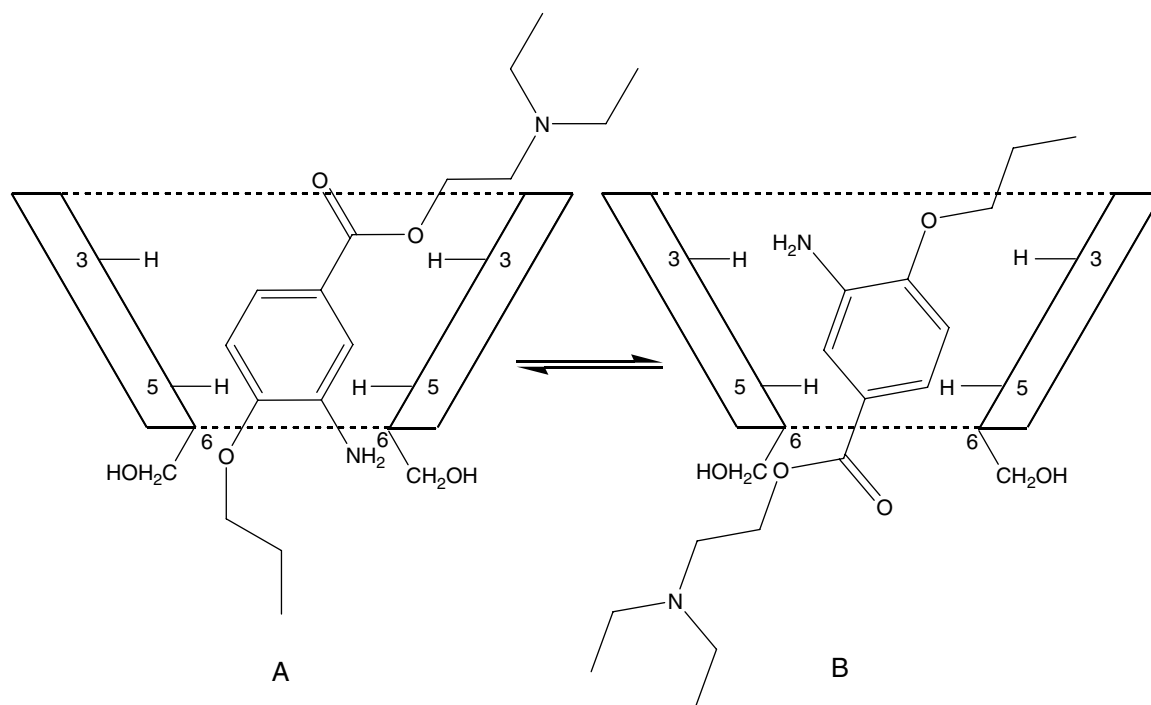


Figure 3. Representative ^1H DOSY NMR experiment for the **1/2** complex (499.885 MHz, D_2O , 298 K, pH 10, 2 mmol l^{-1}).

Table 3. Diffusion coefficients of pure **1**, **2**, **3** and **1/2** and **1/3** complexes in D₂O (2 mmol l⁻¹ samples, 298 K) at pH 5 and 10

Complex	Compounds	Condition (pH)	D (10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹)	D/D^{H_2O}	%p	K_a (M ⁻¹)
–	1	5	5.30 ± 0.04	0.24	–	–
	1	10	4.72 ± 0.03	0.22	–	–
–	2	5	3.27 ± 0.03	0.16	–	–
	2	10	3.16 ± 0.02	0.15	–	–
–	3	5	3.05 ± 0.02	0.14	–	–
	3	10	3.08 ± 0.01	0.15	–	–
1/2	1	5	4.73 ± 0.05	0.22	22	181
1/3	1	5	3.32 ± 0.03	0.16	73	5007
	3	5	2.85 ± 0.02	0.13	–	–
1/2	1	10	4.13 ± 0.03	0.20	29	288
	2	10	3.08 ± 0.02	0.15	–	–
1/3	1	10	4.36 ± 0.07	0.21	14	11
	3	10	3.13 ± 0.04	0.15	–	–

**Figure 4.** Proposed topology for the uncharged propracaine/ β -CD (**1/2** complex at pH 10), based on ¹H NMR evidences.

In summary, complexes possessing different degrees of compactness were constructed by the complexation of **2** and **3** with propracaine **1**, at pH 5 and pH 10. Increasing the alkalinity of the medium with carbonate buffer favored the complexation of **1** in **2** ($K_a = 288 \text{ M}^{-1}$) in relation to that in pH 5 ($K_a = 181 \text{ M}^{-1}$) and prevented the alkaline hydrolysis of **1**. However the complexation of **1** and **3** at pH 10 ($K_a = 11 \text{ M}^{-1}$) is weaker than that observed at pH 5 ($K_a = 5007 \text{ M}^{-1}$), which is mainly a result of the protonation of the amine groups of **1**, and binding of such ⁺NHR₂ group of **1** to the SO₃H groups of **3**. These observations unambiguously demonstrate that the ionization state of the guest molecule is a crucial factor in the design of supramolecular architectures based on **2** and **3** as the host molecules.

The topology of the complexes (Figs 4 and 5) was determined from the 1D ROESY NMR results, revealing that the forces that

govern complexation are different for **1/2** and **1/3**: hydrophobic interactions for the **1/2** complex and ionic-pair formation for the **1/3** complex.

Experimental

Chemicals and reagents

Propracaine hydrochloride **1** (99%), β -CD **2** (99%), and D₂O (99.75%) were purchased from Aldrich, Acros Organics and Merck, respectively. All other reagents were of analytical grade. *p*-sulfonic acid calix[6]arene **3** was synthesized in our laboratory following literature procedures.^[45–47]

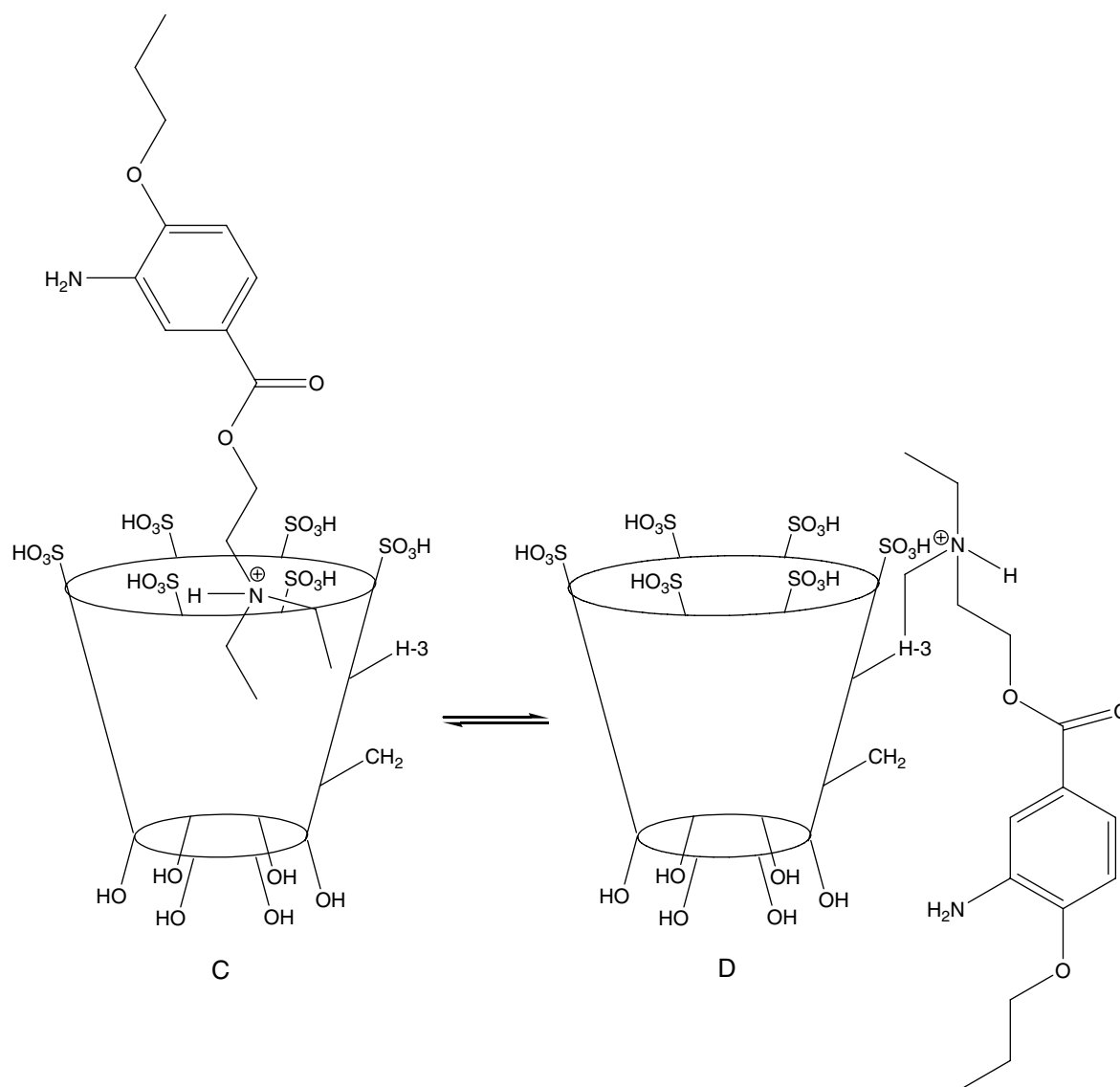


Figure 5. Proposed topologies for the charged propracaine/*p*-sulfonic acid calix[6]arene (**1/3** complex, pH 5) in fast equilibrium, according to ^1H NMR evidences.

Preparation of solid inclusion complexes

Inclusion complexes (**1/2** or **1/3**) with 1:1 molar ratios were prepared by shaking appropriate amounts of **1** and **2** or **3**, e.g. 2 mmol l^{-1} , in deionized water at room temperature ($298 \pm 1\text{ K}$) for 1 h. Kinetic experiments revealed that equilibrium was reached after 40 min (data not shown).

After reaching equilibrium, the solution was freeze-dried in a Labconco Freeze-dry system (Freezone 4.5) and stored at 253 K until further use.

NMR Spectroscopy

All experiments were performed at 298 K in D_2O . For the experiments with uncharged **1**, the pH value of the solutions was adjusted by addition of lyophilized 0.02 mol l^{-1} carbonate buffer resuspended in D_2O .

Routine 1D

^1H experiments were acquired either with an INOVA-500 Varian spectrometer operating at 499.885 MHz for ^1H (64 k data points, 30° excitation pulse with duration of $2.2\ \mu\text{s}$, spectral width of 6 kHz, acquisition time of 3.3 s and relaxation delay of 10 ms) in a 5-mm probe with inverse detection mode at room temperature unless stated otherwise.

NOE measurements

The ROESY 1D experiments were obtained with a selective 180° and a nonselective 90° pulse, with a mixing time of 0.5 s during the spin-lock. The selective pulses were generated by a waveform generator which automatically attenuates the shape, power, and pulse duration to obtain the required selectivity. The subtraction of the on- and off-resonance acquisition furnished the ROESY 1D experiment. All spectra were acquired with a 5-mm inverse probe at 298 K in 5-mm tubes.

HR-DOSY experiments were carried out by carefully choosing the correct pulse sequence and gradients for the experiments. The measurements were made using: (i) 5 mm inverse probe with z-gradient coil; (ii) the Gradient Compensated Stimulated Echo Spin Lock (GCSTESL) HR-DOSY sequence; (iii) amplitudes of the gradient pulses ranging from 0.000685 to 0.003427 T cm⁻¹, where an approximately 90–95% decrease in the resonance intensity was achieved at the largest gradient amplitudes. For all experiments, 25 different gradient amplitudes were used. The baselines of all spectra were corrected prior to data processing. The processing program (the DOSY macro in a Varian instrument) involves the determination of the peak heights of all signals above a pre-established threshold and the fitting of the decay curve for each peak to an exponential decay. The DOSY macro was run with data transformed using $fn = 64 K$. Very crowded spectra were processed in sections due to the limitation of handling only 512 lines at a time. The results of the DOSY method of analysis are pseudo two-dimensional spectra with NMR chemical shifts along one axis and calculated diffusion coefficients ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) along the other.

Determination the stoichiometry of complexation

Job plots were prepared with 2 mmol l⁻¹ stock solutions of **1** and **2** or **1** and **3**.^[48]

Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG (grants EDT-346/07), FAPESP (Proc. 2005/00602-4) and CNPq (E.P. fellowship). The authors also thank Prof. Carol Collins for English text revision.

References

- [1] K. Uekama, *Adv. Drug Delivery. Rev.* **1999**, *36*, 1.
- [2] K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 900.
- [3] P. Shahgaldian, L. Quattrocchi, J. Gualbert, A. W. Coleman, P. Goreloff, *Eur. J. Pharm. Biopharmaceut.* **2003**, *55*, 107.
- [4] M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2004**, *3*, 1023.
- [5] M. J. Kirchmeier, T. Ishida, J. Chevrette, T. M. Allen, *J. Lipid Res.* **2001**, *11*, 15.
- [6] F. Veiga, C. Fernandes, F. Teixeira, *Int. J. Pharm.* **2000**, *202*, 165.
- [7] M. E. Dalmora, S. L. Dalmora, A. G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* **2001**, *222*, 45.
- [8] N. M. Zaki, N. D. Mortada, G. A. S. Awad, S. A. ElHady, *Int. J. Pharm.* **2006**, *327*, 97.
- [9] K. Uekama, F. Hirayama, H. Arima, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2006**, *56*, 3.
- [10] S. A. Fernandes, L. F. Cabeça, A. J. Marsaioli, E. de Paula, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *57*, 395.
- [11] J. S. Millership, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *39*, 327.
- [12] E. da Silva, C. Valmalle, M. Becchi, C. Y. Cuilleron, A. W. Coleman, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2003**, *46*, 65.
- [13] W. Z. Yang, M. M. de Villiers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 629.
- [14] W. Z. Yang, M. M. de Villiers, *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 703.
- [15] W. Yang, D. P. Otto, W. Liebenberg, M. M. de Villiers, *Current Drug Discov. Techn.* **2008**, *5*, 129.
- [16] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113.
- [17] Y.-P. Zhang, B. Ceh, D. D. Lasic, Liposomes in drug delivery, in *Polymeric Biomaterials* (2nd edn) (Ed.: D. Severian), Marcel Dekker: New York, NY, **2002**, 783.
- [18] L. F. Cabeça, S. A. Fernandes, E. de Paula, A. J. Marsaioli, *Magn. Res. Chem.* **2008**, *46*, 832.
- [19] H. Kawaguchi, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1171.
- [20] R. Alvarez-Roman, G. Barre, R. H. Guy, H. Fessi, *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* **2001**, *52*, 191.
- [21] W. Mehnert, K. Mader, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 165.
- [22] R. H. Muller, W. Mehnert, J. S. Lucks, C. Schwarz, A. zur Muhlen, H. Weyhers, C. Freitas, D. Ruhl, *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* **1995**, *41*, 62.
- [23] R. H. Muller, K. Mader, S. Gohla, *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* **2000**, *50*, 161.
- [24] J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers: City Netherlands, **1988**, Chapter 2.
- [25] K. A. Connors, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 3, (Eds: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon: New York, **1996**, pp 205.
- [26] M. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875.
- [27] J. Szejtli, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *52*, 1.
- [28] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045.
- [29] C. Merino, E. Junquera, J. Jiménez-Barbero, E. Aicart, *Langmuir* **2000**, *16*, 1557.
- [30] C. D. Gutsche, *Calixarenes*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1989**.
- [31] A. V. Davis, R. M. Yeh, K. N. Raymond, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 4793.
- [32] C. S. Johnson Jr., *Prog. NMR Spectrosc.* **1999**, *34*, 203.
- [33] W. S. Price, *Concepts Magn. Res.* **1997**, *9*, 299.
- [34] W. S. Price, *Concepts Magn. Res.* **1998**, *10*, 197.
- [35] P. Stilbs, *Prog. NMR Spectrosc.* **1987**, *19*, 1.
- [36] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288.
- [37] H. Gunther, *NMR Spectroscopy* (2nd edn), John Wiley & Sons: Chichester, **1994**, Chapt. 6 and 10.
- [38] E. de Paula, S. Schreier, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 877.
- [39] G. R. Strichartz, V. Sanchez, R. Arthue, R. Chafetz, D. Martin, *Anesth. Analg.* **1990**, *71*, 158.
- [40] F. Yanagidate, G. R. Strichartz, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, *177*, 91.
- [41] A. Specht, F. Ziarelli, P. Bernad, M. Goeldner, L. Peng, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2641.
- [42] P. Job, *Ann. Chim.* **1928**, *9*, 113.
- [43] L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151.
- [44] R. Rymdém, J. Carlfors, P. J. Stilbs, *J. Incl. Phenom. Macro.* **1983**, *1*, 159.
- [45] S. Shinkai, S. Mori, T. Tsubaki, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5315.
- [46] C. D. Gutsche, L. G. Lin, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 1633.
- [47] C. D. Gutsche, M. Iqbal, *Org. Synth.* **1989**, *68*, 234.
- [48] Y. L. Loukas, V. Vraka, G. Gregoriadis, *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 137.