



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BEATRIZ ROBERTO MADEIRA ALMEIDA RAIMUNDO

Licenciada em Química Aplicada

FLUORESCENT CHEMOSENSOR ENSEMBLE FOR THE DETECTION OF BENZODIAZEPINES IN AQUEOUS MEDIA

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA

Universidade NOVA de Lisboa

Outubro, 2023



FLUORESCENT CHEMOSENSOR ENSEMBLE FOR THE DETECTION OF BENZODIAZEPINES IN AQUEOUS MEDIA

BEATRIZ ROBERTO MADEIRA ALMEIDA RAIMUNDO

Licenciada em Química Aplicada

Orientador: Doutor Nuno Miguel Jesuíno Basílio,
Investigador, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientador: Doutor Artur Jorge Carneiro Moro,
Investigador, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Luísa Maria da Silva Pinto Ferreira,
Professora Associada com Agregação, Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Doutor Pedro Miguel Veríssimo Mateus,
Investigador, Universidade NOVA de Lisboa

Orientador: Doutor Nuno Miguel Jesuíno Basílio,
Investigador, Universidade NOVA de Lisboa

FLUORESCENT CHEMOSENSOR ENSEMBLE FOR THE DETECTION OF BENZODIAZEPINES IN AQUEOUS MEDIA

Copyright © Beatriz Roberto Madeira Almeida Raimundo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Se esta tese me deu gosto a fazer foi porque as pessoas que vou enumerar tornaram a experiência especial.

Não poderia começar os meus agradecimentos sem ser às pessoas que fizeram esta minha ideia possível, aos meus orientadores, Dr. Nuno Basílio e Dr. Artur Moro. Queria agradecer ao Nuno por todo o conhecimento que me transmitiu na Química Supramolecular, nos mil ajustes e excels, nas cinéticas e nos RMNs. Ao Artur tenho de agradecer por toda a ajuda na síntese dos meus compostos, na área da fluorescência e também na descomplicação de muitos conceitos. Foi um prazer trabalhar e aprender convosco, descobrir o mundo dos sensores e da química física, o qual eu fugia a sete pés na licenciatura quando eram os meus professores. Obrigada por todo o apoio em todas as fases da tese, em especial por me darem a oportunidade de apresentar várias vezes o meu trabalho e também por acreditarem que o meu trabalho era de qualidade, mesmo quando eu dizia que não tinha tese porque tinha um resultado mau.

Em segundo lugar, foi muito importante ter um local de trabalho onde me senti bem, compreendida, valorizada e onde nada me faltou. Foi no laboratório de *Photochemistry and Supramolecular Chemistry Reseach Group*. Todos os que por lá passaram neste ano marcaram o meu percurso académico e passo a agradecer às mais importantes.

Joana, foste como uma mentora para mim, cheia de conhecimento sobre caracterização para partilhar e também uns quantos memes. Lili, a deusa das sínteses, sempre que precisava sabia que podia fazer a pergunta mais estúpida. Patrícia, a minha parceira de mestrado que embarcou comigo nesta aventura, sempre com conversas à toa e boas sugestões de animações no PowerPoint. Não menos importante o André Seco (aka Professor Mário que me incentivou a partilhar química com os mais novos), a Alexandra (que adotámos do porto e não queremos que volte), o André Maio, a Bia, o Zé, o Alberto, a Inês, a Miriam, a Hanieh, que foram incríveis

em todas as horas. Gostaria também de agradecer todas as palavras de incentivo e a curiosidade demonstradas no meu trabalho pelo Professor Fernando Pina.

Foi muito importante ter um bom suporte familiar nestas alturas e sem ti mãe não teria sido possível. Ajudaste-me de várias formas a alcançar este objetivo, foste sempre a minha fã nº1 e só te posso agradecer por todo o amor e descomplicação que trazes à minha vida! Aos meus avós maternos, que mesmo não percebendo nada da minha área, viam-me feliz e empenhada e sei que isso lhes chega. Ao meu irmão, que embora não diga, sei que até gosta de mim e está um bocadinho orgulhoso. Ao meu tio Orlando, que sempre se entusiasmou pela minha carreira, o meu obrigada.

Porque nada se faz sem amigos, nestes anos ganhei amigas espetaculares que por coincidência têm o mesmo nome que eu, obrigada por todos os momentos ao longo destes anos, nem que seja para comer um lanche triste no vosso gabinete. Ganhei uma família nova, a minha família de praxe que sempre acreditou em mim e me escolheram neste percurso. Também a todos os meus amigos do Ribatejo que, embora a vida não proporcione mais momentos, foi sempre bom estar com vocês e desanuviar. A todos os que marcaram estes 5 anos na FCT dedico-vos a música da TAESAS "Lágrima".

Há um obrigado muito especial para a pessoa que mais me aturou, Carlitos, obrigado por todas as palavras de encorajamento, obrigado por acreditares no meu potencial mesmo quando eu não queria ver nada à frente, obrigado por queres traçar um futuro comigo, é realmente algo muito especial.

"Sê todo em cada coisa. Põe quanto és No mínimo que fazes" (Fernando Pessoa).

RESUMO

As benzodiazepinas são prescritas para casos de ansiedade, insónia, dores musculares. Devido aos seus efeitos secundários, amplificados na presença de álcool, são classificadas como droga de abuso sexual facilitado. Este problema impacta a sociedade que necessita de combater a adulteração de bebidas alcoólicas, passando pela prevenção: se existir um sensor para detetar este tipo de compostos na escala de μM , estes episódios podem ser minimizados. Iniciou-se um estudo computacional para desenhar o melhor quimiossensor, baseado na complementaridade de forma e o mais promissor foi um recetor da família dos cavitandos, que apresenta uma estrutura com uma cavidade hidrofóbica capaz de acomodar pequenas moléculas orgânicas no seu interior. Este cavitando foi sintetizado e caracterizado por RMN. Os recetores foram posteriormente utilizados para encapsular diferentes estiril cianinas, formando um sensor supramolecular capaz de alterar as suas características óticas na presença de analitos.

Alguns corantes foram completamente encapsulados no interior de cápsulas diméricas, formadas por dois cavitandos ligados entre si por ligações de hidrogénio. A inclusão dos corantes no interior destas estruturas permite isolar completamente a molécula do seio do solvente, alterando drasticamente as suas características espetroscópicas, com uma constante de afinidade na ordem de 10^3 - 10^4 M. Foram escolhidos como sensores para ensaios de competição, onde se realizaram estudos com diversos analitos. Tendo-se obtido resultados positivos testou-se uma benzodiazepina sintetizada, cuja afinidade foi de $2.73 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, com um LoD de $53 \mu\text{M}$ e LoQ de $124 \mu\text{M}$, em 5% metanol. Foi ainda possível a deteção de benzodiazepinas quando na forma de comprimido, mas o seu uso em bebidas alcoólicas foi comprometido, uma vez que o sensor tem afinidade para o etanol, gerando um sinal falso positivo.

Palavas chave: Benzodiazepinas, Cavitandos, Quimiossensor Supramolecular, Ensaio de Substituição do Indicador

ABSTRACT

Benzodiazepines find medical application in treating anxiety, insomnia, and muscle pain. However, their side effects, particularly when combined with alcohol, have led to their categorization as facilitated sexual assault drug. This issue profoundly impacts society, requiring strategies to counteract the tampering of alcoholic drinks. One approach is prevention, wherein the deployment of a μM detector could avoid such incidents. Consequently, a computational study was initiated to identify the optimal chemosensor based on shape complementarity. Among the screened candidates, water-soluble cavitands, characterized by a hydrophobic cavity based on resorcin[4]arene, emerged as the most promising design.

The designed receptors were synthesized and characterized using NMR, UV-Visible, and Fluorescence techniques in the presence of several styryl cyanines. The outcome yielded a sensor with changeable optical properties in response to the presence of an analyte. Some dyes were completely included in dimeric capsules formed by two cavitands, leading to dramatic shifts in their spectroscopic properties. These assemblies showed a substantial affinity constant within the range of 10^3 - 10^4 M and displayed excellent stability. Consequently, these structures were chosen to serve as a self-assembled sensor in Indicator Displacement Assays. Initial experimentation involved various competitors with diverse characteristics, yielded positive results and this driven the subsequent assessment of the analyte of interest. In the case of a synthesized benzodiazepine, the affinity was determined to be $2.73 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, with a LoD of $53 \mu\text{M}$ and a LoQ of $124 \mu\text{M}$, in a 5% methanol solution. Also, tablets containing benzodiazepines were able to be detected. However, the sensor's applicability to alcoholic beverages was compromised, due to its affinity towards ethanol, leading to false positive signals.

Keywords: Benzodiazepines, Cavitand, Supramolecular Chemosensor, Indicator Displacement Assay

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Contextualização e Motivação	1
1.2 Benzodiazepinas.....	3
1.2.1 A química das Benzodiazepinas.....	3
1.2.2 Formas de deteção.....	6
1.2.3 Interferentes – matriz e excipientes	8
1.3 Química Supramolecular e Quimiossensores óticos.....	10
1.3.1 Tipos de Sensores Óticos	10
1.3.2 Unidades Recetoras	12
1.3.3 O Cavitando.....	14
1.3.4 Unidades Sinalizadoras.....	18
1.3.4.1 Solvatocromismo.....	20
1.3.4.2 <i>Twisted Intramolecular Charge Transfer</i>	22
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
2.1 Síntese	25
2.1.1 Síntese de Cavitandos	25
2.1.2 Síntese de Corantes	28
2.1.3 Síntese de análogos de Benzodiazepinas.....	29
2.2 Caracterização dos sistemas por ^1H RMN, ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H ROESY	30
2.2.1 Sistema C1-MeDASPI	30

2.2.2 Sistema C1-EtDASPI.....	36
2.2.3 Sistema C1-JDASPI.....	39
2.2.4 Sistema C2-MeDASPI.....	41
2.2.4.1 RMN ¹ H C2.....	41
2.2.4.2 Cinética de associação.....	43
2.2.4.3 Sistema C2-MeDASPI no equilíbrio.....	44
2.3 Desenvolvimento e Otimização de Quimiossensores – estudo espectroscópico de absorção e fluorescência.....	46
2.3.1 C1-MeDASPI.....	46
2.3.1.1 Cinética.....	46
2.3.1.2 Situação de equilíbrio – constantes de afinidade.....	47
2.1.1.1 Dependência do pH.....	51
2.1.1.2 Dependência da Força Iônica.....	53
2.1.1.3 Dependência da Temperatura.....	54
2.3.2 C1-EtDASPI.....	55
2.3.2.1 Dependência do pH.....	57
2.3.3 C1-JDASPI.....	59
2.3.3.1 Espectroscopias óticas.....	59
2.3.3.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	61
2.3.3.3 Job Plot.....	62
2.3.4 C2-MeDASPI.....	63
2.3.4.1 Cinética.....	63
2.3.4.2 Situação de equilíbrio.....	64
2.3.5 C2-EtDASPI.....	66
2.4 Rendimento Quântico de Fluorescência.....	68
2.5 Ensaio de Competição com C1₂MeDASPI.....	71
2.5.1 Cinética.....	71

2.5.1.1 Cinética associada à concentração	71
2.5.1.2 Cinética associada ao tipo de competidor.....	74
2.5.2 Equilíbrio com Competidores	74
2.6 IDA com Benzodiazepinas	80
2.6.1 Solubilização do analito – Influência de etanol e metanol.....	80
2.6.2 Ensaio de competição de BZD1.....	81
2.6.3 LoD e LoQ.....	83
2.6.4 Caracterização ¹ H RMN C1-BZD1	84
2.6.5 Influência de Excipientes	85
2.6.6 IDA com comprimidos de Benzodiazepinas.....	88
3 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	93
4 PARTE EXPERIMENTAL	97
4.1 Síntese	97
4.1.1 Considerações Gerais	97
4.1.2 Síntese de Cavitandos.....	98
4.1.2.1 Síntese de tetra(hidroxipropil)calix[4]resorcinareno (1.1)	98
4.1.2.2 Síntese de tetra(hidroxipropil)octanitrocavitando (1.2).....	99
4.1.2.3 Síntese de tetra(cloropropil)octanitrocavitando (1.3).....	100
4.1.2.4 Síntese de tetra(cloropropil)octaminocavitando (1.4).....	101
4.1.2.5 Síntese de tetra(cloropropil)tetraureiacavitando (1.5).....	102
4.1.2.6 Síntese de cloreto de tetra(1-metilimidazolio-propil)tetraureiacavitando (C1)103	
4.1.2.7 Síntese de tetra(cloropropil)tetrametilureiacavitando (2.1).....	104
4.1.2.8 Síntese do cloreto de tetra(1-metilimidazóliopropil)tetrametilureiacavitando (C2).....	104
4.1.3 Síntese dos corantes.....	105
4.1.3.1 Síntese de Iodeto de 1,4-dimetilpiridínio (3.1).....	105
4.1.3.2 Síntese de Iodeto de (E)-4-(4-dietilestiril)-1-metilpiridínio (3.2 – EtDASPI).....	106

4.1.4 Síntese de Benzodiazepinas	106
4.1.4.1 Síntese de 2-Bromoacetamida-5-clorofenibenzoilo (4.1)	106
4.1.4.2 Síntese de Nordiazepam (BZD1).....	107
4.2 Caracterização	108
4.2.1 Considerações gerais.....	108
4.2.2 Métodos	108
4.2.2.1 Estudo computacional	108
4.2.2.2 RMN.....	109
4.2.2.3 Titulações monitorizadas por espectroscopias óticas	109
4.2.2.4 Cinética.....	109
4.2.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica	110
4.2.2.6 Estudo de Excipientes	110
4.2.2.7 Tratamento de um comprimido para análise	110
BIBLIOGRAFIA.....	111
A APÊNDICE.....	1
A.1 Breve elucidação das técnicas utilizadas.....	1
A.1.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	1
A.1.2 Espectroscopia de Absorção.....	2
A.1.3 Espectroscopia de Fluorescência.....	3
A.1.4 Calorimetria por Titulação Isotérmica.....	4
A.2 Cálculo de Constantes de Afinidade, pKa e RQF	6
A.2.1 Equilíbrio 1:1 Recetor:Analito	6
A.2.2 Equilíbrio 2:1 Recetor:Analito	7
A.2.3 Competição de um competidor no equilíbrio 2:1	8
A.2.4 Ajuste dos dados experimentais.....	9
A.2.5 Cálculo do pKa.....	9
A.2.6 Rendimento Quântico de Fluorescência	10

A.3 Caracterização por ^1H RMN	12
A.5 Caracterização por UV-Vis e Emissão	23
A.6 Indicator Displacement Assay	24
B COMUNICAÇÕES ORAIS.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação gráfica das respostas à pergunta “Já te adulteraram ou conheces alguém cuja bebida foi adulterada num espaço de entretenimento noturno?”, realizada no âmbito da cadeira de Empreendedorismo 2022 da FCT-NOVA.....	2
Figura 1.2 Tipos de compostos classificados como drogas de abuso sexual facilitado.....	3
Figura 1.3 A estrutura das Benzodiazepinas. (a) Subclasses das Benzodiazepinas em 2D. (b1) Estrutura 3D de Alprazolam da classe das triazolobenzodiazepinas. (b2) Estrutura 3D de Flunitrazepam pertencente 1,4-benzodiazepinas.	4
Figura 1.4 Representação esquemática do recetor GABA _A visto de cima e locais de ligação dos ligandos GABA e BZD (Adaptado ¹⁷)	5
Figura 1.5 Benzodiazepinas utilizadas neste estudo.....	6
Figura 1.6 Sensores fluorescentes previamente reportados para (a) flunitrazepam e (b) nimetazepam (Adaptado de <i>A Carbon-Dot Sensing Probe for Screening of Date Rape Drugs: Nitro-containing Benzodiazepines</i> , 305, Y. Te Yen, Y. S. Lin, T. H. Chen, S. C. Chyueh and H. T. Chang, <i>Sensors Actuators, B Chem.</i> , 1-9, Copyright (2020), com permissão de Elsevier)	8
Figura 1.7 Estruturas químicas de vários produtos naturais e aditivos presentes em bebidas alcoólicas	9
Figura 1.8 Exemplos de quimiossensores dependentes da ligação da unidade recetora com a unidade sinalizadora	11
Figura 1.9 Tipos de Indicator Displacement Assay	12
Figura 1.10 Monómeros das respetivas estruturas macrocíclicas referidas	13
Figura 1.11 Estudo computacional de complementaridade entre o cavitando e o analito flunitrazepam com vista lateral e vista superior	14
Figura 1.12 Conformações estruturais adotadas pelo cavitando C1. À esquerda a conformação velcrando, em cima a conformação de papagaio, em baixo a conformação de vaso e à direita	

a dimerização do vaso, facilitado por ligações de hidrogénio (Reproduzido com permissão de Springer Nature)	14
Figura 1.13 Estruturas de cavitandos rígidos, descobertos por Gibb (à esquerda) e cavitandos dinâmicos reportados por Rebek (à direita) (Reproduzido com permissão de Springer Nature)	15
Figura 1.14 Esquema das interações observadas entre C1 e vários analitos presentes na literatura. Dependendo das características do analito pode existir a formação da meia cápsula (à esquerda) ou da cápsula total (à direita).....	16
Figura 1.15 Reações reportadas dentro de diferentes recetores (C1 e C2) baseados no resorcin[4]areno, com os vários substratos e reagentes.....	16
Figura 1.16 (a) Estrutura molecular do cavitando C1 (b) estrutura 3D das ligações de hidrogénio realizadas pelo cavitando C1 (c) Estrutura molecular do cavitando C2.....	18
Figura 1.17 Corantes fluorescentes utilizados em IDA com diversos cavitandos	19
Figura 1.18 Esquema ilustrativo da utilização das duas famílias de corantes utilizadas para deteção de resíduos de lisina, citrulina e THC. A verde escuro a estiril cianinas (2), a verde claro e vermelho a fluoresceína (3) e a vermelho o THC (Usado com permissão de Royal Society of Chemistry, de Selective sensing of THC and related metabolites in biofluids by host:guest arrays, A. D. Gill, B. L. Hickey, W. Zhong and R. J. Hooley, 56, 2023; permissão transmitida através de Copyright Clearance Center, Inc.)	19
Figura 1.19 Corantes solvatocrómicos sintetizados e caracterizados para o trabalho	20
Figura 1.20 À esquerda a estrutura benzenóide da MeDASPI com os grupos doadores e aceitadores de eletrões evidenciados e do lado direito a forma quinóide.....	21
Figura 1.21 Esquema exemplificativo das energias de transição eletrónica nos diversos tipos de solvatocromismo	22
Figura 1.22 Energia do estado excitado e do estado fundamental quando a perda de energia é por ICT (<i>intramolecular charge transfer</i>) ou por TICT (<i>twisted intramolecular charge transfer</i>) (Usado com permissão de Royal Society of Chemistry, de <i>Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: From mechanisms to rational designs of bright and sensitive</i> , C. Wang, W. Chi, Q. Qiao, D. Tan, Z. Xu and X. Liu, 50, 2023; permissão transmitida através de Copyright Clearance Center, Inc.).....	22
Figura 2.1 Esquema sintético dos cavitandos C1 e C2	26
Figura 2.2 Esquema dos passos sintéticos para a obtenção do corante EtDASPI	28
Figura 2.3 Esquema reacional da síntese do análogo de benzodiazepina BZD1.....	29

Figura 2.4 Titulação do corante MeDASPI ([MeDASPI]=0.5 mM) na ausência e presença de concentrações superiores de C1 seguida por ¹ H RMN, em D ₂ O. De baixo para cima aumenta a concentração do recetor.....	30
Figura 2.5 Efeito de anisotropia magnética do anel aromático (Adaptado ⁶⁶).....	31
Figura 2.6 RMN ¹ H do equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI ([C1]=1.44 mM e [MeDASPI]=1 mM) em D ₂ O	33
Figura 2.7 ¹ H- ¹ H COSY do equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI ([C1]=1.44 mM e [MeDASPI]=1 mM) em D ₂ O.....	34
Figura 2.8 ¹ H- ¹ H ROESY do equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI ([C1]=1.44 mM e [MeDASPI]=1 mM) em D ₂ O.....	34
Figura 2.9 ¹ H RMN do equilíbrio 2:1 C1:MeDASPI ([C1]=3.11 mM e [MeDASPI]=1.18 mM) em D ₂ O.....	35
Figura 2.10 Titulação seguida por ¹ H RMN do corante EtDASPI ([EtDASPI]=0.5 mM) na presença de concentrações superiores de cavitando 1 em D ₂ O, de baixo para cima aumenta a concentração de C1	37
Figura 2.11 RMN ¹ H do equilíbrio 1:1 C1:EtDASPI ([C1]=1.2 mM e [EtDASPI]=0.5 mM) em D ₂ O	38
Figura 2.12 Comparação de estruturas moleculares otimizadas através da aplicação <i>HyperChem8</i> , a verde o recetor C1 e a tons de azul os corantes. (a) Estrutura de cápsula C1 ₂ MeDASPI (b) Estrutura de meia cápsula C1MeDASPI (c) Estrutura de meia cápsula C1EtDASPI (d) Estrutura de cápsula C1 ₂ EtDASPI	39
Figura 2.13 Espetro ¹ H RMN da titulação de JDASPI ([JDASPI]=0.5 mM) com C1 em D ₂ O. De baixo para cima aumentam as concentrações de C1 e está identificado o sinal 1' correspondente aos metilos da dimetilanilina de JDASPI	40
Figura 2.14 RMN ¹ H do equilíbrio 1:1 C1:JDASPI ([C1]=1.1 mM e [MeDASPI]=0.5 mM) em D ₂ O	41
Figura 2.15 Espetro de ¹ H RMN do cavitando C2 (5 mM), em D ₂ O, com a respetiva identificação de cada sinal dos protões	42
Figura 2.16 De baixo para cima: RMN ¹ H do cavitando C2 (0.5 mM) em D ₂ O; Espetros de RMN ¹ H de C2-MeDASPI em quantidades equimolares (0.5 mM) ao longo do tempo durante 75 minutos, em D ₂ O; Espetro RMN ¹ H do corante MeDASPI (1 mM), em D ₂ O	44
Figura 2.17 RMN ¹ H do equilíbrio 1:1 C2:MeDASPI ([C2]=1.2 mM e [MeDASPI]=0.5 mM) em D ₂ O.....	45

Figura 2.18 Espectros de absorção da mistura C1 e MeDASPI ($[MeDASPI]=1 \times 10^{-5}$ M) ao longo do tempo (minutos). da esquerda para a direita a proporção de C1:MeDASPI é 0.5:1, 1:1, 5:1. Os dados experimentais no máximo de absorção estão ligados entre si para melhor compreensão.....	46
Figura 2.19 Espectros de Absorção UV-Vis do MeDASPI (5×10^{-6} M, em água) obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C1 (Do espectro amarelo (MeDASPI) existe um desvio para um máximo de absorção a 485 nm, a laranja (C1MeDASPI), e depois para 565 nm, a rosa (C1 ₂ MeDASPI). O tratamento de dados experimentais dos comprimentos de onda encontram-se evidenciados com as respectivas cores está presente.....	47
Figura 2.20 Equilíbrios observados na titulação de C1 a MeDASPI à esquerda. À direita, as soluções do corante livre, no equilíbrio 1:1 e 2:1 com C1, com e sem irradiação de luz a 366 nm.	48
Figura 2.21 Espectros de Emissão do MeDASPI ($[MeDASPI]=5 \times 10^{-6}$ M) quando excitado a (a) 455 nm e (b) 510 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1, acompanhado por um aumento de emissã.o O tratamento de dados experimentais nos máximos de emissão também estão presentes.....	50
Figura 2.22 Desvio de Stokes do corante MeDASPI em água, no equilíbrio 1:1 e 2:1 com C1	51
Figura 2.23 Equilíbrio ácido-base do corante MeDASPI.....	52
Figura 2.24 Espectro de Absorção da titulação do complexo C1:MeDASPI ($[MeDASPI]=2.4 \times 10^{-5}$ M e $[C1]=3.2 \times 10^{-5}$ M), em água. A laranja o espectro inicial a pH=6.8 e a rosa o espectro final a pH<0.5.....	52
Figura 2.25 Equilíbrios propostos com a diminuição de pH numa solução com C1MeDASPI, em água.....	53
Figura 2.26 Espectro de absorção de UV-Vis do complexo C1 ₂ MeDASPI ($[C1]=8 \times 10^{-5}$ M e $[MeDASPI]=6 \times 10^{-6}$ M) em água, variando a temperatura. (O aumento da temperatura faz com que a banda a 565 perca intensidade e a cor de rosa encontra-se o espectro da regeneração da temperatura).....	55
Figura 2.27 Espectro de Absorção do EtDASPI ($[EtDASPI]=5 \times 10^{-6}$ M), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1 (Do espectro amarelo (EtDASPI) existe um desvio para um máximo de absorção a 490 nm, a laranja (C1EtDASPI), e depois para 570 nm, a rosa (C1 ₂ EtDASPI). O tratamento de dados experimentais encontram-se evidenciados com as respectivas cores	56
Figura 2.28 Espectros de Emissão do EtDASPI ($[EtDASPI]=5 \times 10^{-6}$ M) quando excitado a (a) 465 nm e (b) 510 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando	

1, acompanhado por um aumento de emissão. O tratamento de dados experimentais nos máximos de emissão também estão presentes.....	57
Figura 2.29 Equilíbrio ácido-base do corante EtDASPI em meio aquoso	58
Figura 2.30 Espectro de Absorção da titulação ácido-base do complexo C1:EtDASPI (1×10^{-5} M de EtDASPI e 1.7×10^{-5} M de C1), em água. Iniciou-se a titulação a pH=6.2 (a amarelo) e no final pH<0.5. O tratamento dos dados nos máximos de absorção também se encontra presente.....	58
Figura 2.31 Espectros de Absorção do JDASPI ($[JDASPI]=3 \times 10^{-6}$ M), em <i>batch</i> à esquerda e direto à direita, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1 (A titulação inicia-se no espectro a amarelo (JDASPI) deslocando-se para o espectro a laranja (C1JDASPI). O tratamento dos dados experimentais no máximo de absorção também está presente	60
Figura 2.32 Espectros de Emissão do JDASPI ($[JDASPI]=5 \times 10^{-6}$ M) quando excitado a 455 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C1, acompanhado por um aumento da fluorescência ao longo da titulação. O tratamento dos dados experimentais no máximo de emissão também se encontra presente.....	61
Figura 2.33 Curva de titulação isotérmica de C1MeDASPI (0.5 e 0.05 mM respetivamente), em água. À esquerda está presente a quantidade de calor que foi reposta a cada adição de C1, em μ W. À direita encontra-se o perfil da titulação por esta técnica em função da fração molar de C1.....	62
Figura 2.34 Método de variação contínua de C1 e JDASPI ($[JDASPI]_{\text{máx}}=2 \times 10^{-5}$ M), em água e seguido por espectroscopia de UV-Vis.....	63
Figura 2.35 Espectros de absorção UV-Visível de C2-MeDASPI ($[MeDASPI]=1 \times 10^{-5}$ M), em água. ao longo do tempo (minutos). Da esquerda para a direita a proporção de C2:MeDASPI é 0.4:1, 1:1, 4:1. Os dados experimentais no máximo de absorção estão ligados entre si para melhor compreensão.....	63
Figura 2.36 Esquema cinético dos vários equilíbrios envolvidos na encapsulação do corante nos cavitandos.....	64
Figura 2.37 (a) Espectro de Absorção de MeDASPI (1×10^{-5} M, em água), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2. A titulação inicia-se no espectro a amarelo (MeDASPI) e termina no espectro a laranja (C2MeDASPI) (b) Espectros de Emissão do MeDASPI (1×10^{-5} M, em água), quando excitado a 422 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2, acompanhado por um aumento de fluorescência. Os tratamentos dos dados para os máximos de intensidade também estão presentes	65

Figura 2.38 (a) Espectro de Absorção de EtDASPI (1×10^{-5} M, em água), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2. A titulação inicia-se no espectro a amarelo (EtDASPI) e termina no espectro a laranja (C2EtDASPI) (b) Espectros de Emissão do EtDASPI (1×10^{-5} M, em água), quando excitado a 437 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2, acompanhado por um aumento de fluorescência. Os tratamentos dos dados para os máximos de intensidade também estão presentes.....	66
Figura 2.39 Esquema representativo da encapsulação dos corantes MeDASPI e EtDASPI no recetor C1, acompanhado pelos desvios químicos observados por RMN ^1H de alguns prótons dos corantes.....	70
Figura 2.40 Esquema reacional do IDA com o complexo ternário $\text{C1}_2\text{MeDASPI}$, na presença de um competidor. À direita encontram-se os competidores utilizados e numerados de 1 a 7...	71
Figura 2.41 Espectro de UV-Visível da cinética de uma solução $\text{C1}_2\text{MeDASPI}$ (8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M respetivamente) quando adicionado 2.5×10^{-5} M de cloreto de adamantanamina (B1) à solução, em água, ao longo do tempo (minutos). Antes da adição corresponde ao espectro rosa a tracejado, após a adição de B1 corresponde ao espectro a laranja e no final do tempo obteve-se o espectro rosa a cheio. Os pontos experimentais a 565 nm encontram-se presentes ligados entre si para melhor compreensão.....	72
Figura 2.42 Esquema reacional da autorregeneração da cápsula: quando existe excesso da meia cápsula, uma forma inativa do cavitando transforma-se em cavitando ativo (K_4), que permite a encapsulação completa do corante (K_3').....	73
Figura 2.43 (a) Espectro de UV-Visível da titulação de uma solução de $\text{C1}_2\text{MeDASPI}$ (8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M respetivamente), quando adicionado concentrações crescentes de anilina (B5) à solução, em água. A titulação iniciou-se no espectro a rosa e terminou no espectro a laranja. (b) Espectro de UV-Visível da titulação de uma solução 2:1 $\text{C1}:\text{MeDASPI}$ (1×10^{-4} M e 8×10^{-6} M respetivamente) quando adicionado concentrações crescentes de iodeto de trimetildodecilamina (B6) à solução, em água. A titulação iniciou-se no espectro a rosa e terminou no espectro a amarelo. O tratamento dos dados com as respetivas cores dos máximos de absorção também está presente.....	75
Figura 2.44 Espectro de Fluorescência da titulação de uma solução de $\text{C1}_2\text{MeDASPI}$ (8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M respetivamente) quando adicionado concentrações crescentes de (a) anilina (B5) ou (b) trimetildodecilanilina (B6) à solução, em água. A titulação inicia-se no espectro a rosa. O <i>ajuste</i> dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.....	77

Figura 2.45 Espectro de UV-Visível da titulação de C1 (1.3×10^{-5} M), em água, com adição do competidor B6. Dados experimentais e dados calculados da titulação C1-B6 para o comprimento de onda fixo a 300 nm, em água	78
Figura 2.46 (a) Espectro UV-Visível da titulação de uma solução de C1 ₂ MeDASPI ([MeDASPI]= 4×10^{-6} M e [C1]= 8×10^{-5} M) quando adicionado concentrações crescentes de BZD1 à solução aquosa com 5% MeOH. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. (b) Espectro Emissão ($\lambda_{ex}=510$ nm) da titulação de uma solução de C1 ₂ MeDASPI ([MeDASPI]= 4×10^{-6} M e [C1]= 8×10^{-5} M) quando adicionado concentrações crescentes de BZD1 à solução aquosa com 5% MeOH. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do competidor também se encontra presente.....	82
Figura 2.47 Titulação seguida por ¹ H RMN de BZD1 (0.5 mM) titulado com C1 em 5:95 MeOD:D ₂ O. De baixo para cima aumenta a concentração de C1.....	85
Figura 2.48 Espectro de UV-Vis do composto C1 ₂ MeDASPI ([C1] = 1×10^{-4} M e [MeDASPI] = 8×10^{-6} M) na presença de 7 excipientes diversos numa solução aquosa com 10% MeOH, com as concentrações presentes na tabela 7	87
Figura 2.49 Estrutura proposta para a interação entre o polieletrólito E7 e o cavitando C1	88
Figura 2.50 Estrutura molecular do princípio ativo presente em cada comprimido de benzodiazepina	89
Figura 2.51 (a) Espectro UV-Vis das soluções de comprimidos de benzodiazepinas juntamente com um ensaio controlo. (b) Registo fotográfico das soluções obtidas de benzodiazepinas com o IDA, em 10% MeOH ([MeDASPI]= 6×10^{-6} M e [C1]= 8×10^{-5} M).....	89
Figura 2.52 (a) Espectro de Emissão das soluções de comprimidos de benzodiazepinas juntamente com um ensaio controlo, quando excitado a 510 nm. (b) Registo fotográfico das soluções obtidas de benzodiazepinas com o IDA, em 10% MeOH ([MeDASPI]= 6×10^{-6} M e [C1]= 8×10^{-5} M), sob uma lâmpada a 366 nm	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Desvios químicos dos protões do corante MeDASPI a diferentes proporções de cavitando 1.....	36
Tabela 2. Desvios químicos dos protões do corante EtDASPI a diferentes proporções de cavitando 1.....	38
Tabela 3. Referencias utilizadas para o estudo do RQF e as suas respectivas características ⁷¹ ..	68
Tabela 4. Rendimento quântico de fluorescência para os corantes MeDASPI, EtDASPI e JDASPI quando encapsulados no cavitando com estequiometria de 1:1 e 1:2	69
Tabela 5. Constantes de afinidade para os 6 diferentes competidores, retirados através dos dados de absorvância e fluorescência, seja pelo modo direto ou pelo método indireto de IDA	78
Tabela 6. Comparação das constantes de afinidade K_1 e K_2 com o recetor C1 e o corante MeDASPI.....	80
Tabela 7. Valores de LoD e LoQ do sensor $C1_2$ MeDASPI para BZD1 através de duas técnicas de espectroscopia.....	84
Tabela 8. Lista de excipientes presentes nos comprimidos a testar com as respectivas informações relevantes	86

GLOSSÁRIO

Abs	Absorvância
API	<i>Active Principal Ingredient</i>
BZD	Benzodiazepina
BZD1	Nordiazepam
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CEDIA	<i>Cloned-Enzyme Donor Immunoassay</i>
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CPS	<i>Counts per Second</i>
CTI	Calorimetria de Titulação Isotérmica
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
D₂O	Água deuterada
ELISA	<i>Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EtDASPI	Iodeto de trans-4-[4-(dietilamino)-estiril]-1-metilpiridínio
EtOAc	Acetato de Etilo
EtOH	Etanol
GABA	Ácido gama-aminobutírico

GHB	Ácido gama-hidroxibutírico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
IDA	<i>Indicator Displacement Assay</i>
JDASPI	Iodeto de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-trimetilamoniopropilpiridí- nio
LE	<i>Locally Excited</i>
LFIA	<i>Lateral Flow Immunoassay</i>
LoD	Limite de Detecção
LoQ	Limite de Quantificação
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MeDASPI	Iodeto de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridínio
MeOD	Metanol Deuterado (d4)
ppm	Partes por milhão
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RQF	Rendimento Quântico de Fluorescência
ROESY	<i>Rotating-frame Nuclear Overhauser effect Spectroscopy</i>
TICT	<i>Twisted Intramolecular Charge Transfer</i>
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SIMBOLOS

Å	Unidade de medida: Angström (10^{-10} m)
b	Percurso ótico (cm)
B_o	Campo magnético exterior
c	Parâmetro de Wisemann
d	Dubleto
I	Intensidade da Fluorescência (CPS)
I_N	Spin Nuclear
K_a	Constante de acidez
K_D	Constante de dissociação
K_n	Constante de afinidade
m	Multiplete
ε	Coefficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$)
π	Razão entre o perímetro de uma circunferência e o seu diâmetro: 3,1416
σ	Contante magnética de Blindagem
δ	Desvio Químico
γ	Razão magnetogírica ($T^{-1}s^{-1}$)
h	Constante de Planck

λ	Comprimento de Onda (nm)
ν	Frequência (Hz)
λ_{ex}	Comprimento de Onda de Excitação (nm)
Φ	Rendimento Quântico de Fluorescência
ΔH	Diferença de Entalpia
ΔS	Diferença de Entropia
ΔE	Diferença de Energia
ΔG	Diferença de Energia Livre de Gibbs
l	percurso ótico (cm)
M	Molaridade (mol/L)
q	Quadruplete
R	Constante universal de gases perfeitos: $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
s	Singuleto
S_0	Estado fundamental singuleto
S_1	Primeiro estado excitado singuleto
n	Estequiometria de ligandos (CTI)
n_i	Índice de Refração
T	Temperatura
t	Tripuleto

INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresenta-se a contextualização do trabalho, bem como uma breve discussão de conceitos importantes para a compreensão do documento. Primeiro será introduzida a problemática das drogas e a importância da sua deteção, posteriormente foca-se na técnica utilizada para realizar a deteção de uma classe de moléculas que não apresenta um quimiossensor na literatura, as benzodiazepinas (BZDs), introduzindo conceitos de quimiossensores e da química supramolecular com recetores baseados no resorcin[4]areno.

1.1 Contextualização e Motivação

A adulteração de comidas ou bebidas de um utilizador sem o seu consentimento constitui um crime de elevada relevância e que cada vez tem mais impacto na sociedade. Por norma, as bebidas são adulteradas com drogas ilegais ou por medicação com prescrição, com o intuito de deturpar o discernimento da vítima, de forma a poderem abusar da mesma, seja num assalto, assédio sexual ou com outro objetivo.¹

Dados de um estudo realizado nos Estados Unidos da América, reportam que 1 em cada 13 estudantes universitários já teve a sua bebida adulterada, já no Reino Unido 1 em cada 10 mulheres afirma ter sido vítima deste mesmo crime.^{2,3} De forma a entender o impacto desta temática em Portugal, no âmbito da cadeira de "Empreendedorismo 2022" na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, foi realizado um questionário com 393 respostas. Neste universo, as idades foram maioritariamente entre os 18-23 e cerca de 70 % eram do sexo feminino. As respostas à pergunta "Já te adulteraram ou conheces alguém cuja

bebida foi adulterada num espaço de entretenimento noturno?” encontram-se na figura 1.1 e as respostas positivas rondam os 50 %. Significa que esta problemática em Portugal é real e necessita de maior cuidado.

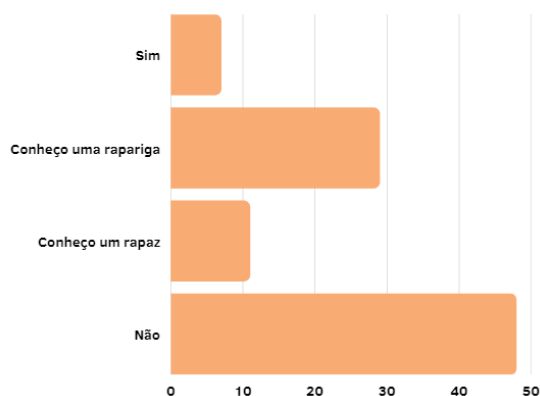


Figura 1.1 Representação gráfica das respostas à pergunta “Já te adulteraram ou conheces alguém cuja bebida foi adulterada num espaço de entretenimento noturno?”, realizada no âmbito da cadeira de Empreendedorismo 2022 da FCT-NOVA.

Os compostos que são considerados drogas de abuso sexual facilitado incluem: etanol, cannabis, cocaína, benzodiazepinas, anfetaminas, cetamina, barbitúricos e GHB (Figura 1.2 Tipos de compostos classificados como drogas de abuso sexual facilitado).⁴ Estes compostos podem ter dois efeitos diferentes no corpo humano: por um lado muitos deles como a heroína e as benzodiazepinas que têm um efeito sedativo, deixam o utilizador desorientado, com sonolência e até pode levar a desmaios. Por outro lado, a cocaína e as metanfetaminas, têm um efeito não sedativo, deixando o utilizador num estado de euforia, êxtase, desinibição que podem levar a situações de tonturas e relaxamento. Estes sintomas são ainda mais potencializados quando associados com bebidas alcoólicas, daí ser muito importante a sua deteção nestas bebidas.¹ A identificação em bebidas alcoólicas facilita a investigação pois a concentração do analito é superior que no corpo humano e não existe metabolização das drogas o que torna a análise mais simples do que numa matriz biológica.⁵ A matriz biológica (urina, sangue, cabelo, saliva) apresenta uma elevada complexidade, o analito está muito mais diluído devido ao maior volume de circulação mas também devido à sua metabolização para posterior excreção, sofrendo hidrólises, oxidações, glicoconjugação, etc.⁶

Já foram reportados alguns sensores baseados em nanomateriais (como por exemplo *carbon dots* e nanopartículas de ouro) para muitos destes analitos e que são aplicáveis a bebidas de

cariz alcoólico^{7,8,9}. Também existem alguns quimiossensores supramoleculares baseados em cucurbiturilos e cavitandos para detetar a presença de alguns destes compostos em meios aquosos,^{10,11,12} com exceção das benzodiazepinas que têm recebido pouca atenção, sendo, por este motivo, a falha que se pretende colmatar.

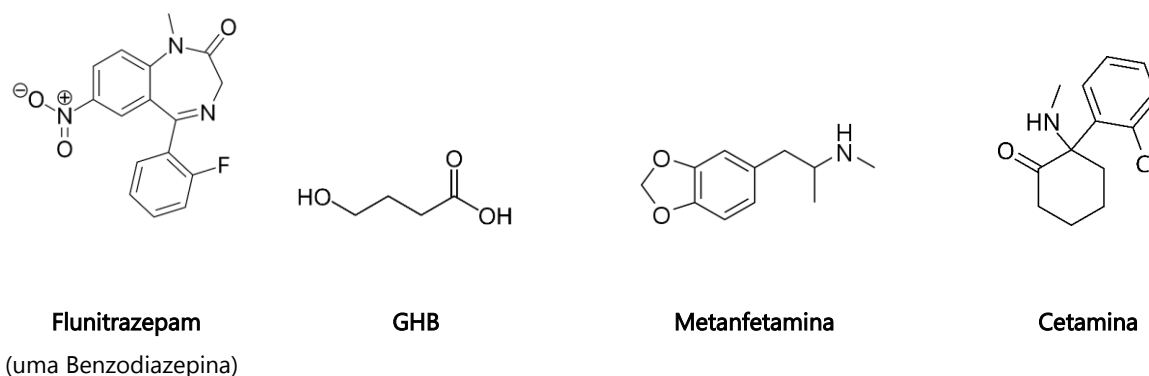


Figura 1.2 Tipos de compostos classificados como drogas de abuso sexual facilitado

1.2 Benzodiazepinas

1.2.1 A química das Benzodiazepinas

As benzodiazepinas foram escolhidas como objeto de estudo deste trabalho por diversas razões.

Estes compostos foram inicialmente descobertos acidentalmente pela empresa F. Hoffmann-La Roche AG, nos anos 50 e na década seguinte foram colocados no mercado farmacêutico. Cerca de 60 anos depois, esta família de fármacos, classificado com psicoativos, são dos mais vendidos para o tratamento de ansiedade, insónia, epilepsia, dependência de álcool e também usado nas cirurgias como sedativo.¹³ Este tipo de compostos começou a ser bastante utilizado pela população no lugar dos barbitúricos, uma vez que estes apresentam baixo índice terapêutico e alto potencial de abuso.¹⁴ Estima-se que o seu consumo atingiu 30% de pessoas com mais de 65 anos em França, mais de 20% no Canadá e na Espanha, 15% na Austrália e entre 9 a 12% nos Estados Unidos,¹⁵ desta forma pode-se concluir que é um fármaco presente no quotidiano das sociedades desenvolvidas.

As moléculas em estudo apresentam um esqueleto de uma (1,4)-diazepina, fundida com um anel de benzeno. Podem ocorrer diversas funcionalizações em diferentes posições, desta forma

foram agrupadas em diversas classes, como representadas na figura 1.3a. Estas moléculas apresentam estruturas 3D complexas, pois os anéis não se encontram no mesmo plano, fruto do anel de sete membros. Estas duas características tornam bastante difícil a deteção geral deste tipo de moléculas porque o seu esqueleto é muito pouco funcionalizado e por isso pouco reativo, e o facto de terem grupos funcionais diferentes em cada classe, alterando a química de cada grupo também dificulta este processo. Por outro lado, a estrutura 3D complexa (Figura 1.3b) e também dependente dos grupos funcionais, dificulta o uso de quimiosensores baseados em interações não covalentes que possam ser estabelecidas com os grupos funcionais. Assim muitos dos sensores presentes na literatura e que serão abordados no subcapítulo 1.3.1, foram postos de parte, sendo a opção mais fiável um sensor estruturalmente complementar e adequado à fraca polaridade das classes mais disseminadas deste tipo de compostos.

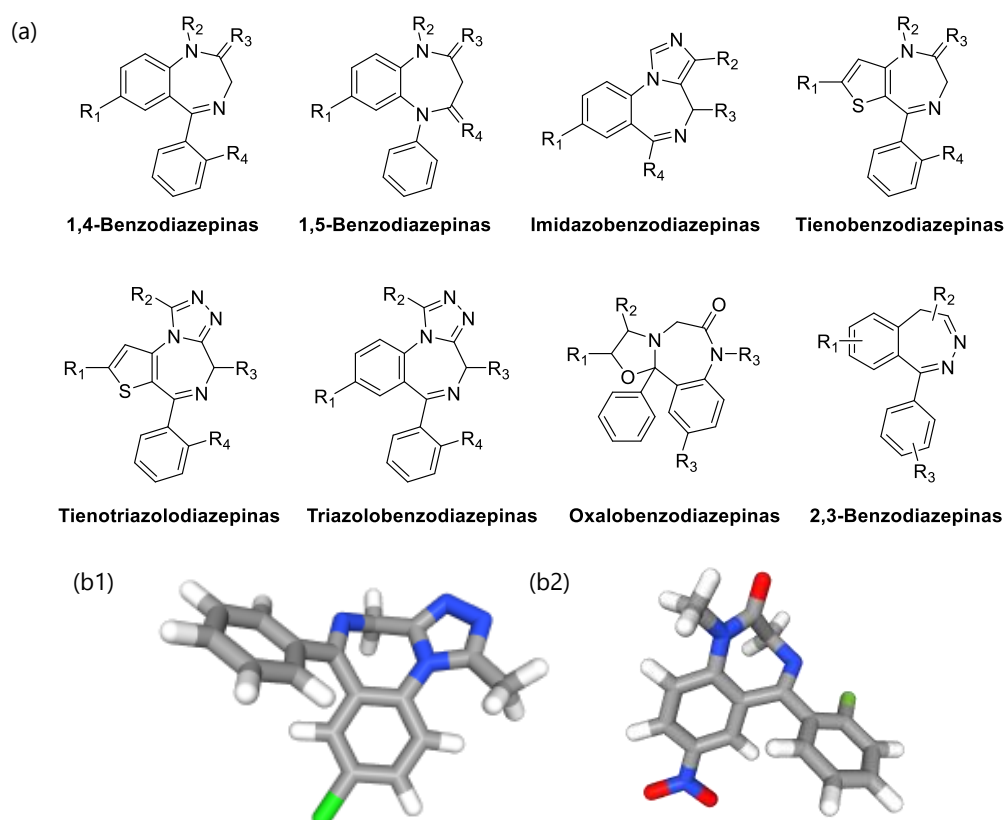


Figura 1.3 A estrutura das Benzodiazepinas. (a) Subclasses das Benzodiazepinas em 2D. (b1) Estrutura 3D de Alprazolam da classe das triazolobenzodiazepinas. (b2) Estrutura 3D de Flunitrazepam pertencente 1,4-benzodiazepinas.

No geral, as benzodiazepinas interagem com o Sistema Nervoso Central, mais concretamente com o recetor $GABA_A$ que se encontra na membrana sináptica. O ligando endógeno respetivo é o ácido γ -aminobutírico (GABA), que tem como função inibir a libertação de iões cloreto para a fenda sináptica. O recetor é composto por 5 subunidades glicoproteicas (2α , 2β e 1γ) e apresenta 2 centros ativos para o GABA se ligar. Quando o recetor e o ligando interagem ocorre uma mudança da conformação e ocorre uma hiperpolarização da membrana, devido ao aumento da passagem de iões cloreto. A consequência é a diminuição de neurotransmissores na fenda sináptica devido à inibição da sua excitação e desta forma, o efeito sentido pelo utilizador é de relaxação.¹⁶ Este processo é facilitado na presença de ligandos alostéricos, como por exemplo as BZDs. Como os lugares de ligação do GABA não estão acessíveis é necessário existir uma alteração conformacional para a ligação ser possível. Entre a subunidade α e γ existe um centro ativo alostérico com elevada afinidade para as moléculas em estudo.⁶ (Figura 1.4)

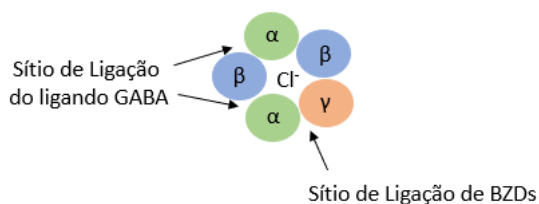


Figura 1.4 Representação esquemática do recetor $GABA_A$ visto de cima e locais de ligação dos ligandos GABA e BZD (Adaptado¹⁷)

O recetor $GABA_A$ tem outros ligandos alostéricos como é o caso dos barbitúricos, anestésicos, esteróides, catiões e etanol. Quando se utiliza álcool e benzodiazepinas de forma conjunta pode acontecer o seguinte:¹⁸

- Aumento dos efeitos sentidos pelo utilizador em comparação à toma individual, o que pode levar a uma diminuição da capacidade cognitiva e aumento do tempo de reação.
- A quantidade de álcool que é necessária para atingir a overdose é muito menor. A farmacocinética do álcool é muito mais rápida ($t_{1/2}$ 4 a 6 horas) que a farmacocinética das BZDs ($t_{1/2}$ 2 a 100 horas), por isso, estes últimos vão permanecer mais tempo inalterados no organismo, o que pode levar a lesões graves a nível do cérebro ou outros órgãos.
- Risco de efeitos secundários adversos e inesperados como alergias, vômitos, náuseas, ataque cardíaco, psicose, falência renal, entre outros.

- Risco de dependência dos dois compostos.

A alta disponibilidade na sociedade, juntamente com o aumento dos efeitos das BZDs na presença de álcool foram as principais razões que motivaram este trabalho. Algumas BZDs foram reunidas para serem estudadas, na forma de comprimidos e estão presentes na figura 1.5.

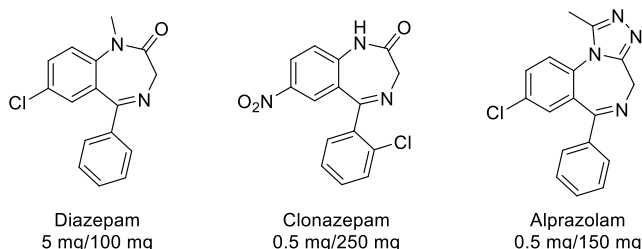


Figura 1.5 Benzodiazepinas utilizadas neste estudo

O diazepam é vendido comercialmente como Valium®, o clonazepam como Rivotril® e o Alprazolam como Xanax®. O diazepam e clonazepam encaixam na classe das 1,4-benzodiazepinas e o alprazolam pertence às triazolobenzodiazepinas, as classes mais significativas.

Já o Flunitrazepam foi comercializado inicialmente como Rohypnol® (Figura 1.2), mas devido ao seu rápido e forte efeito quando combinado com outras drogas (como amnésia, diminuição da capacidade física e cognitiva), foi retirado do mercado em muitos dos países, devido ao potencial de utilização para abusos sexuais e outros crimes, por isso não foi possível realizar o seu estudo, embora seja das drogas de abuso mais utilizadas.¹⁹

1.2.2 Formas de deteção

As dificuldades de detetar as substâncias ilícitas em bebidas de teor alcoólico prendem-se com a matriz relativamente complexa e também os excipientes presentes nos comprimidos, por isso as formas de deteção através destas matrizes são escassas.

Por norma, as benzodiazepinas são detetadas quantitativamente através de dois métodos: por ensaios imunológicos (ELISA, CEDIA, LFIA, RIA) ou por cromatografias (HPLC, LC-MS). Os ensaios imunológicos contam com a presença de um antigénio que se liga ao anticorpo, as BZDs, e posteriormente esta interação se traduz num sinal, tipicamente colorimétrico ou fluorescente.²⁰ Já a cromatografia requer um pré-tratamento de amostra para posteriormente ser injetada numa coluna e separar os compostos de interesse. Estes métodos apresentam alguns

problemas como: aparelhos dispendiosos, não têm a capacidade de conceder o resultado de forma instantânea, não pode ser utilizado pelo utilizador comum devido à sua complexidade e os interferentes das matrizes são um desafio que dificultam o estudo dos resultados.²¹

Outros métodos eletroanalíticos como por exemplo a voltametria e da potenciometria, conseguem diminuir o preço da técnica, mas continuam a existirem desvantagens, como interferência das matrizes e complexidade para um utilizador comum.²²

De forma a dar resposta a alguns problemas enunciados como por exemplo: a complexidade, o tempo de resposta, a capacidade de utilização por qualquer utilizador e sem ser num ambiente controlado de laboratório, os testes colorimétricos visam responder a grande parte destes desafios. Nestes testes existe uma molécula que responde à presença das BZDs alterando as suas propriedades óticas em função da presença do analito no momento da adição.

Neste momento a literatura para este tipo de sensores aplicados a BZDs é escassa, tendo sido encontrados apenas dois exemplos.

Em 2013, Buranachai e colegas publicaram o primeiro sensor fluorescente para a deteção do flunitrazepam (Figura 1.6a). Neste artigo os autores otimizaram a protonação deste analito com um ácido forte (2M de ácido perclórico) e promoveram a formação de uma espécie com características fluorescentes, o 2-nitro-*N*-metilacridona, em etanol. O limite de deteção foi apreciável: 1 μM e foi possível de aplicar a bebidas alcoólicas transparentes com elevado teor de álcool.²³ Neste estudo carece a aplicação para outros tipos de BZD, uma vez que a acidez das diferentes classes é muito diferente e, conseqüentemente, a capacidade de utilizar esta técnica fica aquém do esperado. Por outro lado, o manuseamento de um ácido tão forte não deve ser efetuado por qualquer utilizador. Por último, o rendimento quântico da espécie fluorescente é de apenas 0.06, o que torna a resposta à presença de BZDs pouco sensível.

Já mais recentemente, Chang e colegas reportaram um sensor baseado em *quantum dots* de carbono hidrofóbico, que interage com o grupo nitro das benzodiazepinas e tem a capacidade de suprimir as suas características fluorescentes (Figura 1.6b). Este estudo permitiu a identificação de quatro estruturas de BZDs em diversas bebidas alcoólicas através de uma extração com tolueno. O limite de deteção para o nimetazepam foi de 7.24 μM , um rendimento quântico alto e uma supressão da fluorescência a rondar os 40%.²⁴ Este ensaio foi bastante completo e

demonstrou a sensibilidade e aplicabilidade dos *carbon-dots*, faltando apenas expandir o ensaio para ser possível analisar em outras BZDs que não tenham o grupo funcional -NO₂.

Desta forma, existem ainda algumas falhas nestes estudos a serem colmatadas como por exemplo a aplicação de um sensor a várias classes de BZDs, uma resposta colorimétrica e fluorescente independente de excipientes e matrizes, elevada seletividade e de fácil utilização.

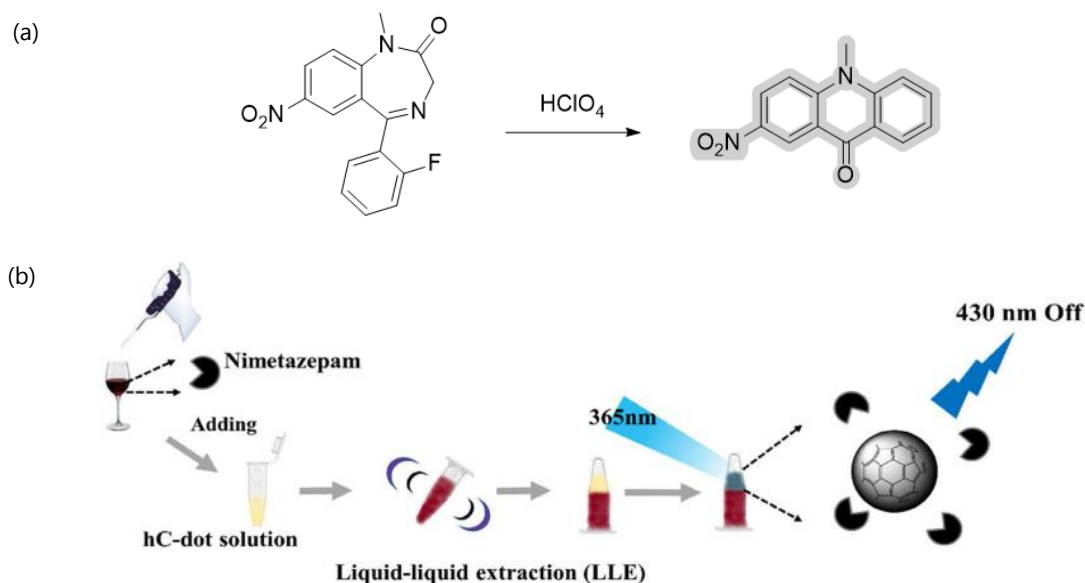


Figura 1.6 Sensores fluorescentes previamente reportados para (a) flunitrazepam e (b) nimetazepam (Adaptado de *A Carbon-Dot Sensing Probe for Screening of Date Rape Drugs: Nitro-containing Benzodiazepines*, 305, Y. Te Yen, Y. S. Lin, T. H. Chen, S. C. Chyueh and H. T. Chang, *Sensors Actuators, B Chem.*, 1-9, Copyright (2020), com permissão de Elsevier)

1.2.3 Interferentes – matriz e excipientes

Embora uma bebida alcoólica apresente uma matriz mais simples que uma matriz biológica, existem alguns componentes que podem interferir com quimiossensores.

As bebidas alcoólicas no geral são constituídas por água e por etanol, variando a percentagem desde 3% (cerveja) a 50% (licores),²⁵ portanto é de extrema importância que o sensor seja estável em diversas proporções de álcool e água. Posteriormente, cada bebida alcoólica apresenta diferentes aditivos que lhe conferem diversas características. Estes aditivos podem provir de uma fonte natural ou são adicionados posteriormente ao produto para melhorar as suas características de sabor, cor ou estabilidade, como por exemplo corantes, aromatizantes, adoçantes e conservantes. Aos primeiros pertencem: pigmentos, carboidratos, ácidos, compostos

voláteis, compostos fenólicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, minerais ou vitaminas (Figura 1.7).²⁶ Muitos destes compostos têm estruturas grandes, hidrofílicas e complexas, por isso é importante que o sensor seja bastante seletivo para a estrutura única e relativamente hidrofóbica das benzodiazepinas.

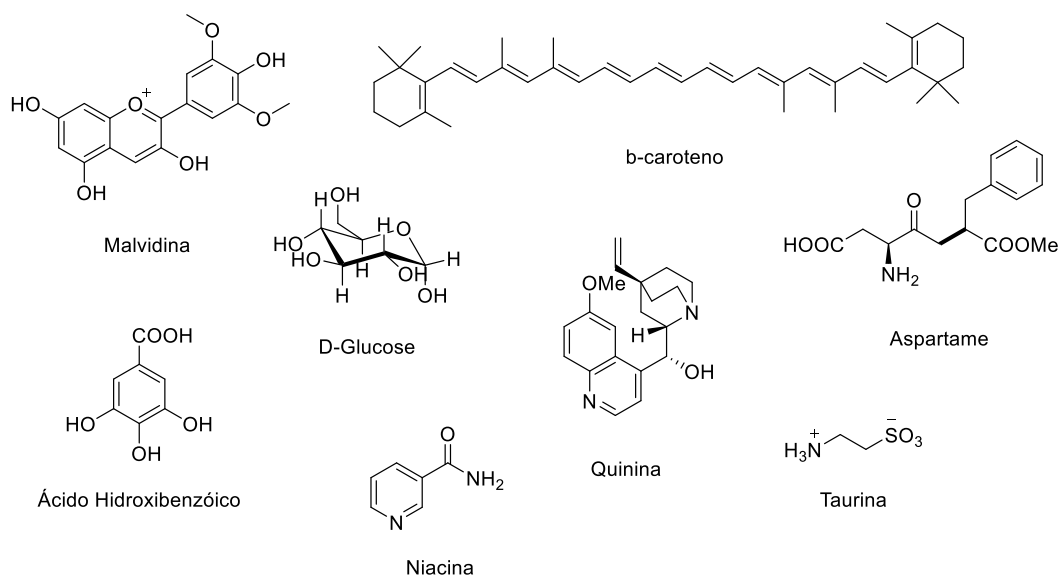


Figura 1.7 Estruturas químicas de vários produtos naturais e aditivos presentes em bebidas alcoólicas

Para além destes possíveis interferentes também existem aqueles que estão presentes nos comprimidos. Por norma, a adulteração quando é feita com compostos com prescrição médica, vêm na forma de comprimido que conta com o ingrediente com princípio ativo (API) e os excipientes. Os excipientes farmacêuticos são substâncias inertes que são incluídos para aprimorar o processo de fabricação, proteger, apoiar ou aumentar a estabilidade, melhorar a biodisponibilidade e aceitabilidade do paciente para o API.^{27,28}

Os excipientes podem ser agrupados em diversas categorias:

- Diluentes – açúcares, silicatos, sais
- *Binders* – polímeros como amido, celulose
- Desintegrantes – amidos, celulose, alginatos
- Redutores de fricção – sílica coloidal
- Lubrificantes – estearato de magnésio
- Filmes protetores – polímeros de celulose
- Agentes de coloração – corantes utilizados na alimentação

A maior parte dos excipientes são também estruturas volumosas, como os polímeros, e são altamente hidrofílicos, por isso contrastam neste parâmetro com as benzodiazepinas, sendo estas características de relevo e que podem ser úteis para a sua identificação seletiva.

1.3 Química Supramolecular e Quimiossensores óticos

1.3.1 Tipos de Sensores Óticos

Tendo em conta as questões anteriormente referidas na secção 1.2.2, este trabalho focar-se-á no desenvolvimento de um quimiossensor ótico específico para BZDs. Um quimiossensor ótico é um tipo de sensor desenhado para detetar e quantificar a presença de substâncias específicas, utilizando as alterações óticas para detetar a sua presença.²⁹ Neste caso, os analitos-alvo serão as benzodiazepinas e o sinal detetável será uma mudança de cor ou fluorescência para ser visível ao utilizador. Este tipo de técnica tem sido utilizado em diversas áreas das ciências e tecnologia devido à sua versatilidade, baixo custo, resposta rápida e sensibilidade.³⁰

Os sensores químicos podem ser divididos em dois grandes grupos. O exemplo mais simples é a interação covalente entre o sensor e o analito, que depois produz uma resposta ótica. Assim, para este fenómeno acontecer, a interação entre ambos tem de alterar as características eletrónicas, por norma do recetor, de modo a ocorrer alteração do sinal. Este tipo de sensores é pouco utilizado porque o desenho experimental de um recetor que ligue covalentemente é trabalhoso. O exemplo que será utilizado e explicado com mais detalhe vem ultrapassar o problema anterior a vários níveis, que são os sensores baseados em interações não covalentes. Dentro destes sistemas também existem os nanossensores que, acoplados com quimiossensores ou sozinhos, têm mostrado também a sua superioridade devido à elevada funcionalização e estabilidade.³¹

Os quimiossensores são caracterizados por realizarem interações não covalentes entre o recetor e o analito, como por exemplo interações de *van der Waals*, dispersão, interações π - π , ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, ião-dipolo, catião- π , entre outras. A energia destas interações é baixa e por isso os sistemas podem ser reversíveis, caso seja facultado um determinado estímulo.³² Estes sistemas necessitam de uma unidade recetora, que interage não

covalentemente com o analito, e um cromóforo ou fluoróforo que altera as suas propriedades óticas na presença do analito. Existem várias formas de combinar estas duas unidades: as mesmas podem se encontrar na mesma molécula ou podem ser duas moléculas em separado que interagem em solução.²⁹ Os vários tipos de quimiossensores supramoleculares encontram-se representados na figura 1.8.

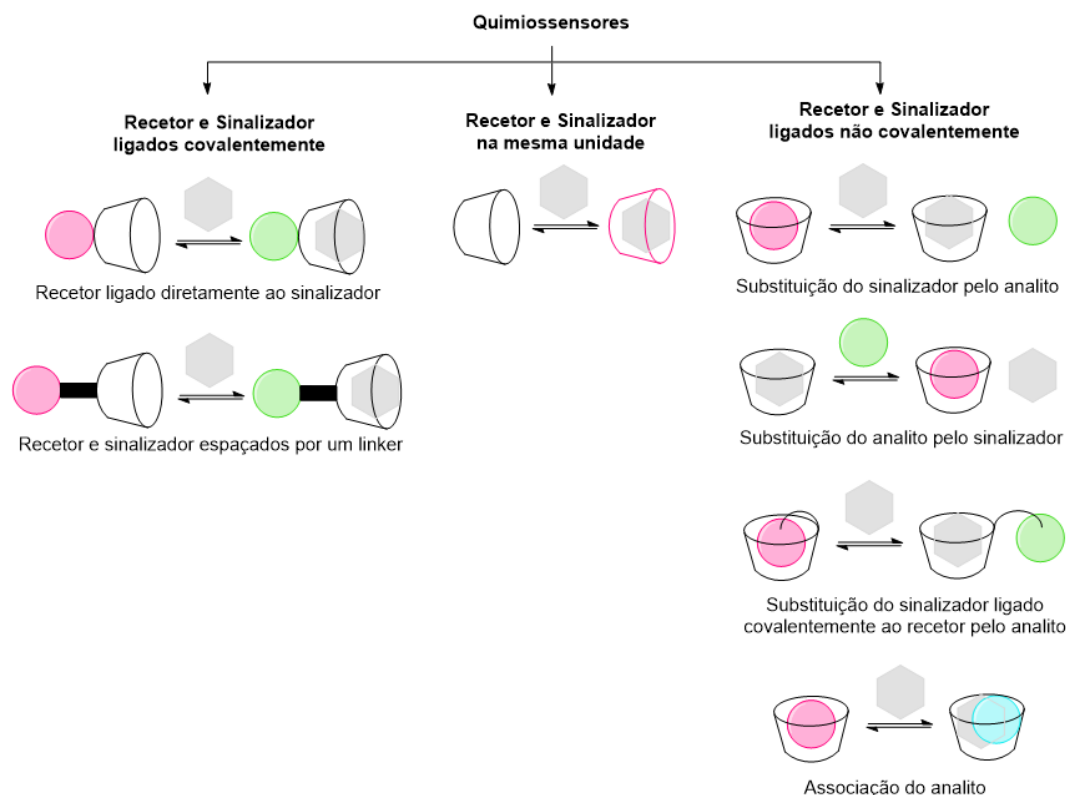


Figura 1.8 Exemplos de quimiossensores dependentes da ligação da unidade recetora com a unidade sinalizadora

A ligação covalente entre o recetor e o sinalizador pode ser mais desafiante sinteticamente, mas igualmente importante em diversas áreas. No caso do presente trabalho referente a receptores supramoleculares, apenas a ligação não covalente entre as duas unidades será estudada, mais especificamente a substituição da unidade sinalizadora pelo analito (IDA, *Indicator Displacement Assay*) devido à simplicidade do sistema.

Os ensaios de IDA foram criados nos anos 90 pelas equipas de Inouye, Shinkai, e Anslyn e a partir dessa altura este tipo de estudos foi amplamente utilizado em diversas áreas, desde o reconhecimento de pequenas moléculas orgânicas, a gases tóxicos ou biomarcadores.³³

Por norma, o recetor é uma unidade supramolecular e tanto o analito como o sinalizador têm afinidade para a unidade hospedeira. Para a substituição ocorrer é necessário que o analito tenha a capacidade de substituir o sinalizador, seja por ter uma constante de afinidade mais alta ou por estar em elevada concentração. Estes sensores podem funcionar num regime "turn-off" quando a associação corante-recetor tem fluorescência/cor, perdendo-a na presença na presença do analito num regime de "turn-on", que funcionam pelo método contrário, e ainda os ratiométricos onde existe alteração da cor ou fluorescência para diferentes comprimentos de onda (figura 1.9). Por norma, os penúltimos sensores são os mais desejados pois é visualmente mais fácil detetar o aumento de fluorescência.³⁴

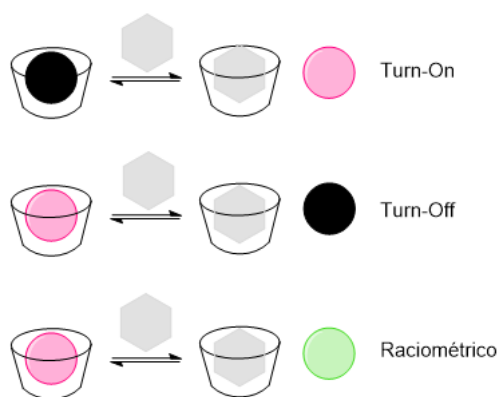


Figura 1.9 Tipos de Indicator Displacement Assay

As diversas unidades que constituem o IDA vão ser apresentadas individualmente nos próximos subcapítulos e as técnicas de espectroscopia ótica que serão utilizadas neste trabalho encontram-se descritas no apêndice A.1.

1.3.2 Unidades Recetoras

Desde os anos 80 que surgiu um grande interesse em estruturas macrocíclicas capazes de mimetizar sistemas biológicos, como uma enzima que reconhece um ligando. Em 1987, Lehn, Cram, e Pedersen foram galardoados com o Prémio Nobel da Química pelas suas descobertas sobre os sistemas de *Host-guest Chemistry*.³⁵ Estes sistemas são constituídos por duas moléculas, o analito/substrato e um hospedeiro, este último normalmente de grandes dimensões que engloba o analito, interagindo ambos entre si por ligações não covalentes.³⁶

Alguns exemplos de recetores amplamente utilizados nas mais diversas áreas são: as ciclodextrinas (α -D-glicopirranose), cucurbiturilos (unidades de glicoluril), calixarenos (unidades fenólicas), pilararenos (unidades de dialcoxibenzeno ou hidroquinona), cavitandos (unidades de resorcinol), entre outros (Figura 1.10). Todos podem formar interações não covalentes, mas os seus tamanhos, formas da cavidade, densidade eletrónica e interações específicas variam entre si. Desta forma, foram feitos estudos computacionais para compreender a complementaridade entre a conformação do analito (o flunitrazepam foi usado como modelo representativo da BZDs), e do hospedeiro.

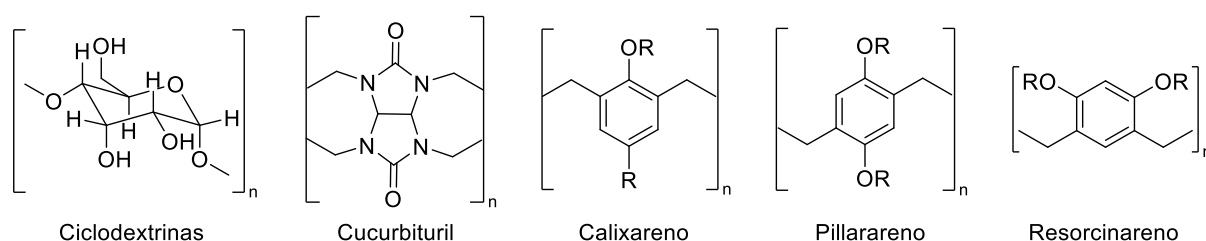


Figura 1.10 Monómeros das respetivas estruturas macrocíclicas referidas

O estudo computacional foi realizado através da aplicação *HyperChem8*. Neste programa existem várias formas de tratar este tipo de interações, sendo a escolhida a otimização de geometria. Neste programa, é estudada a superfície potencial da molécula e são realizadas alterações a nível de ângulos, comprimentos de ligação, organização espacial dos grupos, entre outros. Ao alterar estes parâmetros a energia potencial é minimizada até se encontrar um mínimo local, que não é propriamente o mínimo de energia geral. O método de procura utilizado neste programa foi o gradiente conjugado que na procura do mínimo de energia recorre ao histórico de minimização para calcular a direção da pesquisa e converge mais rápido.³⁷ A estrutura que revelou melhor complementaridade foi o cavitando, uma unidade de resorcin[4]areno modificado de forma a expandir o volume da cavidade (figura 1.11).

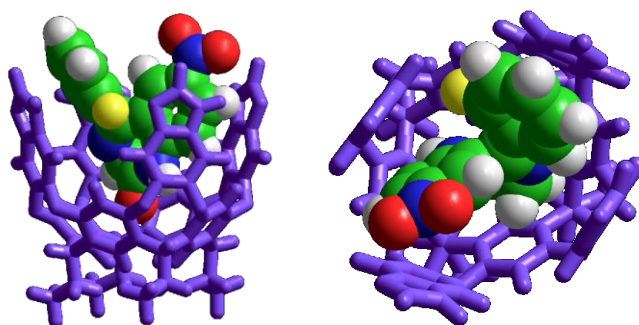


Figura 1.11 Estudo computacional de complementaridade entre o cavitando e o analito flunitrazepam com vista lateral e vista superior

1.3.3 O Cavitando

Descobertos inicialmente por Cram, os cavitandos são estruturas macrocíclicas com um interior concavo e hidrofóbico, capazes de reconhecer pequenas moléculas em meio orgânico.³⁸ São estruturas supramoleculares baseadas no resorcin[4]areno e ao longo dos anos a sua síntese foi sendo aprimorada para conter mais painéis aromáticos e ainda grupos funcionais diversos, o que por vezes pode impedir que sejam sempre estruturas concavas bem definidas.³⁹

A sua forma pode ser considerada um vaso fechado quando a sua conformação é C_{4v} . Esta estrutura também pode abrir para uma conformação D_{2h} , que se assemelha a um papagaio de papel. Ambas as estruturas podem dimerizar entre si, dependendo do estímulo e do tipo de funcionalização do anel superior, e formam uma cápsula com uma cavidade hidrofóbica no interior.⁴⁰

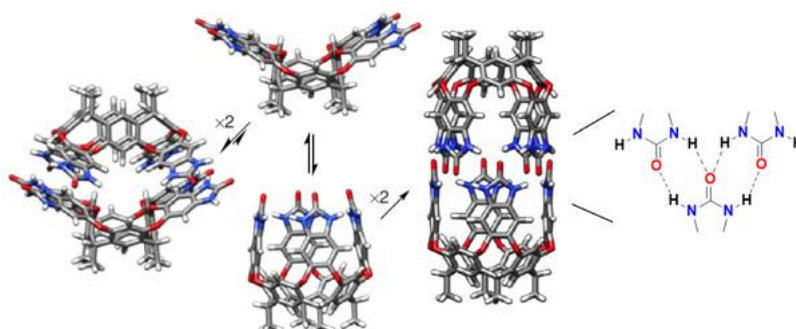


Figura 1.12 Conformações estruturais adotadas pelo cavitando C1. À esquerda a conformação velcro, em cima a conformação de papagaio, em baixo a conformação de vaso e à direita a dimerização do vaso, facilitado por ligações de hidrogénio (Reproduzido com permissão de Springer Nature)

A cápsula de papagaio dimerizado, o velcrando, é favorável em solventes polares, como é o caso da água, porque diminuem a repulsão entre a cavidade hidrofóbica e as respectivas moléculas de solvente, e os painéis aromáticos interagem entre si por interações π - π . A conformação de vaso fechado acontece quando existe um solvente que favoreça esta conformação ou quando existe um analito passível de encapsular. A forma dimérica de vaso é atingida quando o cavitando realiza interações por ligações de hidrogênio entre si e quando o analito tem as propriedades corretas. (Figura 1.12)

Este tipo de estruturas, apelidados de Cavitandos de Rebek, apresentam movimento dinâmico entre as diversas conformações. Por outro lado, existe outro tipo de cavitandos rígidos que são conhecidos como Cavitandos de Gibb (Figura 1.13). Estes últimos têm uma forma cilíndrica (8 Å de largura e altura) e uma estrutura rígida que impede o aparecimento de outras conformações. Os cavitandos de Rebek são interessantes para albergar moléculas um pouco maiores como é o caso das benzodiazepinas (8.5 x 12 Å).⁴⁰

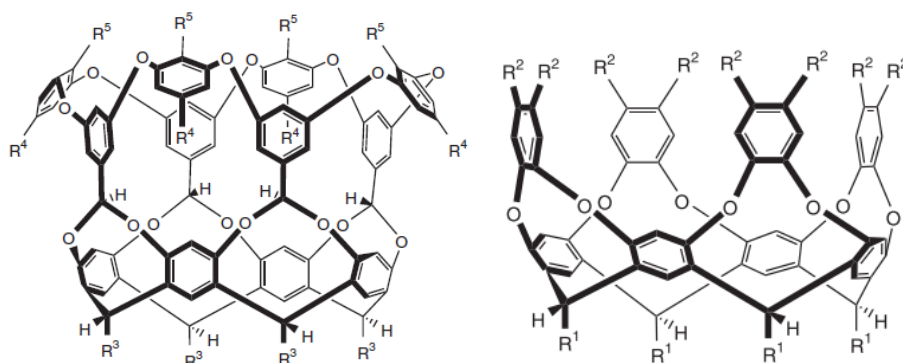


Figura 1.13 Estruturas de cavitandos rígidos, descobertos por Gibb (à esquerda) e cavitandos dinâmicos reportados por Rebek (à direita) (Reproduzido com permissão de Springer Nature)

Estes hospedeiros têm provado ser muito versáteis, pois conseguem encapsular moléculas com carga ou neutras, cadeias alquílicas ou aromáticas, pequenos ou grandes analitos devido à sua estrutura dinâmica e devido à sua parede aromática que consegue realizar interações do tipo catião- π , empilhamento π - π , bem como toda a funcionalização que pode ocorrer no anel superior.⁴¹⁻⁴⁴ Quando os analitos interagem com o cavitando C1, que pode formar complexos 1:1 ou 2:1, o seu tamanho e carga são muito importante para determinar o tipo de encapsulação. Na figura 1.14 encontram-se presentes alguns analitos que interagem com C1 e que podem formar a meia cápsula ou a cápsula completa.

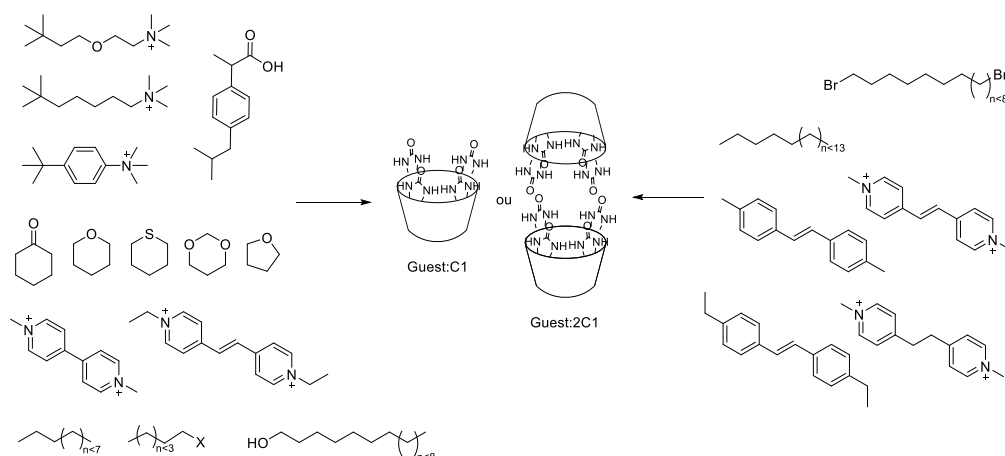


Figura 1.14 Esquema das interações observadas entre C1 e vários analitos presentes na literatura. Dependendo das características do analito pode existir a formação da meia cápsula (à esquerda) ou da cápsula total (à direita)

Para além do reconhecimento de moléculas também existe a capacidade de realizar reações dentro destes contentores moleculares. Esta estratégia obriga moléculas hidrofóbicas a serem introduzidas dentro da cavidade para preencherem o espaço da cavidade, como é o caso de cadeias alifáticas que tendem a pré organizarem-se numa estrutura *gauche*. Fora da cavidade encontram-se os grupos funcionais, que na presença de um catalisador realizam reações descritas, como é o caso da ciclização, epoxidação, reduções, entre outras (Figura 1.15).^{45–47}

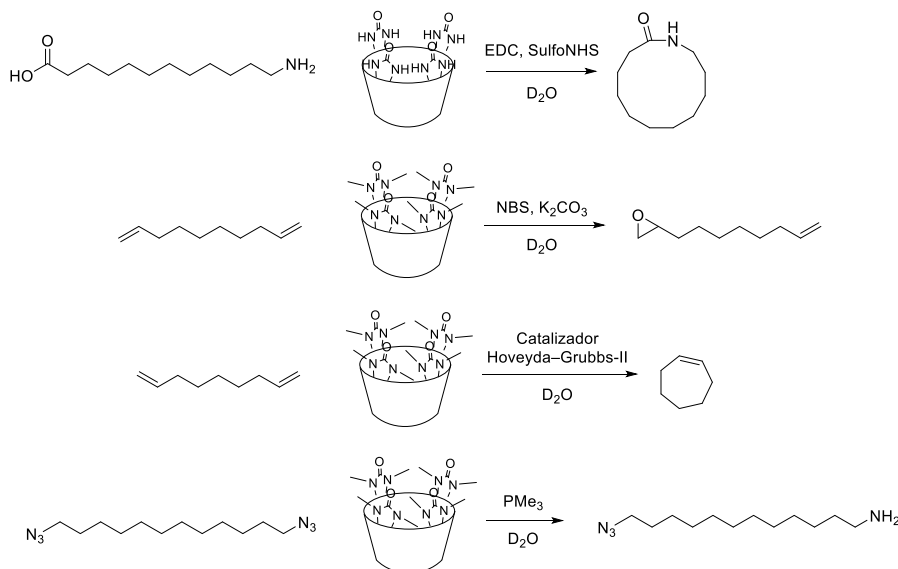


Figura 1.15 Reações reportadas dentro de diferentes recetores (C1 e C2) baseados no resorcin[4]areno, com os vários substratos e reagentes.

Um dos objetivos para estas estruturas era a sua solubilização em água. A água é o solvente mais verde, abundante e de elevada utilidade, sendo preferível quando comparado com solventes orgânicos. Outra razão, é porque os recetores encontrados na natureza como as proteínas, cujos sintéticos se baseiam, são todos solúveis em água, pois só neste solvente é possível proliferar a vida. Importa salientar que a água tem a possibilidade de realizar ligações não covalentes importantes como ligações de hidrogénio e outras interações de natureza electrostáticas, o que pode influenciar as interações entre o hospedeiro e o analito. Outro ponto interessante é o comportamento da água dentro da cavidade do cavitando, pois dentro desta estrutura os analitos sentem o efeito hidrofóbico, obrigando estas moléculas a sair da cavidade para encapsular moléculas orgânicas, que encontram maior estabilidade dentro do macrociclo.

Em 2001, estas dificuldades foram superadas por Gibb, que sintetizou o primeiro cavitando solúvel em água e a partir daí vários exemplos surgiram ao longo do tempo.⁴⁸ No ano seguinte, Mendoza apresentou o conceito de cavitando com cavidade profunda, apresentando um cavitando cujo anel superior era constituído por ureias e por essa razão conseguia fazer ligações de hidrogénio com outra molécula igual (C1, Figura 1.16a). Estas interações dão origem a uma estrutura dimérica em forma de cápsula.⁴⁹ Juntando ambas as características, Rebek sintetizou um cavitando de cavidade profunda e solúvel em água, que é possível de se realizar em 6 passos lineares, com rendimentos superiores a 60 % e a partir de materiais comercialmente disponíveis.⁴⁰ De forma a estudar as interações presentes no anel superior do cavitando C1, que são responsáveis pelas interações por ligações de hidrogénio com o analito, adaptou-se a mesma síntese para o cavitando C2 (Figura 1.16c), através da metilação com iodeto de metano e carbonato de cézio.⁵⁰

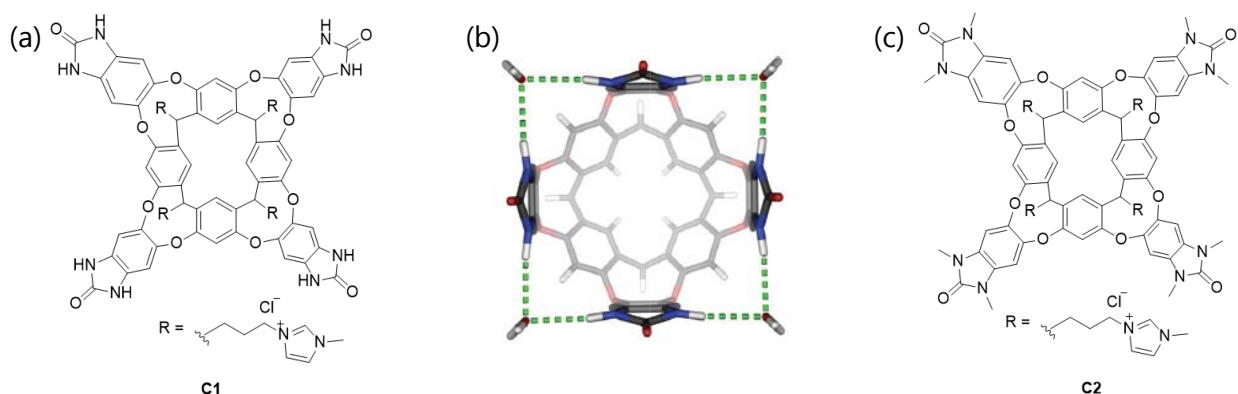


Figura 1.16 (a) Estrutura molecular do cavitando C1 (b) estrutura 3D das ligações de hidrogénio realizadas pelo cavitando C1 (c) Estrutura molecular do cavitando C2

O cavitando C1 tem doadores (N-H) e aceptores (C=O) de ligações de hidrogénio, por isso tem a capacidade de se encontrar na conformação vaso dimerizado devido a estas interações.⁴³ Já o cavitando C2 não tem a mesma capacidade de ser doador por ligações de hidrogénio, pois não tem doadores disponíveis e assim não consegue formar a cápsula dimérica.⁵⁰

1.3.4 Unidades Sinalizadoras

Para proceder aos ensaios de IDA, é necessária uma unidade sinalizadora, que tenha um sinal detetável para o utilizador e por isso que altere as suas características quando em interação com o recetor. Como o objetivo deste trabalho é que o sistema funcione com uma mudança de cor, mas também de fluorescência, é necessário escolher um corante com ambas as capacidades óticas.

Inicialmente, realizou-se um *triagem* dos diversos corantes que já foram testados em cavitandos semelhantes para entender o nível de afinidade, agregação, estabilidade nas condições de estudo e alterações espectroscópicas. Como estes cavitandos têm sido maioritariamente estudados por RMN, não subsiste a necessidade de existir a alteração de cor, por isso a biblioteca de compostos não é extensa. Os corantes mais utilizados encontram-se na figura 1.17.

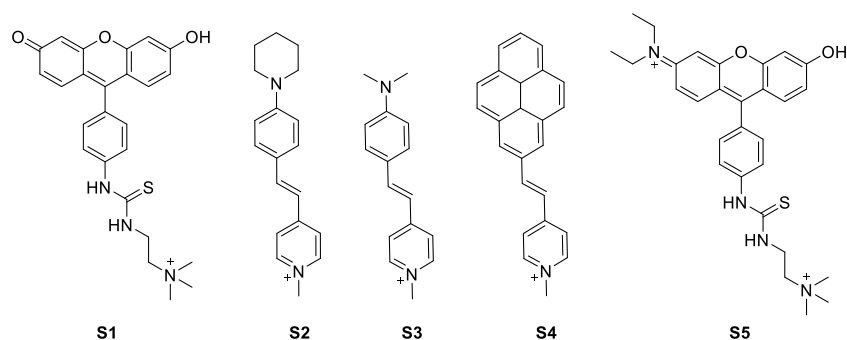


Figura 1.17 Corantes fluorescentes utilizados em IDA com diversos cavitandos

Muitos destes corantes foram testados com cavitandos com alterações estruturais no arco superior, como por exemplo a presença de grupos carboxilato, ou amidas, o que pode alterar não só a afinidade, mas também as características espectroscópicas. Existem basicamente duas famílias de compostos utilizados como unidades sinalizadoras fluorescentes: os S1 e S5 (fluoresceína), que dentro do cavitando agregam a estrutura corante-recetor na forma de vesícula e perdem a sua fluorescência, o que se traduz num sensor do tipo "turn-on", na presença de um analito de interesse. Já os corantes do tipo merocianina como: S2, S3 e S4 funcionam de forma contrária uma vez que a sua fluorescência é aumentada significativamente dentro de cavidades hidrofóbicas como as do cavitando, desta forma o sensor funciona de forma "turn-off", pois perde a fluorescência quando existe competição pela cavidade com um analito (Figura 1.18). No grupo de Hooley, ambas as famílias de corantes são utilizadas para a deteção de THC e derivados, citrulina e péptidos que sofram de modificações pós-translacionais.⁵¹⁻⁵⁵

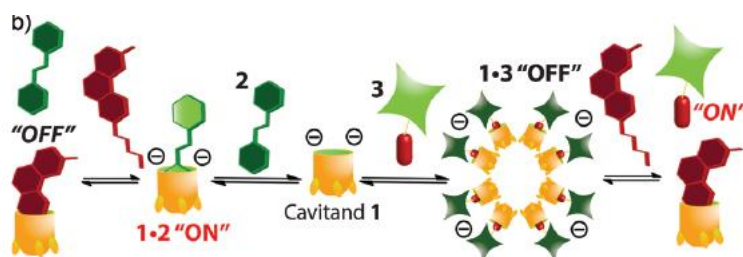


Figura 1.18 Esquema ilustrativo da utilização das duas famílias de corantes utilizadas para deteção de resíduos de lisina, citrulina e THC. A verde escuro a estiril cianinas (2), a verde claro e vermelho a fluoresceína (3) e a vermelho o THC (Usado com permissão de Royal Society of Chemistry, de Selective sensing of THC and related metabolites in biofluids by host:guest arrays, A. D. Gill, B. L. Hickey, W. Zhong and R. J. Hooley, 56, 2023; permissão transmitida através de Copyright Clearance Center, Inc.)

Não existindo um corante na literatura para os cavitandos em estudo, decidiu-se estudar apenas a família de compostos baseados em estiril cianinas, devido à sua simplicidade estrutural, possibilidade de formação da cápsula com dois cavitandos e devido às grandes alterações das suas características óticas devido aos fenômenos de solvatocromismo e transferência de carga intramolecular torcida (TICT, do inglês "*Twisted Intramolecular Charge Transfer*").

Para tal, utilizaram-se três corantes com pequenas diferenças estruturais entre si, como se pode observar pela figura 1.19. O primeiro corante, MeDASPI, é o mais simples de todos e pretende ser comparado com o EtDASPI e entender se o aumento da cadeia alifática da amina, o grupo doador de elétrões, tem influência na afinidade. Também o JDASPI que tem uma cadeia alifática ligada ao anel de piridínio e mais uma carga positiva foi utilizado para entender o nível de encapsulação desta estrutura.

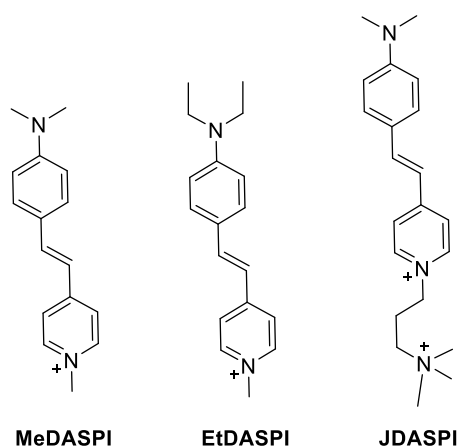


Figura 1.19 Corantes solvatocrômicos sintetizados e caracterizados para o trabalho

1.3.4.1 Solvatocromismo

O termo solvatocromismo é muito utilizado nas áreas da química e também da biologia pois nestas áreas a utilização de corantes é elevada e o estudo dos diferentes meios e a consequente alteração de polaridade é de alta relevância. Este termo é utilizado para caracterizar uma molécula que altere as suas propriedades óticas, tanto em termos de absorvância como fluorescência, quando sujeito a ambientes com diferente polaridade.⁵⁶

Os solventes afetam as transições eletrônicas entre o estado fundamental e o estado excitado, em particular as transições $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ e transferências de cargas, devido a interações

intermoleculares soluto-solvente, que podem estabilizar ou destabilizar os dois estados de formas diferentes.

As moléculas sensíveis a estas alterações de polaridade são chamadas corantes solvatocrômicos ou de transferência de carga. Para tal, as mesmas necessitam de ter um grupo doador de elétrons (D), um grupo aceitador de elétrons (A) e um sistema conjugado entre ambos os grupos para possibilitar a transferência de carga pelo sistema.⁵⁷ Os corantes que são utilizados neste estudo possuem estas características (figura 1.20).

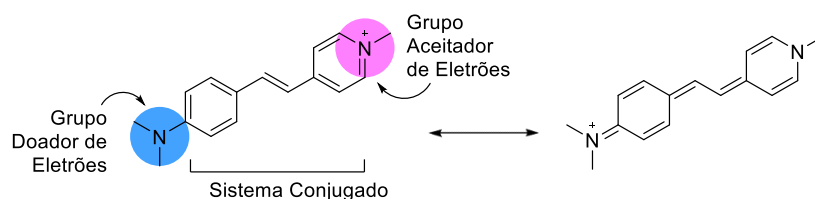


Figura 1.20 À esquerda a estrutura benzenóide da MeDASPI com os grupos doadores e aceitadores de elétrons evidenciados e do lado direito a forma quinóide

Para deslocar a maior densidade de carga da amina, o sistema conjugado entra em ressonância com a sua forma quinóide. Desta forma, quando uma molécula deste tipo é irradiada tende a transferir a sua carga pelo sistema e a tornar-se menos polar. Estudos computacionais mostram uma diminuição do momento dipolar do estado excitado.⁵⁸

A alteração do momento dipolar das moléculas no estado fundamental e no estado excitado vai ser altamente influenciada pelos solventes e as mesmas podem ser observadas por espectroscopia de absorvância e fluorescência, pois as suas bandas vão ter máximos de absorção e emissão a comprimentos de onda diferentes.

Existem dois tipos de solvatocromismo, dependendo de como o composto responde às alterações de polaridade, o solvatocromismo positivo e negativo. Para moléculas cujo estado excitado é mais polar que o fundamental, verifica-se um desvio batocrômico (comprimento de onda superiores) no máximo de absorção com o aumento da polaridade do solvente, resultante da estabilização da esfera de solvatação do estado excitado, através do rearranjo das moléculas de solvente. Este fenómeno designa-se por solvatocromismo positivo. No caso específico do sistema a ser empregue, o estado excitado é menos polar que o fundamental. Assim, verifica-se uma desestabilização do estado excitado, resultando num desvio hipsocrômico com o aumento da polaridade do meio (ou num desvio batocrômico com a diminuição

da polaridade do meio), denominando-se este fenómeno por solvatocromismo negativo (figura 1.21).⁵⁶

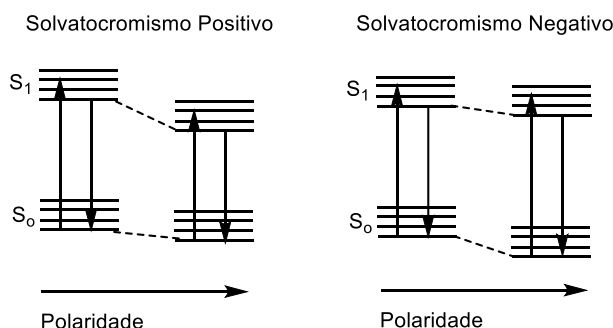


Figura 1.21 Esquema exemplificativo das energias de transição eletrónica nos diversos tipos de solvatocromismo

Assim, as merocianinas MeDASPI, EtDASPI e JDASPI, quando se encontram dentro da cavidade do cavitando, que é menos polar que a água devido aos seus painéis aromáticos, apresentam solvatocromismo negativo porque o seu estado fundamental é menos estabilizado dentro do macrociclo.

1.3.4.2 *Twisted Intramolecular Charge Transfer*

Quando promovido para o seu estado excitado, este tipo de corantes em ambiente polar, tende a voltar para o estado fundamental através de um mecanismo de rotação do grupo doador, devido à fraca solvatação do estado excitado e perda da conjugação (figura 1.22).³⁰ Geralmente, este tipo transição constitui uma via de desativação do estado excitado mais rápida e eficiente. Por norma, é um processo não radiativo devido à aproximação das orbitais fronteira, o que pode originar a transição por via vibracional ou simplesmente não ser possível de se observar na janela espectral utilizada para o estudo da fluorescência.^{59,60}

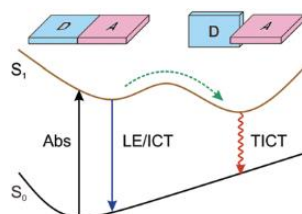


Figura 1.22 Energia do estado excitado e do estado fundamental quando a perda de energia é por ICT (*intramolecular charge transfer*) ou por TICT (*twisted intramolecular charge transfer*) (Usado com permissão de Royal Society of Chemistry, de *Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: From mechanisms to*

rational designs of bright and sensitive, C. Wang, W. Chi, Q. Qiao, D. Tan, Z. Xu and X. Liu, 50, 2023; permissão transmitida através de Copyright Clearance Center, Inc.)

Em determinados ambientes mais restringidos, como é o caso de cavidades de macrocíclos, esta rotação pode ser impedida e assim a fluorescência aumenta de intensidade porque a perda de energia passa a ser feita através de um decaimento radiativo a partir do estado de transferência de carga intramolecular, quando o estado excitado se encontra planar. Por ter uma diferença energética maior, é possível de ser observável com as técnicas de espectroscopia de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a respetiva discussão da síntese dos receptores C1 e C2, dos corantes e das benzodiazepinas. Também será descrita a sua caracterização individual bem como a dos complexos de inclusão formados a partir da interação entre analitos e receptores por diversas técnicas, nomeadamente ^1H RMN, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, absorvância, fluorescência, CTI, entre outras. Um destes sistemas recetor:corante irá ser utilizado em ensaios de competição de substituição da unidade sinalizadora (IDA) com analitos variados e também serão caracterizados em mais detalhe por técnicas de espectroscopia ótica. Por fim, o sistema de IDA será utilizado especificamente para a deteção das benzodiazepinas, inicialmente na forma pura de API e posteriormente numa matriz complexa, um comprimido.

2.1 Síntese

2.1.1 Síntese de Cavitandos

A síntese de ambos os cavitandos encontra-se descrita e otimizada para a escala do grama na literatura pelo grupo de Rebek, sendo o primeiro cavitando sintetizado em 6 passos lineares e o segundo, com 7 passos reacionais, 6 deles semelhantes à síntese anterior (Figura 2.1).^{40,50} Os rendimentos globais obtidos para estas sínteses foram de 20 e 10%, respetivamente, o que se encontra em concordância com os rendimentos observados na literatura (30% e 18%, respetivamente).

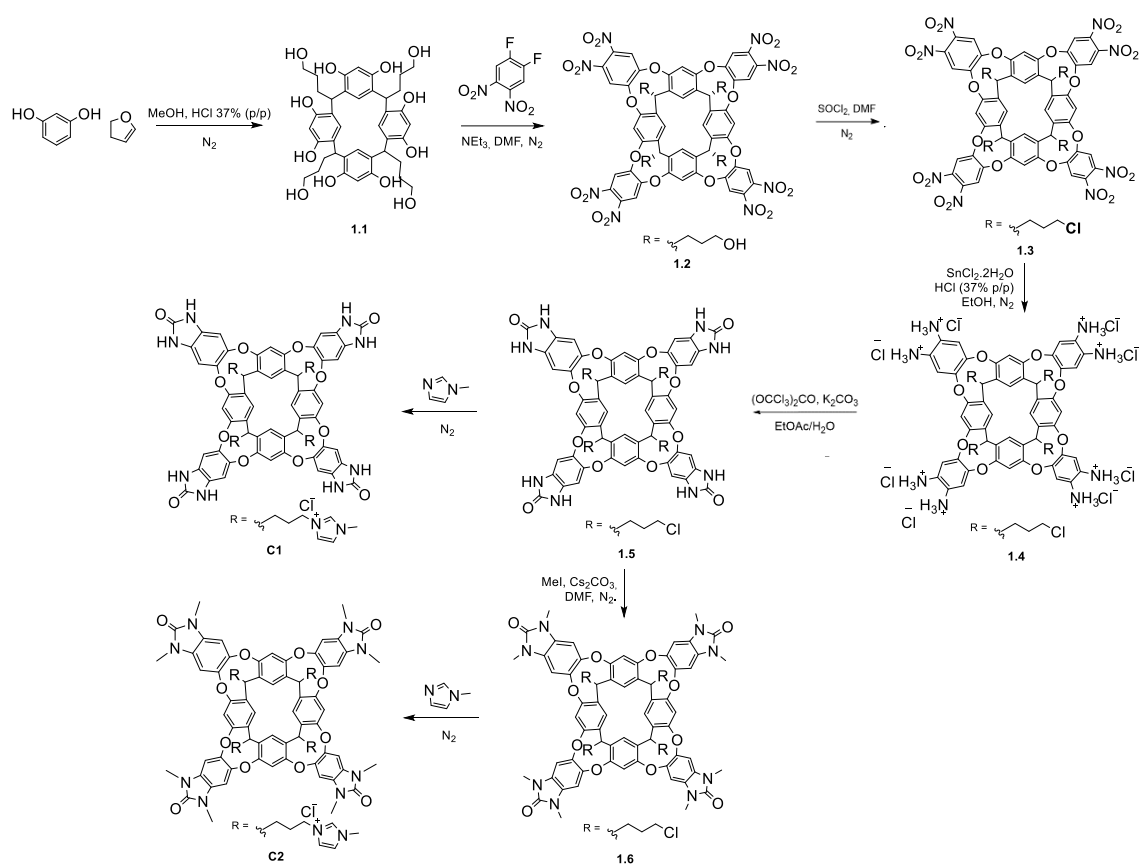


Figura 2.1 Esquema sintético dos cavitandos C1 e C2

O primeiro passo da síntese correspondeu ao ataque do grupo hidroxilo do resorcinol a 2,3-di-hidrofurano em condições ácidas, para se obter o tetra(hidroxipropil)calix[4]resorcinareno, com um elevado rendimento. A estrutura com 4 unidades de resorcinol é a mais estável e obtida seletivamente, pois a mesma tem a conformação mais favorável para realizar as ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilos dos anéis e também tem a distância correta para minimizar a repulsão entre todos os anéis aromáticos, mantendo uma estrutura com uma cavidade hidrofóbica.

O segundo passo consistiu numa reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr), na qual os hidroxilos dos anéis do cavitando promoveram a saída dos grupos halogénio. Cada 1,2-difluoro-3,4-dinitrobenzeno, reage com dois hidroxilos de anéis adjacentes. Como a conjugação aumenta e existe a presença de grupos aceitadores de eletrões, (-NO₂), o sólido passou a ter uma cor amarelada, o que também permitiu entender se a substituição foi bem-sucedida. Através da técnica de ¹H RMN também se pode observar que a zona aromática do espectro fica

mais complexa devido à adição de mais painéis aromáticos. Para além disso, surge ainda um sinal a cerca de 5.5 ppm correspondente ao C-H alquílico entre os painéis aromáticos do cavitando, que fica bastante desviado para campo baixo por estar fora da estrutura aromática e por consequência da anisotropia magnética do anel (Figura A5). Este sinal é característico dos cavitandos com cavidade profunda e que se encontrem na conformação fechada de vaso, observável em solventes polares como DMSO. A cavidade fecha, diminuindo as repulsões entre a cavidade e o meio envolvente, sendo favorecidas as de ligações de hidrogénio com este solvente.

O terceiro passo correspondeu à substituição do grupo hidroxilo para um melhor grupo de saída, o cloro, para facilitar o passo 6 da síntese. Para tal, utilizou-se o cloreto de tionilo que foi atacado pelo grupo hidroxilo, gerando cloreto que por sua vez ataca o intermediário obtido e liberta HCl e SO₂. Através do RMN é possível concluir que a conversão do grupo hidroxilo para cloro foi total porque existe o desaparecimento total do sinal do protão do grupo -OH (a cerca de 4.50 ppm). Adicionalmente, o facto de os sinais do grupo CH₂ mais perto do grupo cloreto se encontrarem deslocados para campo mais baixo, indica que existiu mudança do grupo funcional.

O quarto passo implicou a redução dos grupos nitro para aminas, utilizando o cloreto de estanho como agente redutor, em meio ácido. O rendimento não pode ser estimado com rigor porque é difícil retirar completamente os sais e a água deste tipo de compostos protonados. As aminas protonadas são bastante reativas e por isso devem ser usadas de seguida no próximo passo de reação, ou guardadas sob atmosfera inerte. Quando deixado em solução (concretamente em DMSO), ou simplesmente em contacto com o ar, observou-se que a solução passou de amarelo-pálido para vermelho e apresenta alguma fluorescência da mesma cor. Os mecanismos mais usuais para explicar a degradação das aminas podem ser a oxidação e degradação térmica, por reação com O₂, NO_x, CO₂ que estão presentes na atmosfera e promovidas pela ação da luz. Os produtos de reação mais usuais são as nitrosaminas, as nitraminas, oligómeros, entre outros.⁶¹

O cavitando anterior reagiu com trifosgénio para formar a benzimidazolona no anel superior do cavitando. Utilizaram-se duas fases para esta reação: a orgânica onde se encontra o trifosgénio e a aquosa onde se encontra o carbonato de potássio e o cavitando. O carbonato basicifica

o cavitando que se torna neutro e passa para a fase orgânica onde a reação se pode dar de forma faseada. O rendimento desta reação é relativamente baixo (52%) em comparação com a literatura (98 %) provavelmente porque o reagente se encontrava com mais água que o suposto, o que pode ter levado a se adicionar pouco reagente.

O cavitando C2, necessitou de mais um passo adicional, de forma a metilar a ureia previamente sintetizada. Para tal, utilizou-se como agente metilante o iodeto de metano na presença de carbonato de cézio que coordena com os grupos carbonilos da benzimidazolona e facilita a metilação das amidas. Pelo RMN, são facilmente identificados os grupos metil na molécula, através de um sinal a 3.14 ppm e que integra para 24 protões (Figura A10). Por último, a reação final correspondeu a uma reação do tipo S_N2 , onde o imidazole substitui o cloro, formando cavitandos tetracatiónicos solúveis em meio aquoso. Este passo é livre de solvente e não é utilizada temperatura, o que o torna num passo sintético que responde de forma positiva aos desafios da química verde.⁶²

2.1.2 Síntese de Corantes

Os corantes solvatocrómicos foram sintetizados de acordo com a literatura, tendo sido sintetizado durante este trabalho o EtDASPI apenas (Figura 2.2).⁶³ Primeiro realizou-se a metilação da *p*-metilpiridina com iodeto de metano e posteriormente utilizou-se este precursor, na presença de uma base, que reage com um aldeído, o outro precursor. A ligação dupla é formada durante o passo de desidratação. Os rendimentos foram mais baixos que os reportados, pois a quantidade de piperidina adicionada pode ter sido mais elevada, o que dificultou a recristalização do corante. O RMN do composto final confirmou a síntese do corante, devido à presença de dubletos a 7.88 e 7.11 ppm com constantes de acoplamento de 16 Hz, correspondentes aos protões da ligação dupla no isómero *trans* (Figura A13).

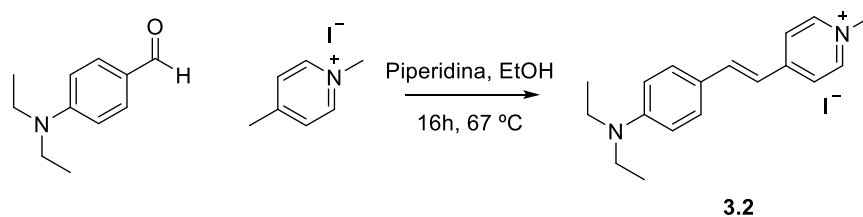


Figura 2.2 Esquema dos passos sintéticos para a obtenção do corante EtDASPI

2.1.3 Síntese de análogos de Benzodiazepinas

O análogo de diazepam, nordiazepam (BZD1), foi sintetizado através de procedimentos previamente descritos⁶⁴ cujo rendimento global foi de 56% (Figura 2.3). O rendimento global obtido experimentalmente foi de 33% e deveu-se a: no primeiro passo o tempo de reação podia ter sido prolongado e a forma de purificação com a solução de NH_4OH pode ter sido pouco eficaz. No segundo passo foi necessário alterar o procedimento experimental para ser utilizada uma solução aquosa de NH_4OH em água, ao invés de uma solução de NH_4OH em metanol. A água existente no meio pode ter levado a uma diminuição do rendimento. O RMN do produto purificado tem elevada complexidade na zona aromática, mas existem sinais que indicam que a ciclização foi bem-sucedida, como é exemplo o CH_2 adjacente à amida e à imina, que passa de 4.02 ppm para 4.33 ppm, a imina formada desblinda estes prótons e por isso deslocam-se para campo baixo (Figura A14 e A15).

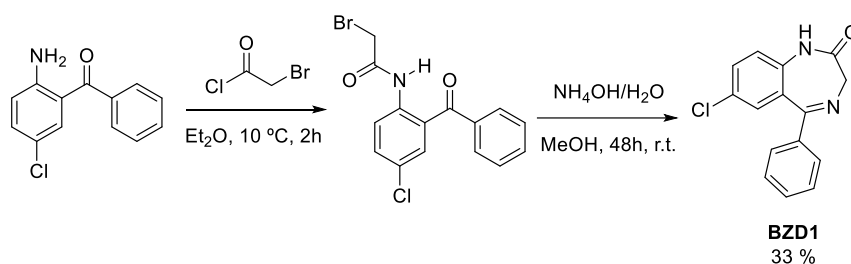


Figura 2.3 Esquema reacional da síntese do análogo de benzodiazepina BZD1

2.2 Caracterização dos sistemas por ^1H RMN, ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H ROESY

Na literatura, o método mais utilizado para realizar a caracterização deste tipo de compostos supramoleculares e a encapsulação dos respectivos analitos é o RMN de próton, devido à grande alteração do campo magnético que os analitos sofrem quando incluídos dentro destas cavidades altamente blindadas.⁴⁴ Por isso, para entender a encapsulação dos corantes realizaram-se titulações seguidas por ^1H RMN e auxiliadas por 2D RMN, mais especificamente ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H ROESY.

2.2.1 Sistema C1-MeDASPI

Os espectros da titulação de MeDASPI com C1 mostram-se na figura 2.4 e encontram-se ordenados de baixo para cima, com concentrações crescentes de cavitando 1.

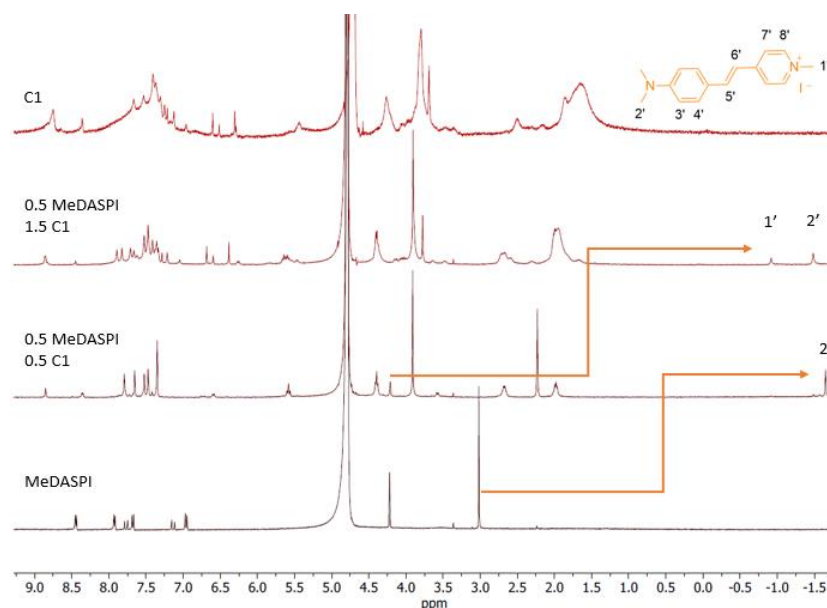


Figura 2.4 Titulação do corante MeDASPI ([MeDASPI]=0.5 mM) na ausência e presença de concentrações superiores de C1 seguida por ^1H RMN, em D_2O . De baixo para cima aumenta a concentração do recetor

O que pode ser imediatamente observado são os sinais a ppm negativos que aparecem com a adição do recetor. Quando uma molécula se encontra em ambientes confinados, nomeadamente quando dentro dos oito painéis aromáticos do cavitando, as propriedades magnéticas são diferentes de quando se encontra livre em solução aquosa. Para além do corante se

encontrar num espaço blindado devido ao confinamento dos painéis aromáticos, estes últimos também apresentam um efeito de anisotropia magnética sentido pelos prótons do corante (figura 2.5). Os eletrões π dos anéis aromáticos, que têm um fluxo próprio, são capazes de criar um campo magnético local quando na presença de um campo magnético externo. Esta zona por ter muitos eletrões vai apresentar alta densidade eletrónica e por isso alta blindagem para prótons que se encontrem nessa zona de campo magnético induzido.⁶⁵

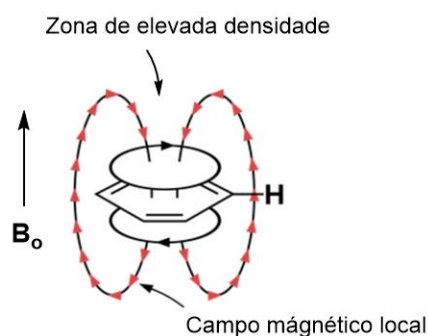


Figura 2.5 Efeito de anisotropia magnética do anel aromático (Adaptado⁶⁶)

Ao observar os espetros, inicialmente verifica-se o aparecimento de um singuleto a -1.66 ppm, que aumenta a intensidade com a adição de cavitando até se atingir a equimolaridade. Para concentrações superiores, este sinal começa a perder intensidade dando lugar ao aparecimento de dois novos sinais a -0.92 e -1.49 ppm. Esta alteração significativa no desvio químico dos sinais de MeDASPI indica claramente que existe encapsulamento do corante dentro do cavitando e que existem dois processos diferentes, dependendo da concentração de cavitando. Como é possível observar a presença dos sinais definidos do corante livre e encapsulado em simultâneo, indica que a permuta entre o corante livre e encapsulado é lenta na escala de tempo do RMN.⁴⁴

Outra indicação de que existe encapsulamento do corante é o sinal característico da estrutura em vaso que o cavitando adota na presença de um analito, a cerca de 5.5 ppm. Esta conformação é altamente estável devido às ligações de hidrogénio que o grupo funcional presente no arco superior consegue fazer com moléculas de água e também diminui a repulsão do solvente dentro da cavidade através do seu preenchimento com uma molécula menos hidrofílica, o corante.⁴¹

Para realizar a identificação dos respetivos sinais recorreu-se ao RMN 2D, mais concretamente utilizou-se o COSY e o ROESY, para efetuar a atribuição. Na figura 2.6, 2.7 e 2.8 encontram-se

o espectro RMN ^1H do complexo equimolar e a respetiva identificação, os espectros de ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H ROESY, respetivamente.

Através da sobreposição do espectro ^1H RMN da mistura e do cavitando livre, identificaram-se os prótons da cadeia lateral (H4 a H7) e o metilo do imidazólio (H8), pertencentes a C1. Quando se sobrepôs o espectro da mistura com o do corante livre, o desvio químico do sinal correspondente ao metilo da piridina (H1') manteve-se igual, pelo que foi utilizado como referência.

Pelo COSY, identificaram-se as seguintes interações no cavitando: H4→H3, H7→H10, H8→H10.

Pelo ROESY, identificaram-se os restantes aromáticos do cavitando. No caso do MeDASPI existia uma interação entre o sinal a ppm negativos (-1.66 ppm) e um sinal a 3.49 ppm e pelo COSY este último interagia com o sinal a 6.46 ppm. Pelas integrações fazia sentido que o singuleto a -1.66 ppm correspondesse aos metilos da anilina (pois integravam para 6H) e que os dois anteriores fossem do anel da anilina mais perto deste grupo funcional (sendo que estes integravam para 2H). Desta forma, existe a evidência experimental que quando existem quantidades equimolares do recetor e do corante, os metilos da anilina e metade do respetivo anel encontram-se dentro da cavidade do cavitando, sendo esta encapsulação seletiva (Figura 2.12). Inicialmente, pensava-se que as interações catião- π seriam mais favoráveis e por isso o anel de piridínio seria o primeiro a ser encapsulado, mas provavelmente a solvatação do catião é preferencial à atração inicialmente referida, o que faz com que o nitrogénio carregado se encontre fora do recetor para ser solvatado. Pode também existir estabilização da carga positiva através dos grupos com maior densidade de carga, como as ureias do arco superior do cavitando. Também o efeito hidrofóbico que a dimetilamina sofre na presença de água favorece que este grupo se desloque para dentro da cavidade, tal como a interação CH- π entre os metilos e os painéis aromáticos.⁴²

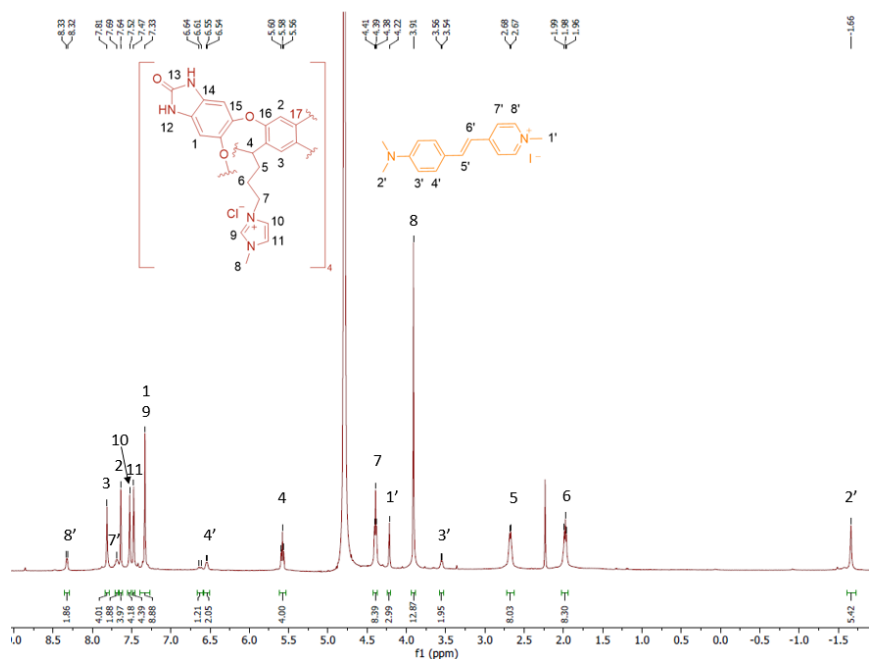


Figura 2.6 RMN ¹H do equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI ([C1]=1.44 mM e [MeDASPI]=1 mM) em D₂O

A partir da identificação anterior, foi possível também identificar o H8' e H7' de MeDASPI, mas os prótons da ligação dupla não são esclarecedores para identificação dos mesmos, apenas se sabe que se situam a 6.55 ppm e cerca de 7.24 ppm devido à constante de acoplamento ser mais elevada que as restantes (16 Hz), característico dos prótons de uma ligação *trans*.

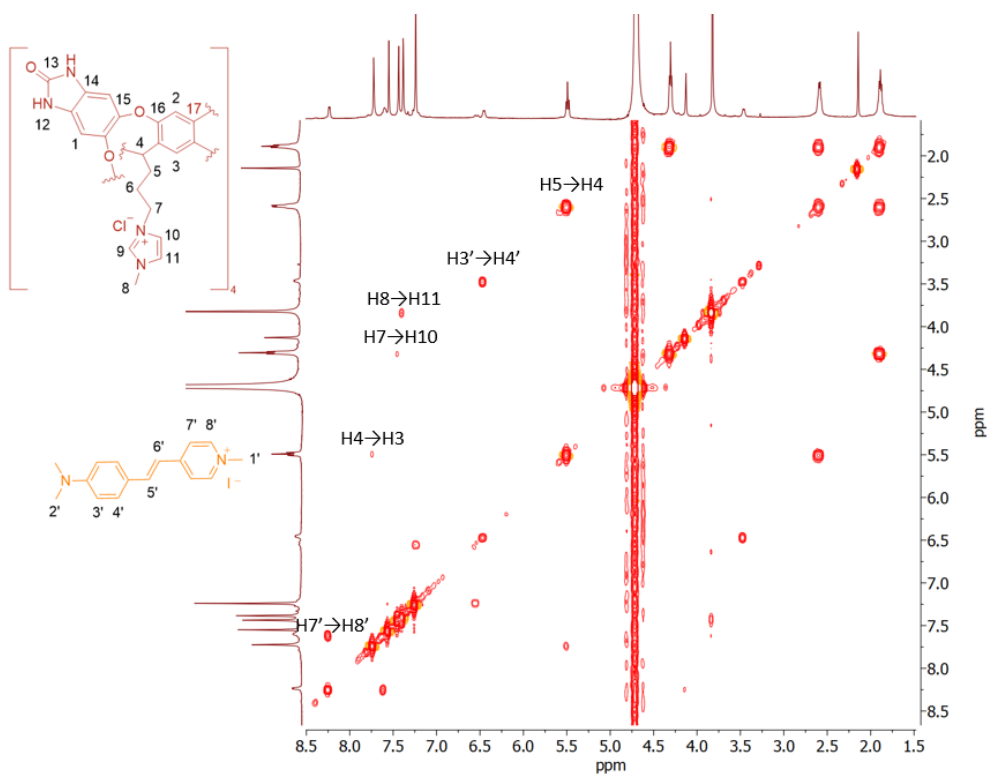


Figura 2.7 ^1H - ^1H COSY do equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI ($[\text{C1}] = 1.44 \text{ mM}$ e $[\text{MeDASPI}] = 1 \text{ mM}$) em D_2O

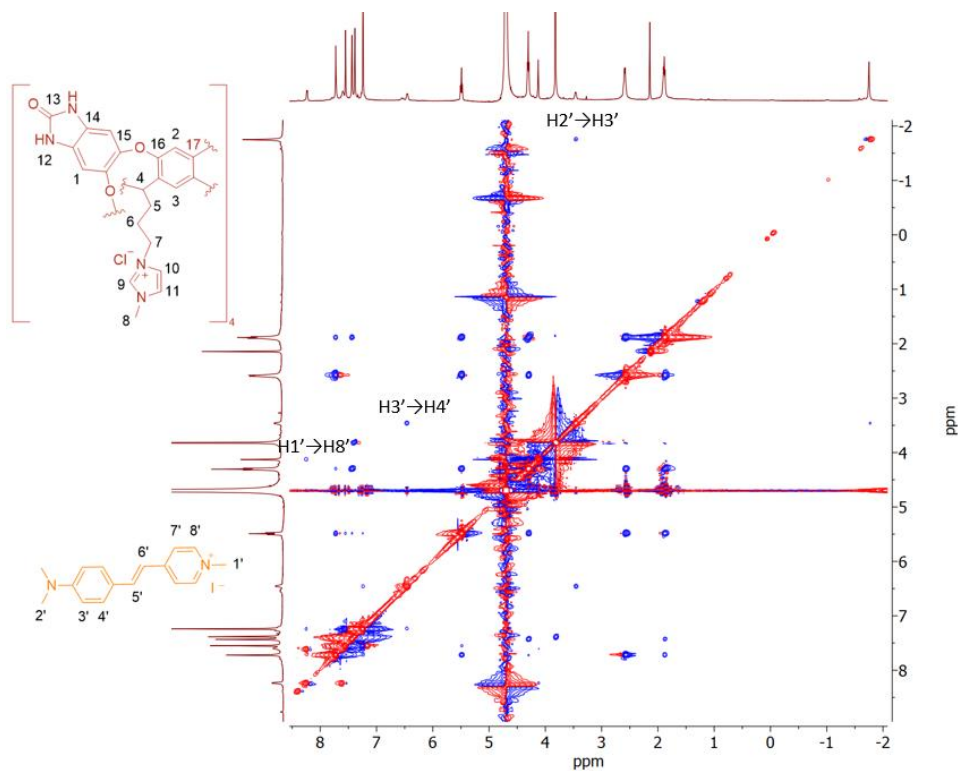


Figura 2.8 ^1H - ^1H ROESY do equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI ($[\text{C1}] = 1.44 \text{ mM}$ e $[\text{MeDASPI}] = 1 \text{ mM}$) em D_2O

De seguida, realizou-se a identificação dos sinais quando existia um excesso do cavitando. Quanto à identificação dos sinais respetivos ao cavitando foram realizados tendo em conta a identificação já realizada anteriormente, a exceção sendo a zona aromática que teve alterações significativas e os sinais possíveis de identificar foram atribuídos através do ROESY.

Em relação ao MeDASPI a identificação iniciou-se pelos singletos a ppm negativos presentes no RMN ^1H (figura 2.9). Tendo em conta a sua integração (3H para o sinal a -0.92 ppm e 6H a -1.49 ppm) colocou-se a hipótese de que o sinal com menor integração correspondesse ao metil do piridínio e o sinal de maior integração correspondia à dimetilalanilina.

No ROESY (Figura A16) observaram-se interações a longa distância e que permitiram identificar os prótons H3' e H8' (diretamente ligados a H2' e H1', respetivamente). Por COSY, (Figura A17) também foi possível identificar os sinais correspondentes aos prótons aromáticos a uma ligação de distância dos anteriores, o que tornou possível identificar os sinais correspondente aos prótons H4' e H7', que se encontram a campo mais baixo que no equilíbrio anterior. Através da identificação destes sinais é possível concluir que a hipótese da formação de um complexo 2:1 (cápsula dimérica) é apoiada pelo RMN.

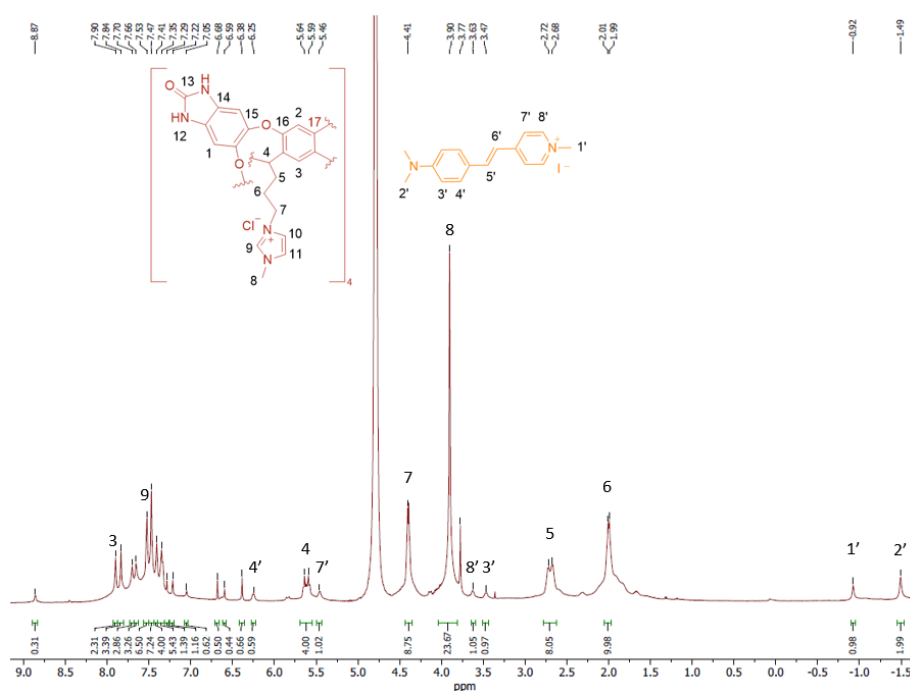


Figura 2.9 ^1H RMN do equilíbrio 2:1 C1:MeDASPI ([C1]=3.11 mM e [MeDASPI]=1.18 mM) em D_2O

Na tabela 1 apresentam-se os desvios químicos dos prótons do corante livre, dos complexos 1:1 e 2:1, sendo possível observar que os metilos da dimetilanilina sofrem um desvio de -4.68 ppm na presença de 1 equivalente de C1, e que este valor se mantém semelhante quando se forma a cápsula completa. Os prótons do metilpiridínio não sofrem qualquer alteração na presença de 1 equivalente de C1, apenas com excesso do recetor é que estes se deslocam para campo alto. Conclui-se assim que existe primeiramente a formação do equilíbrio 1:1 de forma seletiva, onde acontece a encapsulação da dimetilanilina, e posteriormente ocorre a encapsulação total do corante, num equilíbrio 2:1.

Tabela 1. Desvios químicos dos prótons do corante MeDASPI a diferentes proporções de cavitando 1

	Livre	1:1	Δ ppm (1:1)	2:1	Δ ppm (2:1)
1'	4.22	4.22	0	-0.92	-5.14
2'	3.02	-1.66	-4.68	-1.49	-4.51
3'	6.96	3.55	-3.41	3.47	-3.49
4'	7.68	7.58	-0.10	6.25	-1.43
7'	7.92	7.69	0.23	5.46	-2.46
8'	8.44	8.32	0.12	3.63	-4.81

A diferença de desvio químico também ajuda a compreender a extensão do encapsulamento do corante e desta forma especular que, no equilíbrio 1:1 apenas os prótons 2' e 3' se encontram dentro do cavitando, ao passo que no equilíbrio 2:1 os prótons 1', 2', 3' e 8' estão completamente encapsulados e blindados entre os painéis aromáticos do recetor (Figura 2.12).

2.2.2 Sistema C1-EtDASPI

A titulação por RMN ^1H foi realizada com concentrações crescentes de cavitando C1 e mantendo fixa a concentração de EtDASPI a 0.5 mM, em D_2O (Figura 2.10). A adição de 1 equivalente de cavitando desloca 2 sinais para campo alto, o que pode significar que existe encapsulação do corante previsivelmente pelo lado da dietilanilina, que tem dois sinais alquílicos. A maiores concentrações de C1 observa-se a presença de mais dois sinais de prótons a ppm

negativos, o que corresponde presumivelmente à encapsulação completa do corante, e por isso o metil do piridínio também sente a anisotropia magnética dos anéis aromáticos do receptor e desloca-se para valores tão negativos de campo magnético.

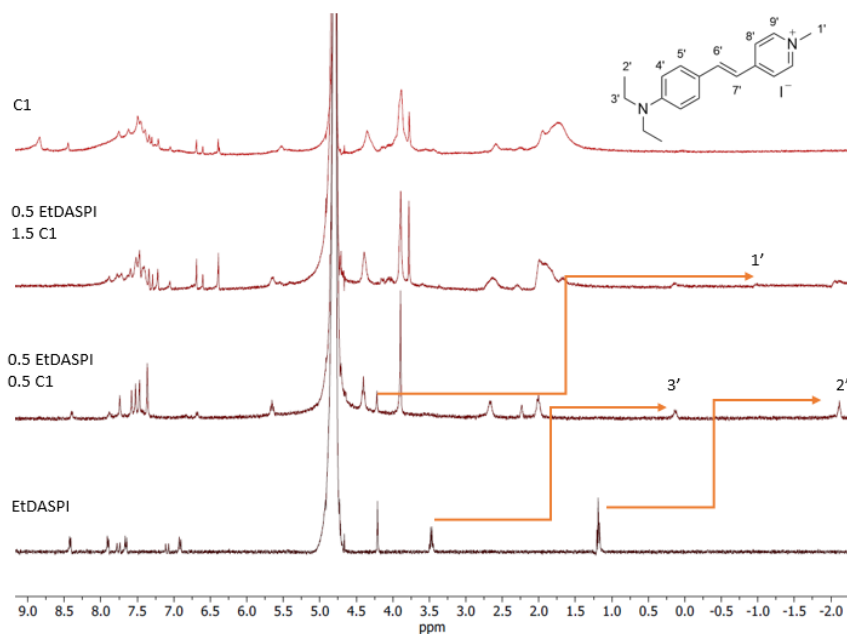


Figura 2.10 Titulação seguida por ^1H RMN do corante EtDASPI ($[\text{EtDASPI}] = 0.5 \text{ mM}$) na presença de concentrações superiores de cavitando 1 em D_2O , de baixo para cima aumenta a concentração de C1

Como a blindagem entre a meia cápsula e a cápsula completa sentida pelos prótons do corante é ligeiramente diferente, pode existir um deslocamento dos sinais da dietilanilina quando totalmente encapsulada, como observado anteriormente. A atribuição dos prótons do sistema C1:EtDASPI no equilíbrio 1:1 encontra-se na figura 2.11 e foi realizada com assistência de RMN 2D (Figura A18 e A19). Assim elucidaram alguns acoplamentos, como por exemplo através do COSY as interações $\text{H}2' \rightarrow \text{H}3'$, que se encontram ambos a ppm negativos e confirmam a encapsulação seletiva da etilanilina. Também uma interação entre o próton $\text{H}8'$ com $\text{H}9'$ que não têm o seu desvio químico alterado, ajudam a confirmar que o sinal a 6.66 ppm pertence ao anel ligado ao grupo doador de elétrons. Este sinal apresenta um desvio químico em relação ao corante livre de 0.09 ppm, que significa que o anel da dietilanilina não se encontra tão encapsulado e assim apenas o grupo etilo está a sofrer o efeito anisotrópico do anel.

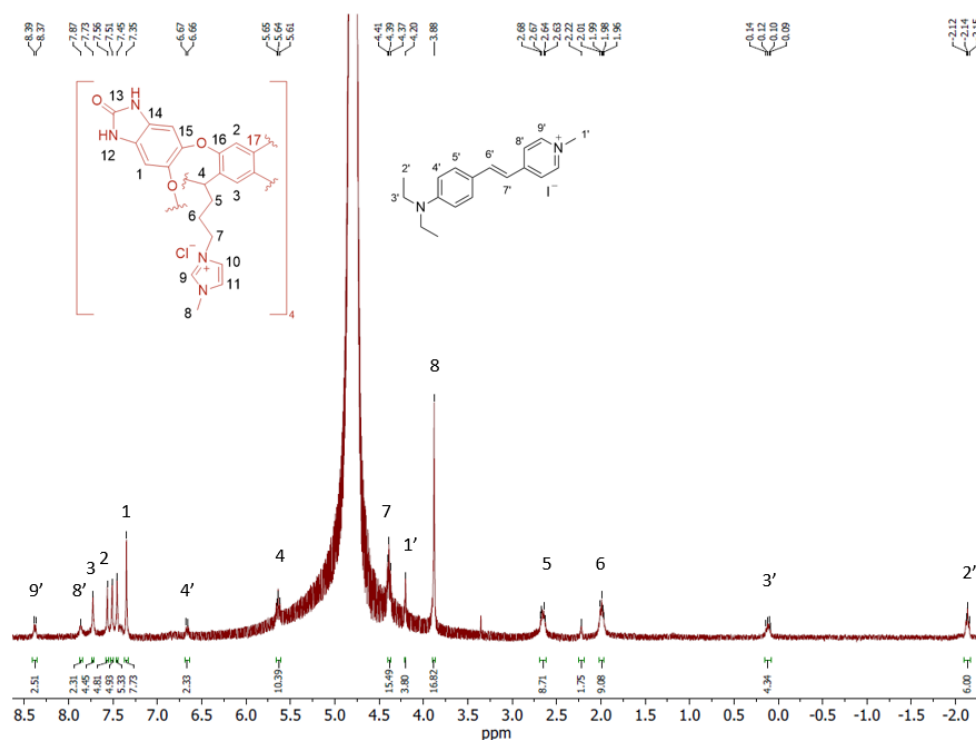


Figura 2.11 RMN ^1H do equilíbrio 1:1 C1:EtDASPI ([C1]=1.2 mM e [EtDASPI]=0.5 mM) em D_2O

Já a atribuição do equilíbrio 2:1 é mais complicada devido à complexidade do espectro do cavitando concentrado em D_2O e por isso a atribuição não foi completa. Os prótons possíveis de identificar encontram-se na tabela 2, juntamente com a diferença dos desvios químicos do corante complexado em relação ao livre.

Tabela 2. Desvios químicos dos prótons do corante EtDASPI a diferentes proporções de cavitando 1

	Livre	1:1	Δppm (1:1)	2:1	Δppm (2:1)
1'	4.16	3.80	-0.36	-1.06	-5.22
2'	1.12	-2.14	-3.36	-2.52	-3.64
3'	3.42	0.11	-3.31	0.08	-3.50
4'	6.75	6.66	-0.09	-	-
7'	7.88	7.42	-0.46	-	-
8'	8.02	7.87	-0.15	-	-
9'	8.66	8.38	-0.28	-	-

Na figura 2.12 encontram-se presentes estruturas moleculares otimizadas através da aplicação *HyperChem8* das diversas estruturas mencionadas acima. É possível observar que estes modelos parecem suportar as afirmações realizadas de que no caso do corante MeDASPI o anel da dimetililanilina está parcialmente encapsulado entre os painéis do recetor, desta forma sentem a anisotropia magnética do anel. No caso do corante EtDASPI, apenas os etilos e o nitrogénio se encontram encapsulados dentro dos painéis aromáticos. Outro pormenor importante é a formação da cápsula em ambos os corantes, parece que existem maior aproximação dos grupos benzimidazola do recetor no caso do corante MeDASPI do que no caso do EtDASPI, o que pode originar uma maior estabilização da estrutura dimérica no primeiro corante.

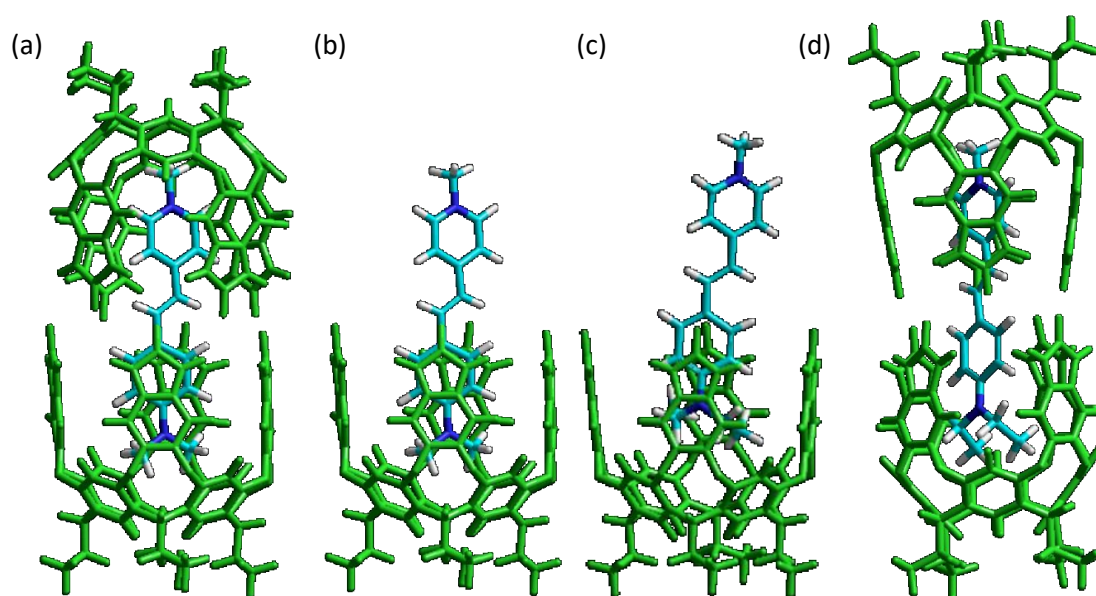


Figura 2.12 Comparação de estruturas moleculares otimizadas através da aplicação *HyperChem8*, a verde o recetor C1 e a tons de azul os corantes. (a) Estrutura de cápsula C1₂MeDASPI (b) Estrutura de meia cápsula C1MeDASPI (c) Estrutura de meia cápsula C1EtDASPI (d) Estrutura de cápsula C1₂EtDASPI

2.2.3 Sistema C1-JDASPI

Novamente uma solução de JDASPI em D₂O foi titulada com C1, e obtido o espetro de ¹H RMN a cada adição. A titulação encontra-se presente na figura 2.13.

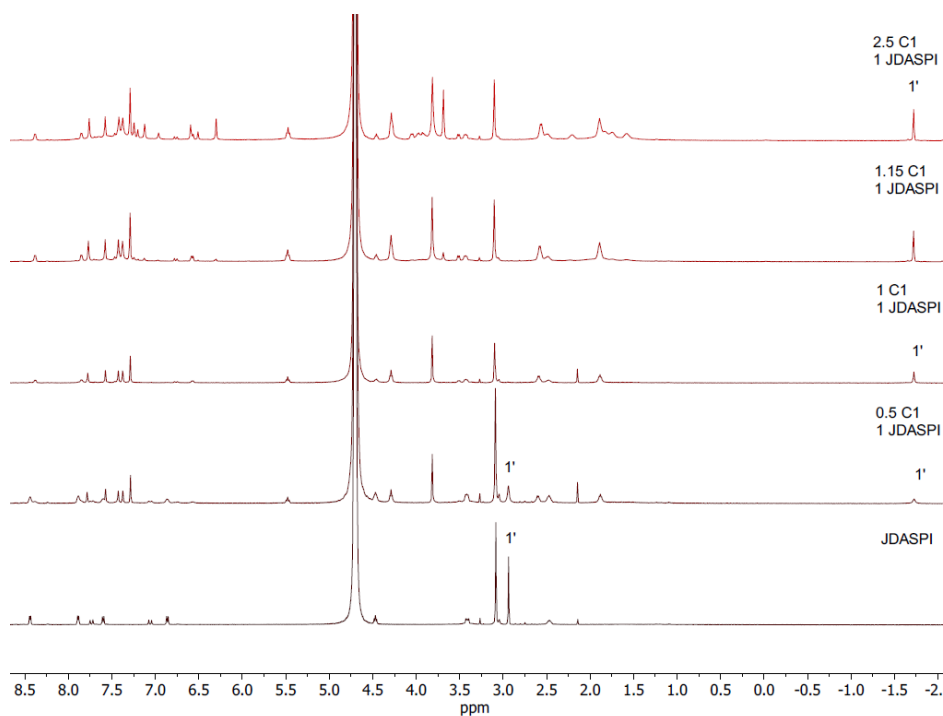


Figura 2.13 Espectro ^1H RMN da titulação de JDASPI ($[\text{JDASPI}] = 0.5 \text{ mM}$) com C1 em D_2O . De baixo para cima aumentam as concentrações de C1 e está identificado o sinal 1' correspondente aos metilos da dimetilaniлина de JDASPI

Pela integração dos sinais do corante é possível entender que o sinal a 3.03 ppm pertencente aos metilos da dimetilaniлина ($\text{H}1'$) desaparecem ao longo da titulação e existe um aparecimento de um sinal a -1.64 ppm, com a mesma integração. Este deslocamento para campo alto corresponde à encapsulação da dimetilaniлина dentro do interior blindado do cavitando. A titulação foi realizada com excesso de cavitando, não se observando a formação da cápsula dimérica. Esta afirmação era espectável devido ao facto de não ser possível realizar as ligações de hidrogénio entre ambos os cavitandos da cápsula, tendo em conta a extensão da cadeia do corante na extremidade do piridínio.

A caracterização completa do equilíbrio 1:1 foi realizada com auxílio do ^1H - ^1H COSY (Figura A20). O Δppm de todos os sinais protões do corante são similares ao obtido com o corante MeDASPI, o que significa que uma alteração na cadeia lateral do piridínio não tem influência na primeira encapsulação (Figura 2.14).

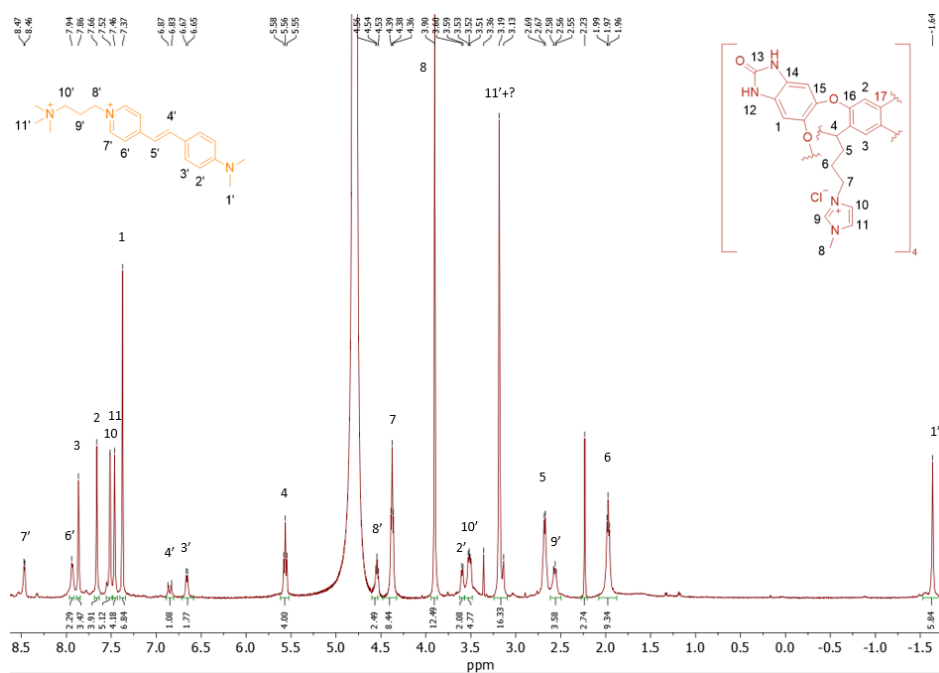


Figura 2.14 RMN ^1H do equilíbrio 1:1 C1:JDASPI ($[\text{C1}]=1.1 \text{ mM}$ e $[\text{MeDASPI}]=0.5 \text{ mM}$) em D_2O

2.2.4 Sistema C2-MeDASPI

2.2.4.1 RMN ^1H C2

O cavitando C2 livre foi estudado por RMN devido a dois fatores: ao processo de cinética lenta que apresenta e complexidade espectral. Segundo a literatura, os cavitandos de cavidade profunda quando dissolvidos em H_2O , adotam uma conformação dimerizada de papagaio, de simetria D_{2h} , ao invés de C_{4v} , como é o caso do vaso. Este tipo de simetria significa que os 4 painéis aromáticos já não são idênticos entre si e apenas 2 a 2, desta forma alguns sinais, especialmente os aromáticos vão ser mais afetados por este.⁵⁰ Este tipo de conformações vai ter diferentes desvios químicos, porque o ambiente químico é bastante diferente. O espectro em D_2O de C2 com a respectiva identificação encontra-se na figura 2.15.

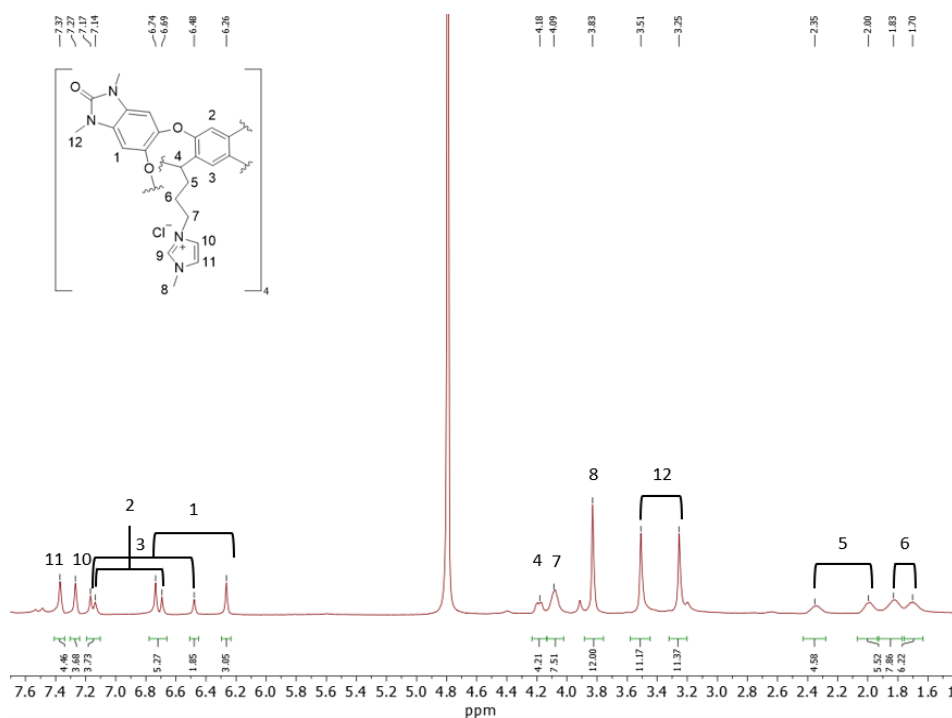


Figura 2.15 Espectro de ¹H RMN do cavitando C2 (5 mM), em D₂O, com a respectiva identificação de cada sinal dos prótons

Muitos sinais são desdobramentos de alguns sinais do cavitando, devido à sua simetria quando se encontra na forma de papagaio. Para a identificação dos sinais do ¹H RMN foi necessário estudar o COSY e o ROESY que se encontram presentes nas figuras A21 e A22, respetivamente. O primeiro passo das identificações iniciou-se pelo estudo das integrações dos sinais. O sinal característico do próton que faz a ponte entre os anéis a 5.5 ppm (H4) não existia neste caso, pois é distintivo da conformação de vaso. Pela integração, foi possível encontrar este próton a 4.18 ppm. Também se identificou os prótons H7 pois estes não sofrem desdobramentos devido ao distanciamento dos painéis. A partir destes sinais foi possível, pelo COSY, encontrar os prótons H5 e H6 que se encontram desdobrados. Este espectro 2D também evidenciou o acoplamento entre os prótons H10 e H11 da zona aromática.

De seguida, foi necessário estudar o ROESY para a restante atribuição. O sinal a 3.83 ppm, que integrava para 12 prótons e apenas tinha uma interação no ROESY com os prótons aromáticos do imidazólio, é referente aos prótons de H8. Desta forma, os sinais que também integram para 12 prótons a campo alto são desdobramento dos metilos dos prótons H12, do arco

superior. Estes têm interações com os prótons H1, o que é possível de observar pelo ROESY, e desta forma estes prótons também se encontram desdobrados.

Os prótons de H1 também têm interação a curta distância com os prótons de H2, os prótons de H5 com os aromáticos H3 e desta forma foi possível identificar todos os sinais no espectro de RMN ^1H .

2.2.4.2 Cinética de associação

Por norma, os estudos com este tipo de cavitando dinâmicos são realizados com moléculas pouco solúveis que necessitam de ultrassons para aumentar a solubilidade. Como os corantes são bastante solúveis em água, a adição e aquisição do espectro foi feita no imediato. Quando se iniciaram a aquisição dos espectros com a concentração de corante fixo a 0.5 mM observou-se o desaparecimento de alguns sinais que se alteraram com o tempo (Figura 2.16). Os sinais do cavitando na forma aberta dimérica começaram a desaparecer e a dar lugar ao cavitando em forma de vaso, como se pode observar pela presença do sinal a 5.55 ppm, aquando da adição do corante. Novamente, a presença de um sinal a campo alto mostra a encapsulação bem-sucedida do corante, mas que vai ganhando definição ao longo do tempo. Claramente que existe um processo cinético lento, que pode ser monitorizado por RMN e aparenta estar associado à interconversão do cavitando da forma de papagaio para a forma de vaso e posterior encapsulação. A cinética será novamente abordada no subcapítulo 2.3.4.

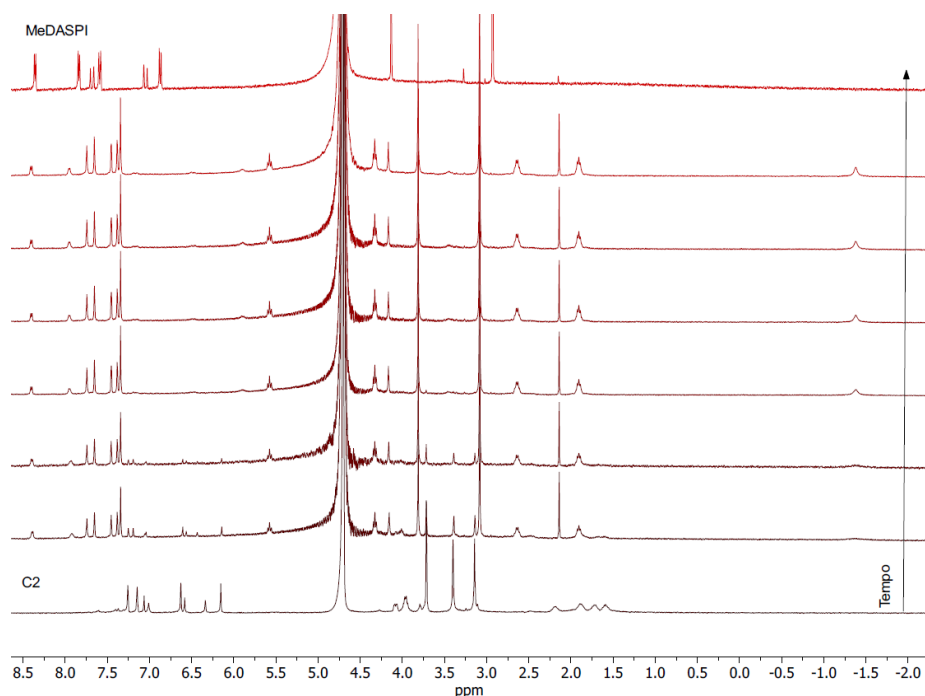


Figura 2.16 De baixo para cima: RMN ^1H do cavitando C2 (0.5 mM) em D_2O ; Espetros de RMN ^1H de C2-MeDASPI em quantidades equimolares (0.5 mM) ao longo do tempo durante 75 minutos, em D_2O ; Espectro RMN ^1H do corante MeDASPI (1 mM), em D_2O

2.2.4.3 Sistema C2-MeDASPI no equilíbrio

Tal como realizado nas titulações anteriores, a concentração de C2 foi gradualmente aumentada, fixando a concentração de MeDASPI. Observou-se o equilíbrio que se obtém é de um corante encapsulado em um cavitando e não existe a formação da cápsula dimérica. Este comportamento sugere que a ureia metilada no arco superior do cavitando 2 impossibilita a formação de ligações de hidrogénio entre os cavitandos. A atribuição do complexo 1:1 (Figura 2.17) foi realizada com apoio do RMN 2D que se encontra nos anexos (Figura A23 e A24).

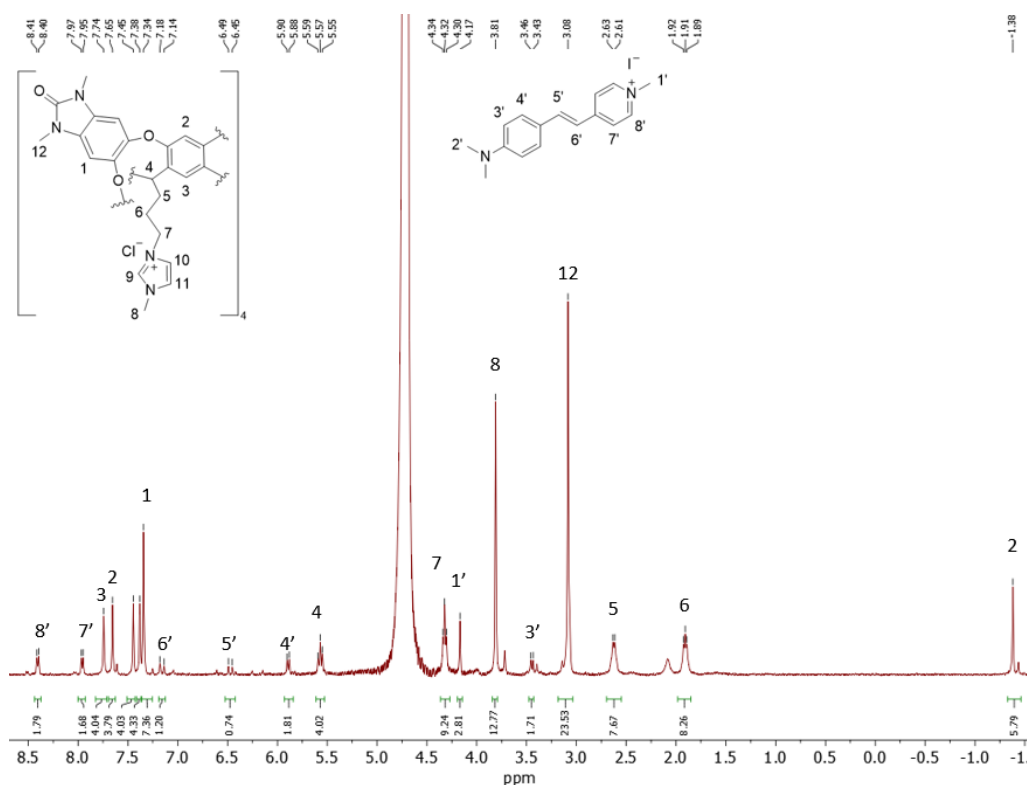


Figura 2.17 RMN ^1H do equilíbrio 1:1 C2:MeDASPI ($[\text{C2}] = 1.2 \text{ mM}$ e $[\text{MeDASPI}] = 0.5 \text{ mM}$) em D_2O

Novamente, o singuleto a desvios químicos negativos que integra para 6H corresponde aos prótons da dimetilaniolina ($\text{H}^{2'}$), por isso a encapsulação é também seletiva neste cavitando. A identificação dos sinais foi realizada como anteriormente demonstrado para o equilíbrio 1:1 C1:MeDASPI. Os desvios químicos dos vários prótons do corante não sofrem grandes alterações quando comparado com o cavitando 1 o que sugere que o ambiente blindado parece estar inalterado, mesmo com as alterações realizadas no arco superior do cavitando aquando da metilação.

2.3 Desenvolvimento e Otimização de Quimiossensores – estudo espectroscópico de absorção e fluorescência

2.3.1 C1-MeDASPI

2.3.1.1 Cinética

Depois de algumas titulações realizadas, observou-se que existia pouca linearidade nos resultados e realizaram-se alguns ensaios, nomeadamente de cinética. No caso de C1 com MeDASPI realizaram-se 3 ensaios com concentrações de cavitando e corante diferentes (Figura 2.18). O perfil da cinética parece aumentar no caminho da formação de mais complexo de associação ao longo do tempo e parece ser dependente tanto da concentração de corante como de cavitando.

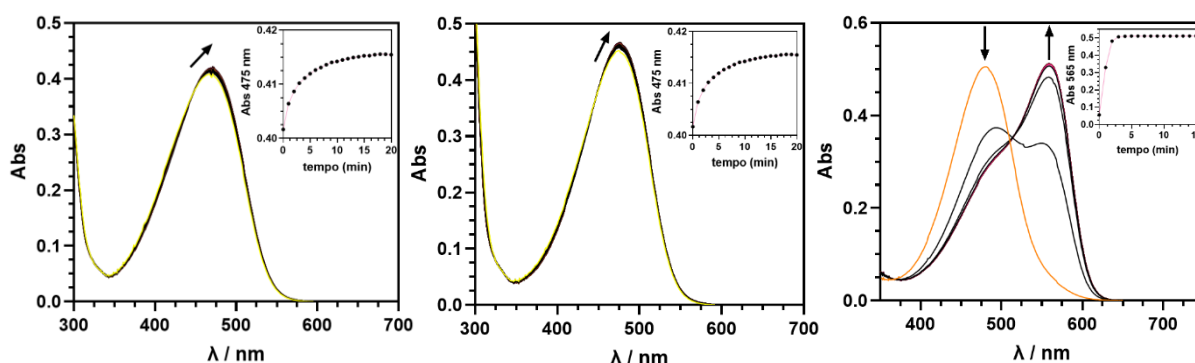


Figura 2.18 Espectros de absorção da mistura C1 e MeDASPI ($[MeDASPI]=1 \times 10^{-5}$ M) ao longo do tempo (minutos). da esquerda para a direita a proporção de C1:MeDASPI é 0.5:1, 1:1, 5:1. Os dados experimentais no máximo de absorção estão ligados entre si para melhor compreensão

A cinética destes macrociclos será estudada em mais detalhe com o cavitando C2, no subcapítulo 2.3.4, pois tem uma cinética mais lenta associada. Portanto, estes ensaios serviram para elucidar a existência de uma cinética lenta associada ao processo de complexação e que é necessário realizar as titulações em *batch*, para as soluções estabelecerem o equilíbrio.

2.3.1.2 Situação de equilíbrio – constantes de afinidade

Primeiramente, estudou-se o cavitando 1 por absorção. Este macrocíclo tem dois máximos de absorção na zona do ultravioleta e seguiu-se a banda a 300 nm. A este comprimento de onda o coeficiente de extinção molar corresponde a $33739 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em água (Figura A25a).

Para analisar a afinidade entre os cavitandos e os corantes, prepararam-se soluções em *batch* com concentrações fixas de corante a $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ e concentrações de cavitando crescentes em cada solução, em água. As soluções foram posteriormente estudadas por absorção e também por emissão. A titulação por absorção do corante MeDASPI com C1 encontra-se na figura 2.19.

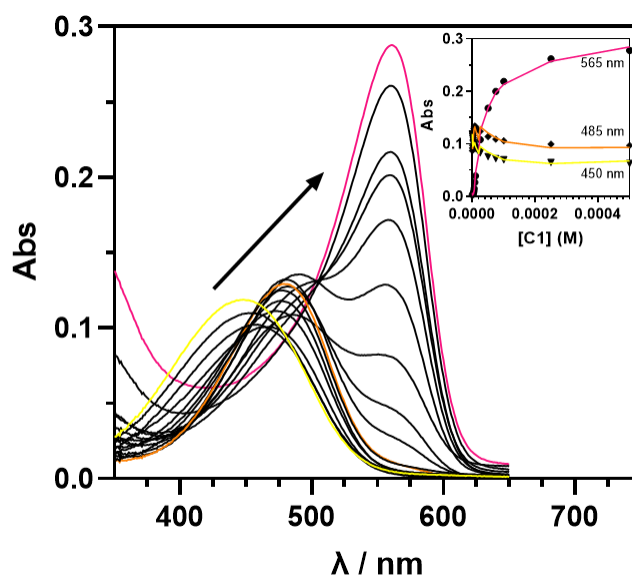


Figura 2.19 Espectros de Absorção UV-Vis do MeDASPI ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$, em água) obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C1 (Do espectro amarelo (MeDASPI) existe um desvio para um máximo de absorção a 485 nm, a laranja (C1MeDASPI), e depois para 565 nm, a rosa (C₁₂MeDASPI). O tratamento de dados experimentais dos comprimentos de onda encontram-se evidenciados com as respetivas cores está presente

O corante MeDASPI, que tem o seu máximo de absorção a 450 nm e um coeficiente de extinção molar de $22923 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Figura A26a), começou a sofrer um desvio batocrómico quando se aumentou a concentração de cavitando 1 até atingir novamente um máximo de absorção, a cerca de 480 nm. Depois parece existir um segundo equilíbrio, uma vez que há o desaparecimento total da banda anterior para dar lugar a uma banda a comprimento de onda superior, a cerca de 565 nm.

Através da titulação por RMN (Secção 2.2.1), observou-se dois processos, uma primeira encapsulação seletiva do corante dentro da cavidade e depois a total encapsulação entre dois cavitandos. O mesmo fenómeno parece ser observado por espectroscopia de absorção, pois existem duas alterações espectrais diferentes a concentrações diferentes de C1.

A acompanhar estes dois processos existe um desvio batocrómico e hiperocrómico do máximo de absorção do corante, que pode ser explicado pelo solvatocromismo desta molécula. MeDASPI é um composto polar devido à existência de um grupo doador de eletrões e um grupo aceitador separado por uma estrutura aromática de ressonância, possuindo inclusive uma carga positiva efetiva. Desta forma, em ambientes mais polares (como é o caso da água), esta molécula encontra-se relativamente estabilizada, graças às diversas interações não covalentes intermoleculares entre o solvente que podem estabilizar os dipolos. Quando se inicia a encapsulação do corante na cavidade apolar e hidrofóbica do recetor C1, a estabilização do corante no estado fundamental é menor, pois não existem interações favoráveis para estabilizar uma molécula tão polar. Assim, após encapsulação no cavitando C1, a energia da HOMO do MeDASPI aumenta relativamente à HOMO do corante livre, induzindo uma aproximação das orbitais fronteira, que explica a alteração do comprimento de onda máximo para valores superiores, verificando-se o fenómeno de solvatocromismo negativo, esquematizado na figura 1.17.

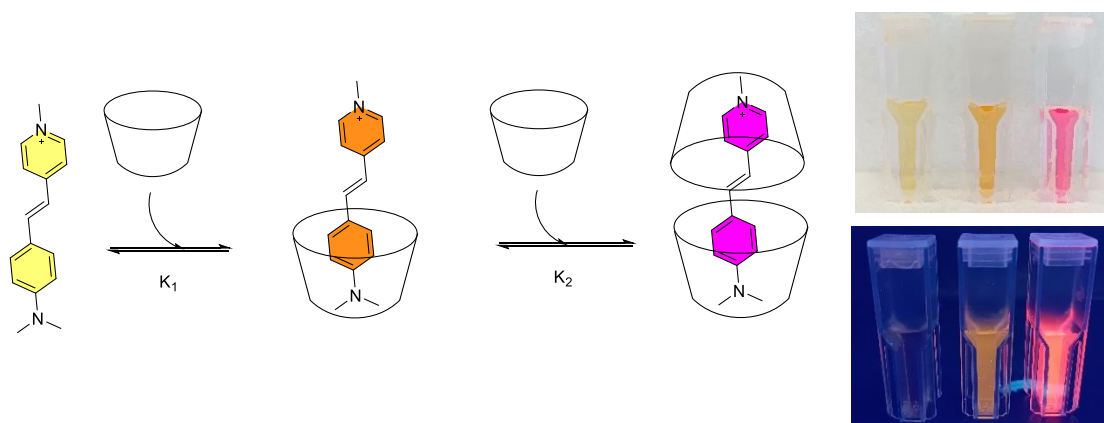


Figura 2.20 Equilíbrios observados na titulação de C1 a MeDASPI à esquerda. À direita, as soluções do corante livre, no equilíbrio 1:1 e 2:1 com C1, com e sem irradiação de luz a 366 nm.

No segundo equilíbrio, correspondente à encapsulação de um corante dentro de dois cavitandos, este fenómeno é ainda mais notório e o desvio para comprimentos de onda é ainda maior, porque todo o corante está na cavidade apolar e a HOMO está fortemente destabilizada.

As constantes de afinidade do equilíbrio 1:1 e 2:1 com C1:MeDASPI, foram obtidas a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático que se encontra descrito no subcapítulo A.2. Os comprimentos de onda seguidos foram a 450 nm, 480 nm e 565 nm, onde é possível observar o desaparecimento e aparecimento das diversas espécies no equilíbrio. A primeira constante de associação aparente, K_1 , entre o cavitando C1 e uma molécula de MeDASPI não foi possível de definir com certeza (a explicação será abordada na subsecção 2.3.3.1) e a segunda constante, K_2 , com a estequiometria de dois C1 e uma molécula de corante foi de $3.03 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, em água.

A primeira constante de associação parece ser relativamente alta, devido à estabilização do interior do recetor pela saída de moléculas de água e inclusão de uma molécula como a dime-tilanilina (como foi demonstrado no capítulo 2.2.1 na caracterização destes sistemas por RMN), mais hidrofóbica e estabilizada no interior do cavitando pela interação CH- π . A segunda constante já tem cerca de 100 vezes menos afinidade que a primeira, provavelmente porque a carga positiva no piridínio se encontra bastante solvatada por moléculas de água, embora a interação catião- π , seja potencialmente mais favorável. Por outro lado, a formação das ligações de hidrogénio entre os dois cavitandos neste equilíbrio e a saída de moléculas de água do interior da cavidade são a força motriz para a total encapsulação do corante.

De seguida, também se estudou o mesmo sistema por espectroscopia de emissão onde as mesmas soluções foram excitadas a 455 nm e 510 nm, os pontos isobésticos de cada equilíbrio, e observada a emissão dos compostos. Os espectros de emissão e respetivos ajustes teóricos encontram-se nas figuras 2.21a e 2.21b, respetivamente.

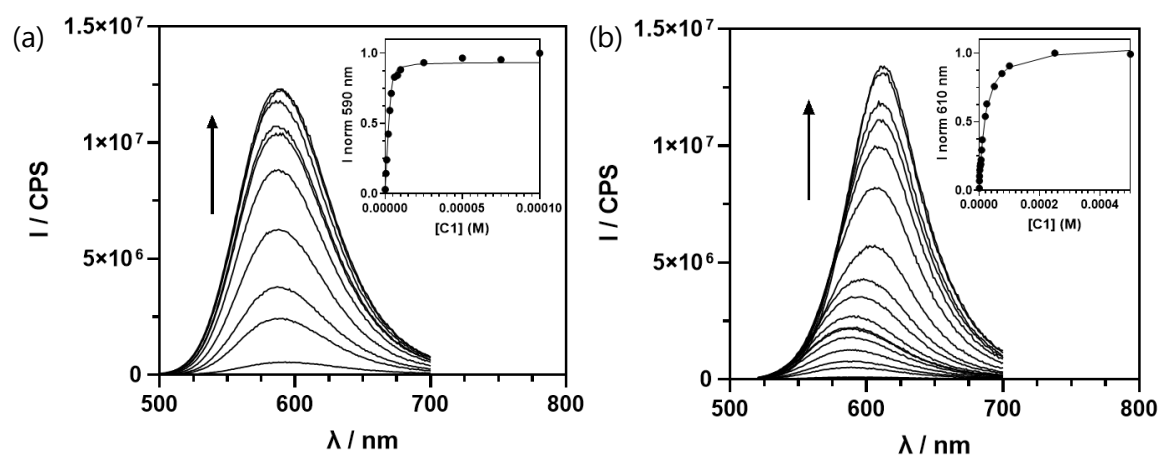


Figura 2.21 Espectros de Emissão do MeDASPI ($[MeDASPI]=5 \times 10^{-6}$ M) quando excitado a (a) 455 nm e (b) 510 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1, acompanhado por um aumento de emissão. O tratamento de dados experimentais nos máximos de emissão também estão presentes

Analisando apenas os espectros de emissão obtidos quando se excita a 455 nm, pode-se observar que o aumento da concentração de cavitando fez aumentar a intensidade da banda com máximo de emissão a 600 nm. Este fenómeno corresponde à encapsulação de um corante dentro de um cavitando sendo de notar que processo observado a baixas concentrações de C1 não é detetado por esta técnica. A fluorescência tem um aumento significativo, uma vez que dentro do cavitando o corante não consegue perder a energia do estado excitado para o estado fundamental através da rotação intramolecular de transferência de carga (*TICT*), como descrito na figura 1.21. Esta transição é facilmente realizada em solução, mas dentro do cavitando a molécula está estrangida e não consegue rodar o grupo doador de eletrões para ocorrer a transferência de carga, por isso a transição entre as orbitais fronteira é radiativa (*LE/ICT*). Este fenómeno é especialmente privilegiado na formação do equilíbrio 2:1 uma vez que todo o corante está confinado e o aumento de fluorescência é mais significativo, como se pode observar pelo espectro de emissão, quando excitado a 510 nm, e também pelos rendimentos quânticos descritos no subcapítulo 2.4.

Também na fluorescência se pode observar um ligeiro desvio batocrómico devido à aproximação das orbitais fronteira quando o corante se encontra cada vez mais encapsulado.

A primeira constante de equilíbrio, K_1 , foi estudada utilizando os espectros cuja excitação foi a 455 nm e a segunda constante de afinidade, K_2 , foi estudada pelos espectros cuja excitação foi a 510 nm. Para tal utilizaram-se as equações presentes no subcapítulo A2 e os valores das constantes de C1 associado com MeDASPI, em água, são: $K_1=3.87 \times 10^6$ M⁻¹ e $K_2=4.75 \times 10^4$ M⁻¹. Estes valores encontram-se em concordância com os valores de afinidade obtidos por espectroscopia de absorção, tendo em conta os erros associados a estas técnicas.

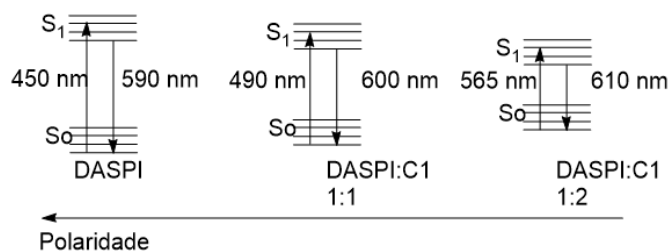


Figura 2.22 Desvio de Stokes do corante MeDASPI em água, no equilíbrio 1:1 e 2:1 com C1

O desvio de Stokes baseia-se na diferença entre a energia que é absorvida pela amostra e que depois é emitida. Este valor nunca é igual, devido à relaxação vibracional e fatores externos como a solvatação do estado excitado. Quando o corante MeDASPI se encontra livre, o seu desvio de Stokes é de 6222 cm^{-1} . Quando se encontra encapsulado na cavidade de C1 o desvio diminui para 3742 cm^{-1} e quando totalmente encapsulado em dois cavitandos passa a ser 1306 cm^{-1} . Quanto maior o grau de encapsulação, menor o Desvio de Stokes que se traduz numa menor diferença energética para realizar a transição eletrónica $\pi \rightarrow \pi^*$, devido à redução dos efeitos de relaxação vibracionais e a solvatação do estado excitado.

2.1.1.1 Dependência do pH

De forma a testar a estabilidade deste sistema a diferentes pHs, realizaram-se titulações na presença e ausência de cavitando, para determinar o pK_a do corante em água e dentro do recetor. O primeiro passo foi estudar o comportamento do MeDASPI em solução aquosa sem recetor e para tal realizou-se uma titulação ácido base com HCl, e seguiu-se a protonação por espectroscopia de absorção UV-Vis. Os espetros da titulação encontram-se na Figura A27a.

O MeDASPI é protonado no nitrogénio da dimetilamina e perde a capacidade de deslocalizar os eletrões da amina secundária porque os mesmos se encontram a fazer a ligação N-H, dessa forma a energia entre a HOMO e a LUMO vai ser muito superior devido à menor estabilização destas orbitais pelo efeito de conjugação eletrónica, o que se traduz num desvio para comprimentos de onda menores, para o UV, deixando a solução de absorver radiação na zona do visível. Assim, observa-se o desaparecimento da banda a 450 nm para obter uma banda a 325 nm. Os comprimentos de onda indicados foram seguidos e com as fórmulas presentes nas equações A28 a A30 foi possível concluir que o pK_a do corante é 3.28, em água.

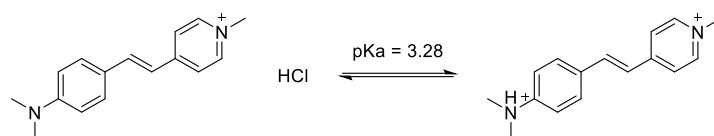


Figura 2.23 Equilíbrio ácido-base do corante MeDASPI

O próximo passo foi realizar a titulação do sistema C1:MeDASPI 1:1, e para isso a uma solução com 2.4×10^{-5} M de MeDASPI e 3.2×10^{-5} M de C1 foi adicionada uma solução de HCl para diminuir o pH da solução e as alterações foram seguidas por UV-Visível. Os espectros obtidos podem ser encontrados abaixo.

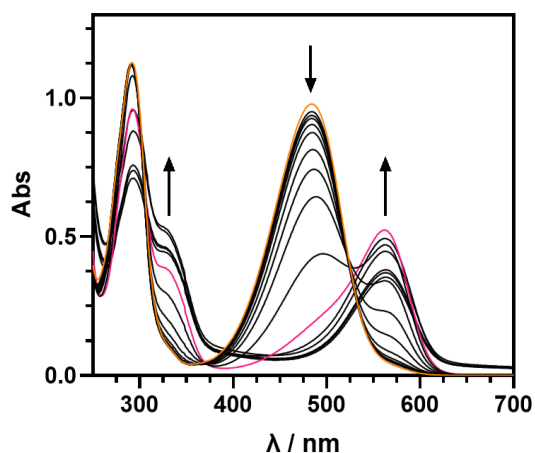


Figura 2.24 Espectro de Absorção da titulação do complexo C1:MeDASPI ($[\text{MeDASPI}] = 2.4 \times 10^{-5}$ M e $[\text{C1}] = 3.2 \times 10^{-5}$ M), em água. A laranja o espectro inicial a pH=6.8 e a rosa o espectro final a pH<0.5

Inicialmente a banda a 485 nm foi perdendo intensidade com a diminuição do pH, dando lugar a uma banda a 565 nm. A pH aproximadamente 0.5, a linha de base começou a aumentar, indicar apontando para a formação de agregados insolúveis. O primeiro comportamento é muito semelhante à formação da cápsula, como se observou na titulação conduzida a pH neutro para determinação das constantes de associação (subcapítulo 2.3.1.2). Assim, inicialmente especulou-se que a diminuição do pH favorecia a formação da cápsula dimérica, impedindo de forma eficaz a protonação do corante, enquanto que segundo poderá ser atribuído à agregação da cápsula. Provavelmente, o aumento da concentração de íons em solução, especialmente íons cloreto, pode fazer com que as repulsões entre as cargas positivas da cadeia lateral dos grupos imidazólio de C1 sejam menores e facilite a formação de um agregado (Figura 2.25).

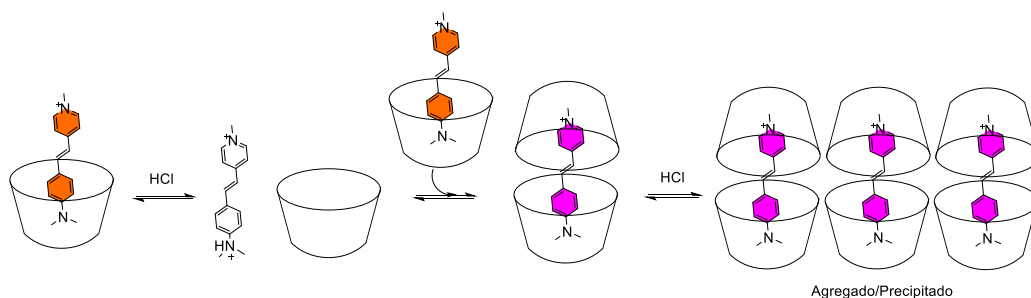


Figura 2.25 Equilíbrios propostos com a diminuição de pH numa solução com C1MeDASPI, em água

A titulação da cápsula C1₂MeDASPI foi realizada da mesma forma que as anteriores e continha 2.4×10^{-5} M de corante e 2.4×10^{-4} M de cavitando (Figura A28a). Neste caso, o que se observou foi um ligeiro aumento da banda característica do complexo 2:1, que absorve a 565 nm, apoiando novamente o modelo proposto do favorecimento da cápsula com a diminuição do pH. Novamente, a pH aproximadamente 0.5 observou-se uma subida da linha de base e a formação de um precipitado de cor roxa, plausivelmente a precipitação do agregado proposto anteriormente.

Com as titulações dos complexos realizadas, pode-se especular que a diminuição do pH (e consequente aumento da força iónica) favorece a formação do complexo 2:1 C1:MeDASPI e que esta conformação se mantém estável numa gama de pH extensa, desde pH cerca de 7 até 1, o que implica que não haja protonação do corante a pH baixo. Desta forma, pode-se concluir que, para os fins de aplicação no presente trabalho, este sistema se comporta de forma estável.

2.1.1.2 Dependência da Força Iónica

A força iónica pode ser definida como sendo a quantidade total de iões dissociados em solução, multiplicado pelo quadrado da carga dos respetivos iões. Este fator influencia vários fenómenos, como por exemplo interações entre sistemas supramoleculares, solubilidade, estabilidade, entre outros.⁶⁷ Para sistemas supramoleculares como os cavitandos de Cram, foram testados vários tampões e sais, e foi possível entender a influência que os mesmos têm nos sistemas, particularmente nas constantes de associação, sendo por isso necessário ter este efeito em conta no sistema em estudo.⁶⁸

De forma a entender se a formação do precipitado obtido anteriormente, quando o pH era inferior a 1, estaria relacionado com o aumento da força iónica, realizou-se uma titulação do complexo 2:1 com o aumento da força iónica, utilizando uma solução de NaCl com concentrações entre 5 a 500 mM (Figura A29a). Seguiu-se a mesma por espectroscopia de absorção e observou-se que com o aumento da força iónica, a banda a 565 nm ganhou intensidade, provavelmente devido à total conversão da meia cápsula na cápsula dimérica. Também se observou que a concentrações superiores a 100 mM existe a formação de um precipitado com as mesmas características observadas com a diminuição do pH. A concentração de cloreto em ambos os casos é semelhante aquando do momento de precipitação, por isso pode-se concluir que a formação do precipitado obtido se deve ao aumento da concentração de sais em solução.

A titulação do cavitando livre, C1, com concentrações entre 5 e 500 mM de NaCl também se realizou (Figura A29b) e observou-se que, com o aumento da força iónica, existe uma diminuição da absorvância de forma gradual a 300 nm e a 250 mM existe a formação de um precipitado. Novamente se conclui que o cavitando precipita com força iónica elevada, mas parece que, quando se encontra dimerizado em forma de cápsula com o corante no seu interior tem maior sensibilidade a este efeito e precipita a concentrações mais baixas.

2.1.1.3 Dependência da Temperatura

A temperatura é um fator importante em sistemas supramoleculares pois influenciam as interações não covalentes e, conseqüentemente, os equilíbrios. A transferência de calor para a solução pode ter diferentes alterações nestes sistemas desde variação de interações que se traduzem na afinidade, como a estabilidade dos complexos ou solubilidade.⁶⁹ Assim é necessário entender o comportamento do complexo C1₂MeDASPI a altas temperaturas e a capacidade de regenerar o sistema depois da exposição a altas temperaturas. Portanto, a uma solução de C1 e MeDASPI com as respetivas concentrações: 8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M, realizou-se um ensaio com aumento de temperatura como se pode observar pela figura 2.26.

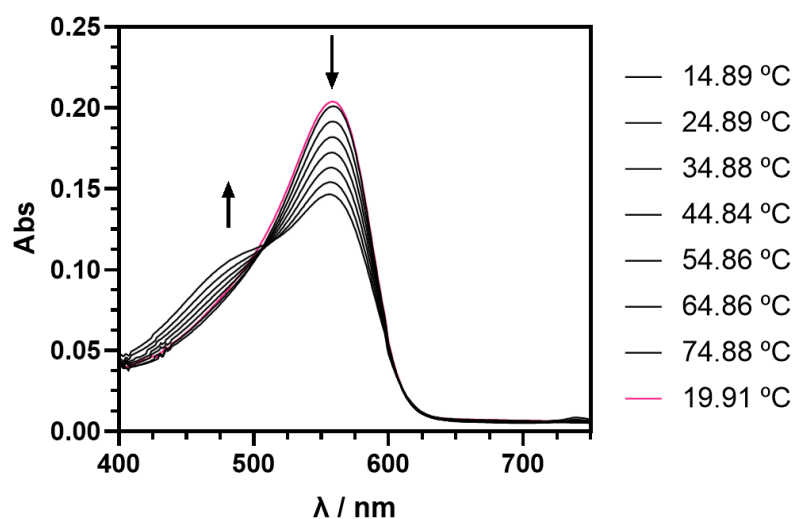


Figura 2.26 Espectro de absorção de UV-Vis do complexo C1₂MeDASPI ([C1]=8x10⁻⁵ M e [MeDASPI]=6x10⁻⁶ M) em água, variando a temperatura. (O aumento da temperatura faz com que a banda a 565 perca intensidade e a cor de rosa encontra-se o espectro da regeneração da temperatura)

O aumento da temperatura parece diminuir a banda a 565 nm, correspondente ao corante totalmente encapsulado, portanto parece que existe um desfavorecimento da cápsula e ligeiro favorecimento da meia cápsula (banda a 485 nm). A ligações de hidrogénio dependem da temperatura e podem quebrar com o aumento da mesma, fenómeno que foi observado neste ensaio.

Quando a temperatura volta a baixar, o sistema recupera na sua totalidade para voltar a encapsular o corante em dois cavitandos. A conclusão que se pode realizar é que a cápsula é pouco estável nestas condições, mas depois pode regenerar a temperaturas mais baixas, mostrando a versatilidade deste sistema.

2.3.2 C1-EtDASPI

Novamente, prepararam-se soluções em *batch* com concentrações fixas de corante EtDASPI, a 5x10⁻⁶ M e concentrações de cavitando crescentes em cada solução, em água. As soluções foram posteriormente estudadas por absorção e também por emissão depois de equilibradas. A titulação por absorção do corante EtDASPI com C1 encontra-se na figura 2.27 tal como o ajuste dos dados experimentais.

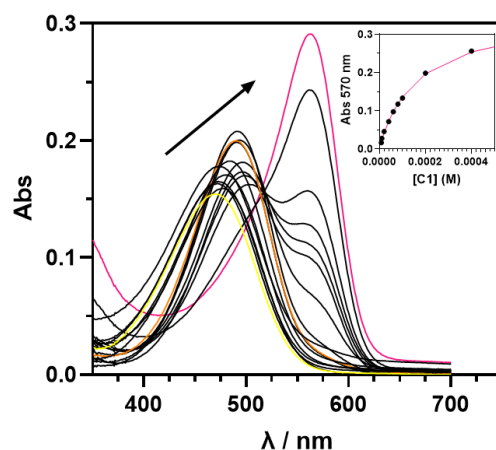


Figura 2.27 Espectro de Absorção do EtDASPI ($[\text{EtDASPI}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1 (Do espectro amarelo (EtDASPI) existe um desvio para um máximo de absorção a 490 nm, a laranja (C1EtDASPI), e depois para 570 nm, a rosa (C1₂EtDASPI). O tratamento de dados experimentais encontram-se evidenciados com as respetivas cores

No caso do corante EtDASPI, que tem um máximo de absorção a 470 nm e um coeficiente de extinção molar a esse comprimento de onda e em água de $27654 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Figura A26b), quando titulado com C1 passou a ter um máximo de absorção a cerca de 490 nm e posteriormente a 570 nm. Como se observou por RMN e também comparando o resultado obtido com o corante MeDASPI, há um primeiro processo de encapsulação do corante na cavidade de um cavitando, que causa o desvio batocrómico devido à diminuição da polaridade do ambiente químico, e posteriormente a encapsulação completa do corante em dois cavitandos, sofrendo um desvio para o vermelho acentuado.

A primeira constante de afinidade atribuída à transição da banda de EtDASPI de 470 nm para 490 nm, não foi possível de se estudar pois não foi possível realizar o ajuste dos dados (explicação na subsecção 2.3.3.1), já a segunda constante, K_2 , foi obtida a partir do ajuste dos dados às equações do capítulo A.2.1 e obteve-se o valor de $6.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Também se estudou o mesmo sistema por espectroscopia de emissão onde as mesmas soluções foram excitadas a 465 nm e 510 nm, os pontos isobésticos de cada equilíbrio, e observada a emissão dos compostos. Os espectros de emissão encontram-se na figura 2.28 e os ajustes correspondentes.

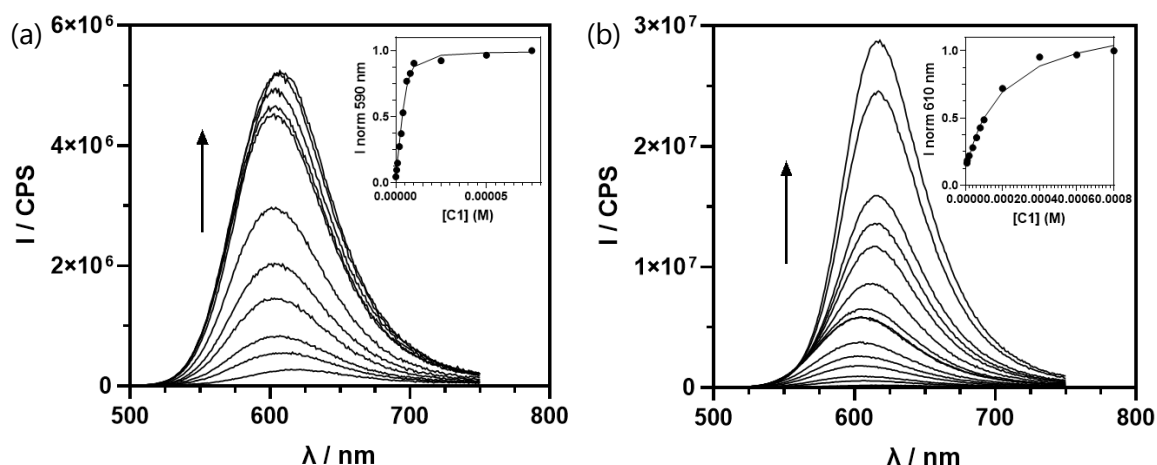


Figura 2.28 Espectros de Emissão do EtDASPI ($[\text{EtDASPI}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$) quando excitado a (a) 465 nm e (b) 510 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1, acompanhado por um aumento de emissão. O tratamento de dados experimentais nos máximos de emissão também estão presentes

O comportamento do corante EtDASPI mantém-se semelhante ao corante MeDASPI quando excitado aos comprimentos de onda dos pontos isobésticos dos dois equilíbrios observados. As constantes de afinidade dos equilíbrios, K_1 e K_2 foram obtidos através das equações presentes em A.2.1 e A.2.2 e correspondem respetivamente a $1.49 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $5.29 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, em água. O valor da primeira constante é muito similar ao obtido com o corante metilado, o que demonstra não existir uma grande diferença no favorecimento da encapsulação de ambos os corantes. Por outro lado, a constante da encapsulação total do corante EtDASPI, K_2 , é cerca de 10 vezes menor que com MeDASPI. Provavelmente, o aumento da cadeia da anilina é o suficiente para dificultar a formação de ligações de hidrogénio entre os dois cavitandos para formar a cápsula, pois a sua distância é ligeiramente superior (Figura 2.12).

2.3.2.1 Dependência do pH

À medida que se diminuiu o pH numa solução de EtDASPI em água por meio de adição de HCl, observou-se o desaparecimento da banda a 470 nm e o aparecimento de uma banda a 325 nm, que corresponde ao corante protonado (Figura A27b). A partir do equilíbrio presente na figura 2.29 e das equações A28 a A30, presentes no subcapítulo A.2.5, foi possível realizar o ajuste dos resultados obtidos qualitativamente para os comprimentos de onda dos máximos de absorção de cada espécie e o valor de pKa calculado foi 4.28. Quando comparado o valor

de pKa do EtDASPI com o MeDASPI, foi possível concluir que o primeiro é menos ácido por 1 unidade de pKa, o que se encontra em concordância com o esperado teoricamente devido à presença dos etilos.

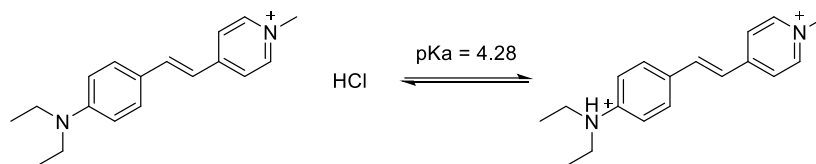


Figura 2.29 Equilíbrio ácido-base do corante EtDASPI em meio aquoso

Para realizar a titulação ácido base do equilíbrio 1:1 do corante e do cavitando, utilizaram-se 1×10^{-5} M de EtDASPI e 1.7×10^{-5} M de C1 numa solução aquosa. Esta solução foi titulada com soluções de HCl e seguida por UV-Visível, como mostrado na figura 2.30.

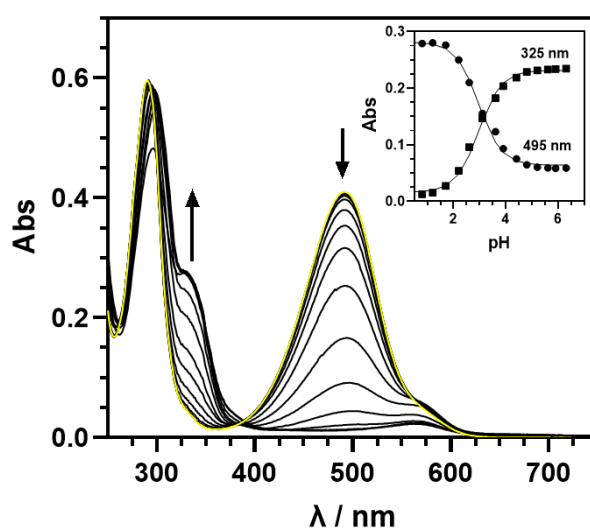


Figura 2.30 Espectro de Absorção da titulação ácido-base do complexo C1:EtDASPI (1×10^{-5} M de EtDASPI e 1.7×10^{-5} M de C1), em água. Iniciou-se a titulação a pH=6.2 (a amarelo) e no final pH<0.5. O tratamento dos dados nos máximos de absorção também se encontra presente

A titulação iniciou-se com a banda a 495 nm a manter-se relativamente com a mesma intensidade, para de seguida começar a diminuir a sua absorvância ao longo da titulação. Também se observou o aparecimento de uma banda a cerca de 330 nm à medida que o pH diminuía, esta banda encontra-se mesma zona que a banda do corante protonado, o que levou a especular que mesmo dentro do cavitando existia protonação do corante. Para provar esta teoria os dados experimentais foram tratados com os dados calculados através do equilíbrio presente

na figura 2.29 e as equações A28 a A30. Os dados foram otimizados para os valores obtidos experimentalmente e o valor de pKa experimental foi de 2.96, para quando o corante se encontra encapsulado dentro de uma molécula de cavitando. O pKa experimental do corante livre e encapsulado sofreu uma diferença de -1.32 unidades de pH, o que significa que existe uma maior dificuldade em protonar o corante quando este se encontra dentro do recetor. Estes resultados quando comparados com o corante MeDASPI encapsulado em um C1 diferem entre si, porque com o corante metilado existe o favorecimento da formação do complexo 2:1 e no caso do corante, o mesmo é protonado a pH ácido. Como a amina do EtDASPI está ligeiramente menos encapsulada na cavidade devido ao espaço ocupado pelos etilos (ver subsecção 2.4), pode facilitar a protonação.

De forma a estudar o impacto do pH no equilíbrio 2:1 C1:EtDASPI, utilizou-se uma solução com 1×10^{-5} M de EtDASPI e 1×10^{-3} M de C1, em água e adicionando HCl (Figura A28b). Observou-se o estreitamento e desvio hipocrómico da banda característica do corante EtDASPI quando encapsulado em 2 cavitandos, correspondendo ao seu desfavorecimento. Novamente a pH inferior a 1, o complexo 2:1 precipitou. As conclusões que se podem tirar são que a cápsula é relativamente estável em meio ácido, até pH cerca de 1 e por isso é um equilíbrio relativamente independente do pH do meio e que a cápsula inibe a protonação do corante.

2.3.3 C1-JDASPI

2.3.3.1 Espectroscopias óticas

Por RMN, já tinha sido observado que este corante apenas forma o equilíbrio 1:1 com C1, pois não há possibilidade da formação da cápsula completa. Novamente, prepararam-se soluções em *batch* com concentrações fixas de corante JDASPI, a 5×10^{-6} M e concentrações de cavitando crescentes em cada solução, em água. As soluções foram posteriormente estudadas por absorção e também por emissão depois de equilibradas.

O espectro de absorção encontra-se na figura 2.31. Este corante tem um máximo de absorção a 470 nm com um coeficiente de extinção molar de $30244 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Figura A26c), em água. Quando titulado com C1, pode-se observar um máximo de absorção a 500 nm, que corresponde ao corante encapsulado em um cavitando. Infelizmente o ajuste destes dados não foi

possível de se realizar uma vez que aparenta ter um processo inicial que desloca o máximo de absorção para cerca de 480 nm e só depois se dá um desvio hipercrómico correspondente à associação e, portanto, a perda do ponto isobéstico, que indica a presença de mais que um processo.

Realizou-se o tratamento de dados assumindo um pré-equilíbrio em que sejam encapsulados 2 corantes dentro de um cavitando, o que se mostrou adequado, mas como a contribuição dessa espécie apenas atinge 1% do total de espécies em solução, este processo não foi estudado mais adiante. Também o facto de o valor da constante de associação de 1 corante para 1 recetor não se alterar de forma significativa quando o tratamento de dados se realiza através do processo indicado, permite desprezar este processo.

De notar que, se a titulação for feita de forma contínua e direta, sem existir o tempo de equilibrar as soluções, o processo de encapsulação de dois corantes não é possível de se observar, o que indica que existe uma cinética lenta associada a este processo.

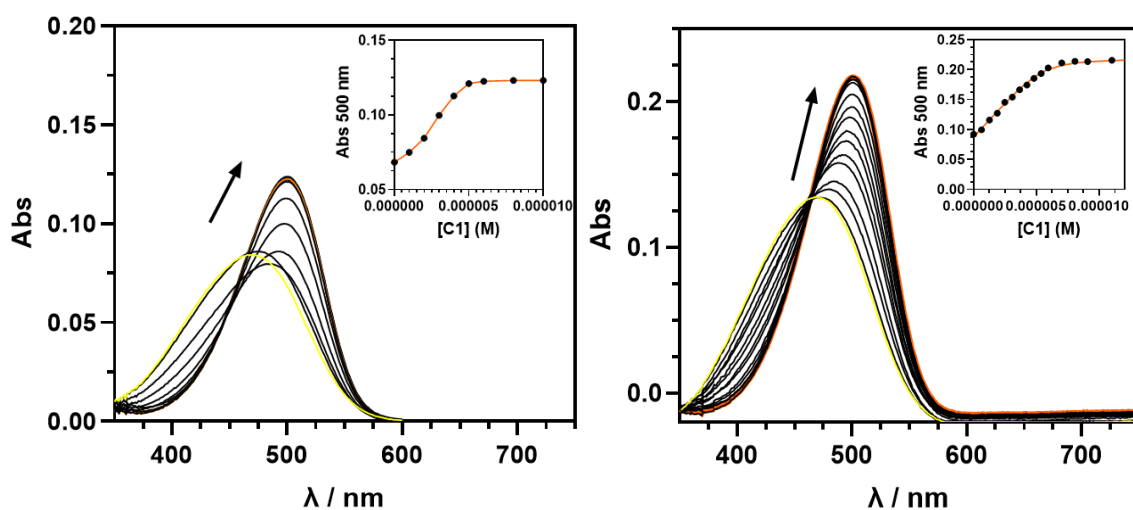


Figura 2.31 Espectros de Absorção do JDASPI ($[JDASPI]=3 \times 10^{-6}$ M), em *batch* à esquerda e direto à direita, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando 1 (A titulação inicia-se no espectro a amarelo (JDASPI) deslocando-se para o espectro a laranja (C1JDASPI)). O tratamento dos dados experimentais no máximo de absorção também está presente

A emissão foi estudada excitando a amostra a 445 nm e obtiveram-se os seguintes espectros de fluorescência. Com o aumento da concentração de C1 e conseqüente encapsulação do corante, a emissão passou a ter maior intensidade a 600 nm, que ficou constante quando se atingiu o equilíbrio 1:1. Desta forma foi possível estudar o equilíbrio 1:1 e obter o valor da

constante K_1 , em água que foi $5.87 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Este valor encontra-se em concordância com o valor obtido para o corante MeDASPI e conclui-se, portanto, que alterações no lado do anel piridínio não tem influência na primeira constante de afinidade, mas impossibilitam a formação de um equilíbrio 2:1 com dois cavitando devido à extensão da cadeia do piridínio do corante JDASPI que impossibilita as ligações de hidrogénio entre os dois cavitando. O fenómeno de encapsulação de 2 corantes em um cavitando parece não ser observável por emissão, tal como nos corantes anteriores.

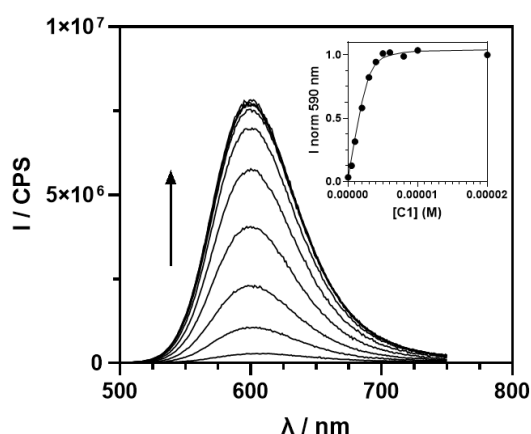


Figura 2.32 Espectros de Emissão do JDASPI ($[JDASPI]=5 \times 10^{-6} \text{ M}$) quando excitado a 455 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C1, acompanhado por um aumento da fluorescência ao longo da titulação. O tratamento dos dados experimentais no máximo de emissão também se encontra presente

2.3.3.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Para estudar a constante de afinidade deste sistema com mais detalhe, realizou-se a titulação do corante com C1, utilizando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (Figura 2.33).

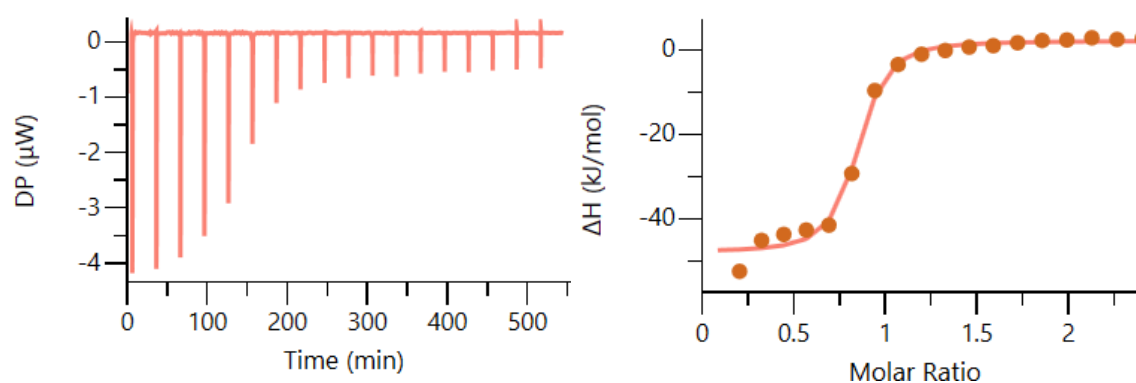


Figura 2.33 Curva de titulação isotérmica de C1MeDASPI (0.5 e 0.05 mM respetivamente), em água. À esquerda está presente a quantidade de calor que foi reposta a cada adição de C1, em μW . À direita encontra-se o perfil da titulação por esta técnica em função da fração molar de C1

O perfil da associação de JDASPI a C1 é exotérmico, uma vez que existe libertação de calor. Este processo encontra-se em consonância com muitos dos sistemas supramoleculares estudados por CTI. Através do gráfico da figura 2.33 e das informações presentes em A.1.4, foi possível obter uma constante aparente de associação de $3.09 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e uma entalpia do processo é de $-50,1 \text{ kJ/mol}$, Este valor coincide com a constante obtida por fluorescência, mas o número de locais de ligação foi de 0.740, o que indica que a estequiometria deste processo pode ser mais complicada do que estava inicialmente idealizado para este sistema ou que as concentrações dos compostos possa apresentar algum erro associado.

Esta técnica não foi utilizada para os restantes sistemas porque o tratamento dos dados, especificamente o ajuste da linha de base, influencia bastante os resultados obtidos. Estes sistemas por terem cinética lenta têm um grande impacto nas flutuações da linha de base, pelo que o seu estudo é mais árduo e depende do utilizador.

2.3.3.3 Job Plot

O método de variação contínua ou mais conhecido por Job Plot, é bastante utilizado em estudos de associação molecular, pois permite o estudo qualitativo da associação entre um recetor e um ligando. Para tal, fixa-se a concentração total de ambos os constituintes, neste caso de C1 e de JDASPI e variam-se as frações molares de ambos de forma linear.⁷⁰

Como a concentração se encontra correlacionada com a espectroscopia de UV-Vis, seguiu-se por este método a variação contínua, mais especificamente a 470 nm que corresponde ao máximo de absorção do corante, em água.

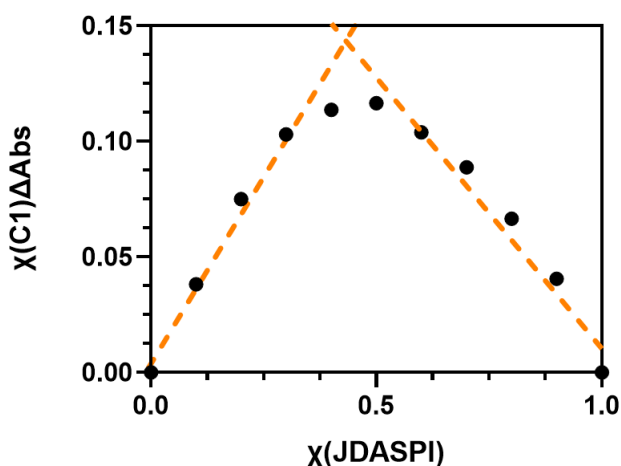


Figura 2.34 Método de variação contínua de C1 e JDASPI ($[JDASPI]_{\text{máx}}=2 \times 10^{-5}$ M), em água e seguido por espectroscopia de UV-Vis

Os dados presentes na figura 2.34 mostram que existe uma estequiometria 1:1, uma vez que as curvas de aparecimento e desaparecimento do complexo C1JDASPI se centram em $\chi(JDASPI)=0.5$. Estes dados apoiam que no caso do corante JDASPI o processo mais significativo consiste na encapsulação em um recetor.

2.3.4 C2-MeDASPI

2.3.4.1 Cinética

Como já tinha sido observado anteriormente cinética lenta para o cavitando C1, também foram realizados ensaios onde se monitorizou a cinética de associação do recetor C2 e do corante. Realizaram-se ensaios com concentração fixa de corante e aumentou-se a concentração de C2. Os espectros de 3 cinéticas com 0.4:1, 1:1 e 4:1 encontram-se na figura 2.35.

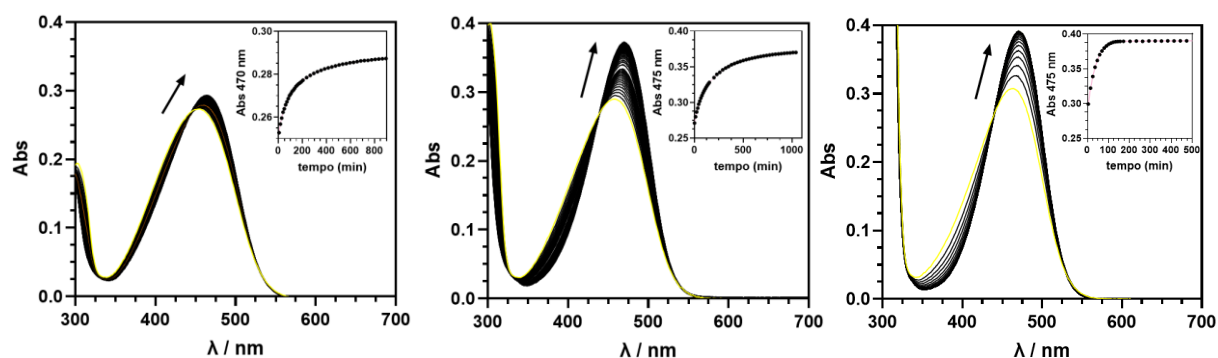


Figura 2.35 Espectros de absorção UV-Visível de C2-MeDASPI ($[MeDASPI]=1 \times 10^{-5}$ M), em água, ao longo do tempo (minutos). Da esquerda para a direita a proporção de C2:MeDASPI é 0.4:1, 1:1, 4:1. Os dados experimentais no máximo de absorção estão ligados entre si para melhor compreensão

Os espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo foram realizados para obter informação sobre a cinética do sistema e parece que existe um aumento da associação do corante no cavitando, devido ao desvio batocrómico e hiperocrómico com o prolongar da experiência. Com o aumento da concentração de C2, observou-se o aumento da velocidade de associação e por isso o equilíbrio era atingido de forma mais rápida.

Para elucidação do processo cinético, realizou-se um ensaio cinético seguido por ^1H RMN que se encontra presente na figura 2.16, subcapítulo 2.3.4. Como já foi constatado pela técnica utilizada anteriormente, existem dois processos que contribuem para a cinética lenta do processo global: a alteração conformacional do cavitando C2 de uma conformação inativa - ve-lcrando (papagaio dimerizado) - para uma conformação ativa e capaz de encapsular analitos, o vaso e posteriormente dá-se a encapsulação (Figura 2.36). A presença do analito é um estímulo para que haja uma alteração estrutural do cavitando que estabelece um novo equilíbrio.

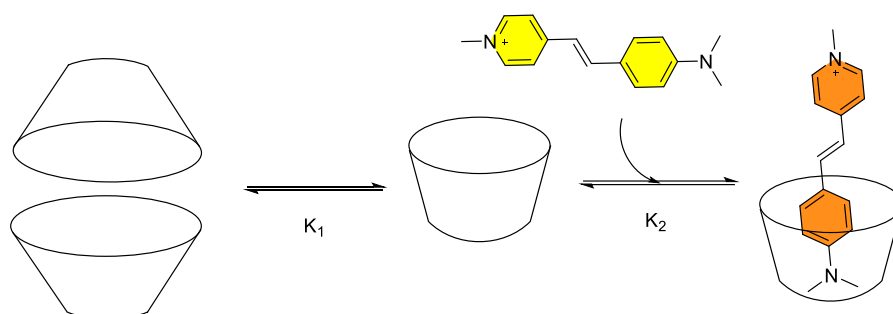


Figura 2.36 Esquema cinético dos vários equilíbrios envolvidos na encapsulação do corante nos cavitandos

Como o objetivo principal deste trabalho é o estudo de um sistema equilibrado, a cinética não foi totalmente aprofundada, apenas se discutiu as possíveis causas e também foi essencial para conhecer o tempo que as soluções das titulações precisam para equilibrar.

2.3.4.2 Situação de equilíbrio

O cavitando C2, metilado nas ureias que formam o arco superior deste macrocíclo, tem dois máximos de absorção na zona do ultravioleta. Um dos máximos de absorção a 305 nm, tem o coeficiente de extinção molar: $32956 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em água, valor muito semelhante ao obtido para C1 com um ligeiro desvio para comprimentos de onda superiores (Figura 25b).

A titulação do corante MeDASPI ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) foi realizada com concentrações crescentes de C2 e estudou-se inicialmente por espectroscopia de UV-Vis (Figura 2.37a), onde se observou uma diminuição da absorção inicial do corante, a 450 nm, e posteriormente a absorção aumenta com um desvio de 20 nm para energias inferiores em relação ao máximo de absorvância do corante, até que atinge um patamar a esse comprimento de onda. Novamente, foi realizado o tratamento de dados (Apêndice A.2.2) para um pré equilíbrio de 2 corantes encapsulados em 1 cavitando e posteriormente atingir-se o equilíbrio 1:1. Neste caso, parece que a primeira espécie tem mais impacto porque é formada em maior quantidade, provavelmente porque a

alteração estrutural dos metilos cria uma cavidade maior capaz de encapsular dois corantes mais facilmente. A constante de formação do equilíbrio 1:1 parece não se alterar e por isso este processo não foi estudado em pormenor.

Desta forma, prosseguiu-se para a titulação por fluorescência onde se seguiu a emissão ao longo do aumento da concentração de cavitando. O comprimento de excitação utilizado foi de 422 nm, correspondente ao ponto isobéstico presente nos espectros de absorvância e os espectros que foram obtidos são apresentados na figura 2.37b.

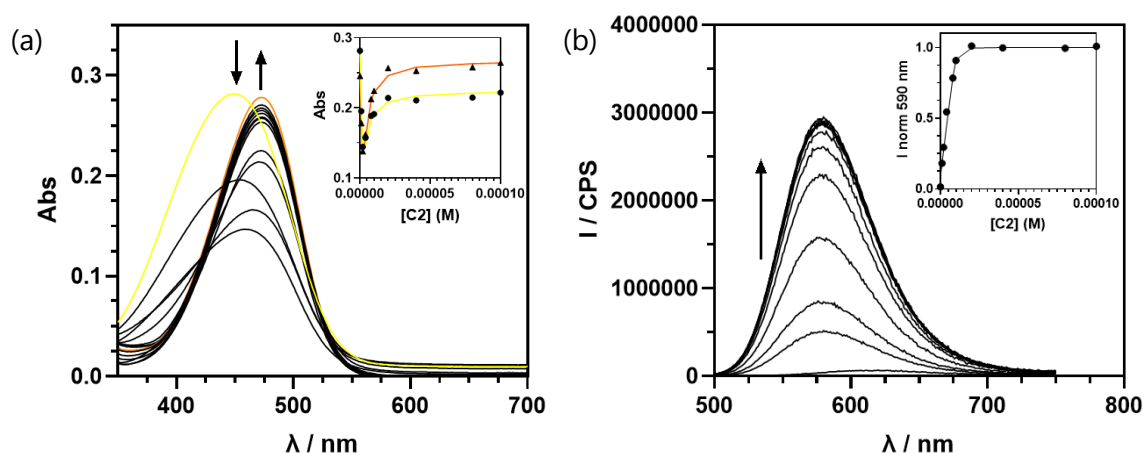


Figura 2.37 (a) Espectro de Absorção de MeDASPI (1×10^{-5} M, em água), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2. A titulação inicia-se no espectro a amarelo (MeDASPI) e termina no espectro a laranja (C2MeDASPI) (b) Espectros de Emissão do MeDASPI (1×10^{-5} M, em água), quando excitado a 422 nm, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2, acompanhado por um aumento de fluorescência. Os tratamentos dos dados para os máximos de intensidade também estão presentes

Novamente, observou-se o aumento da emissão, quando se aumentou a concentração de cavitando, bloqueando a TICT. Esse aumento foi imediato, com baixas concentrações de cavitando e estabilizou quando se atingiu concentrações semelhantes à de corante, o que indicia um equilíbrio 1:1 e não a formação da cápsula como observado no cavitando C1, o mesmo comportamento já foi aferido por RMN ^1H . Foi selecionado o comprimento de onda máximo de emissão a 580 nm e realizou-se o ajuste dos dados experimentais de emissão com os dados calculados, a partir das equações apresentadas no subcapítulo A.2.1. A constante de afinidade calculada para o equilíbrio C2MeDASPI, em água, foi de $9.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Parece que a afinidade que o cavitando 2 tem para o corante MeDASPI é ligeiramente mais elevada que no caso de C1, o que demonstra que variações a nível do cavitando podem ter

alguma influência não só na formação dos diversos equilíbrios, mas também no caso da afinidade destes sistemas. Outra alteração espectroscópica entre o cavitando C1 e C2 é que na formação do equilíbrio 1:1 com o corante, o desvio batocrômico sentido pelo mesmo com C2 é ligeiramente menor que com C1 (20 nm e 30 nm respetivamente), o que leva a especular que existe uma pequena diminuição da polaridade da cavidade de C2 em comparação com C1, que desloca para comprimentos de onda superior. Provavelmente os metilos do cavitando 2 aumentam o espaço da cavidade e não existe um ambiente tão apolar.

2.3.5 C2-EtDASPI

A titulação do corante EtDASPI (1×10^{-5} M) foi realizada com concentrações crescentes de C2 e estudou-se inicialmente por espectroscopia de UV-Vis (Figura 2.38), onde se observou uma diminuição da absorção inicial do corante, a 470 nm, e posteriormente a absorção aumenta com um desvio para energias inferiores de 10 nm em relação ao máximo de absorvância do corante, até que atinge um patamar a esse comprimento de onda. Tal como no corante anterior os dados foram tratados para um pré-equilíbrio 2:1 e a constante de formação do complexo 1:1 parece não se alterar.

Novamente, prosseguiu-se para a titulação do corante com C2, estudada por emissão. O comprimento de excitação utilizado foi de 437 nm, correspondente ao ponto isobéstico, e o espectro que foi obtido está presente da figura 2.38.

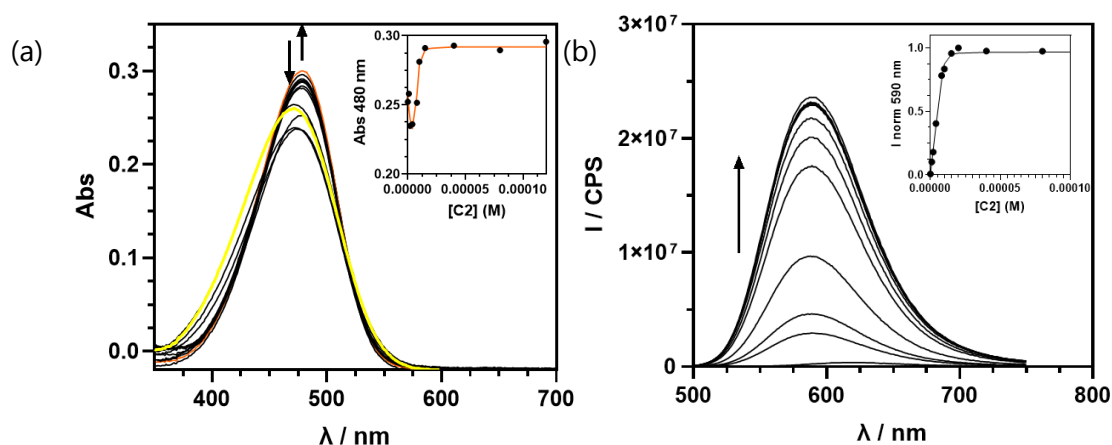


Figura 2.38 (a) Espectro de Absorção de EtDASPI (1×10^{-5} M, em água), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2. A titulação inicia-se no espectro a amarelo (EtDASPI) e termina no espectro a laranja (C2EtDASPI) (b) Espectros de Emissão do EtDASPI (1×10^{-5} M, em água), quando excitado a 437 nm, obtidos

na ausência e na presença de concentrações crescentes de cavitando C2, acompanhado por um aumento de fluorescência. Os tratamentos dos dados para os máximos de intensidade também estão presentes

Observou-se a mesma tendência do corante anterior. Foi selecionado o comprimento de onda máximo de emissão a 590 nm e realizou-se o ajuste dos dados experimentais de emissão com os dados calculados, a partir das seguintes equações A8 a A12. A constante de afinidade calculada para o equilíbrio C1EtDASPI, em água, foi de $9.16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, o que está em concordância com a afinidade com o mesmo recetor para o corante MeDASPI. Conclui-se assim que uma alteração como a observada no corante metilado ou etilado não altera a afinidade destes compostos para a cavidade hidrofóbica e apolar do cavitando C2.

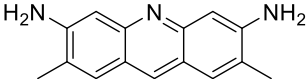
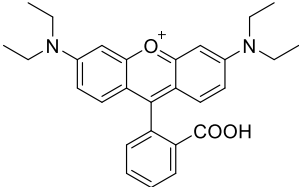
2.4 Rendimento Quântico de Fluorescência

Uma molécula, quando excitada para o seu respectivo estado excitado, tem a tendência para voltar para o seu estado fundamental, devido à maior estabilidade do mesmo. Para tal, pode perder essa respetiva energia de processos radiativos ou não radiativos. A probabilidade de a perda de energia ser radiativa, pode ser estimada através do rendimento quântico de fluorescência, pelo método indireto. Deste modo, utiliza-se uma molécula com as propriedades foto-físicas conhecidas (referência) para o cálculo do RQF. A equação que se utiliza para o cálculo indireto encontra-se abaixo e a sua dedução e explicação encontram-se no apêndice A.2.6.

$$\frac{\Phi_a}{\Phi_r} = \frac{I_a \times (1 - 10^{-A_r})}{I_r \times (1 - 10^{-A_a})} \times \frac{n_{ra}^2}{n_{ra}^2} \quad (2.4)$$

As referências utilizadas nestes estudos foram o amarelo de acridina e a rodamina B, com as seguintes características:

Tabela 3. Moléculas de referência utilizadas para o estudo do RQF e as suas respetivas características⁷¹

Molécula de Referência		
Rendimento Quântico de Fluorescência	0.47	0.70
Solvente	Etanol	Etanol
Índice de Refração	1.3647	1.3647
$\lambda_{excitação}$ (nm)	420	510

A absorvância foi ajustada para $A < 0.1$ e para valores semelhantes e de seguida foram medidos os espectros de fluorescência, excitando aos devidos comprimentos de onda de cada referência (Tabela 3). No caso dos corantes livres, utilizou-se acridina como referência pois o comprimento de onda de absorção é mais semelhante, no caso dos complexos com os cavitados utilizou-se a rodamina B, pois o espectro de absorção e emissão é semelhante. Os dados foram

tratados como explicado anteriormente e obtiveram-se os seguintes rendimentos quânticos para as diversas espécies em estudo:

Tabela 4. Rendimento quântico de fluorescência para os corantes MeDASPI, EtDASPI e JDASPI livres e quando encapsulados no cavitando C1 ou C2 em complexo binário ou ternário

	MeDASPI	EtDASPI	JDASPI
s/ cavitando	0.004	0.005	0.004
1 C1	0.14	0.03	0.11
2 C1	0.49	0.18	-
1 C2	0.12	0.02	-

Os corantes livres não possuem fluorescência considerável, uma vez que os mesmos perdem a energia da passagem do estado excitado para fundamental por processos não radiativos de torção do grupo doador, neste caso da metilanilina ou dimetilanilina (TITC).

Na presença do cavitando a torção deste grupo encapsulado fica mais impossibilitada, devido ao impedimento estérico dentro da cavidade e a perda passa a ser em parte radiativa com um aumento considerável da fluorescência, especialmente quando se forma a cápsula entre os dois cavitandos. Este comportamento é observado tanto no caso do EtDASPI como no MeDASPI com o cavitando 1. Comparando estes dois corantes, rapidamente se observa que o corante com os metilos (MeDASPI) tem maior fluorescência tanto no equilíbrio 1:1 como 2:1, em comparação com o corante etilado. Esta diferença é explicada pela maior encapsulação do MeDASPI dentro do cavitando, o que torna mais difícil a torção da amina. No caso do EtDASPI, os etilos, como são mais volumosos, podem fazer com que a amina não esteja tão encapsulada no cavitando, e pode rodar mais livremente para perder energia de forma não-radiativa. Estas observações podem ser apoiadas através dos desvios químicos acentuados dos prótons quando se encontram encapsulados no cavitando 1, como se mostra na figura 2.39, pois quanto mais encapsulados mais desviados serão para campo alto. O anel diretamente ligado à amina encontra-se mais encapsulado no caso do MeDASPI e por isso a sua rotação para facilitar a perda não radiativa é mais impedida.

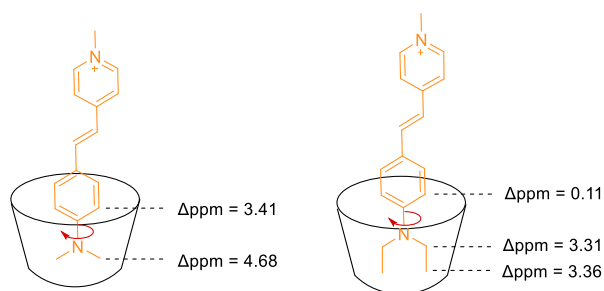


Figura 2.39 Esquema representativo da encapsulação dos corantes MeDASPI e EtDASPI no recetor C1, acompanhado pelos desvios químicos observados por RMN ^1H de alguns prótons dos corantes

Já o corante JDASPI tem aproximadamente o mesmo valor de rendimento quântico quando comparado com o corante MeDASPI, o que demonstra que alterações na cadeia lateral do grupo aceitador têm pouca influência na maneira como se liberta energia do estado excitado para o estado fundamental.

Por último, também se realizaram estudos com o recetor C2. Os rendimentos quânticos de MeDASPI e EtDASPI permaneceram semelhantes aos obtidos com o C1, o que demonstra que a alteração estrutural no cavitando não tem muita influência no processo de perda de energia e que novamente a alteração estrutural na amina afeta bastante o rendimento quântico.

2.5 Ensaios de Competição com C₁₂MeDASPI

O complexo ternário C₁₂MeDASPI foi utilizado para ensaios de competição com diversos competidores, para entender o fenómeno de dissociação da cápsula, mas também a capacidade de identificar diversos analitos orgânicos que não tenham características espectroscópicas visíveis, de modo a compreender se é possível desenvolver uma resposta colorimétrica e fluorescente quando na presença destes analitos. Os analitos escolhidos (Figura 2.40) apresentam características diferentes, desde carregados a neutros, alquílicos ou aromáticos, por forma a existir um leque de características que possam ter maior ou menor afinidade para o cavitando. A escolha do complexo C₁₂MeDASPI não foi aleatória, mas teve como fatores importantes o facto de ter uma constante de associação da cápsula relativamente baixa ($K_2 = 3.89 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) quando comparada com a constante de associação da meia cápsula. Também a sua elevada estabilidade quando sujeito a vários fatores externos como a temperatura, o pH e a força iónica foram importantes. Já o caso do complexo C₁₂EtDASPI é mais sensível ao pH, uma vez que o corante tem um pKa mais elevado, mas também o rendimento quântico é inferior e por isso o sinal na fluorescência não seria tão intenso.

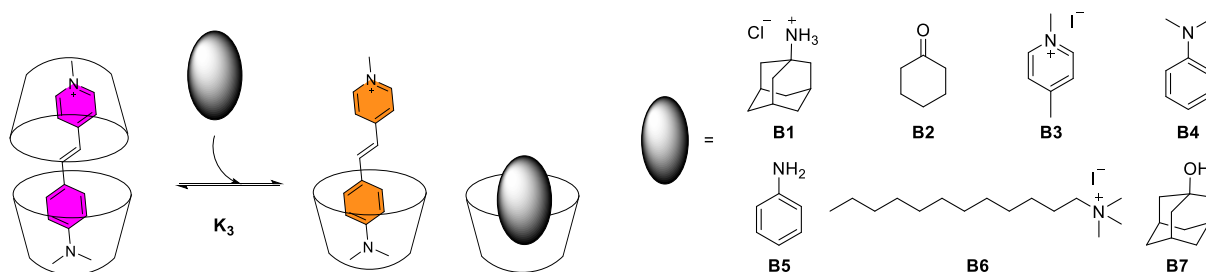


Figura 2.40 Esquema reacional do IDA com o complexo ternário C₁₂MeDASPI, na presença de um competidor. À direita encontram-se os competidores utilizados e numerados de 1 a 7

2.5.1 Cinética

2.5.1.1 Cinética associada à concentração

Inicialmente, constatou-se que existia uma cinética lenta associada ao processo de associação de um competidor ao cavitando, quando na presença da cápsula C₁₂MeDASPI. Para estudar este efeito, realizam-se testes com concentração fixa do complexo 2:1 e com concentrações diferentes de um competidor ao longo do tempo. Utilizou-se o hidrocloreto de

adamantanamina (B1), que pela literatura tem afinidade para o cavitando em estudo, tal como os restantes analitos.^{41,50,51,72} Embora esta interação já tenha sido reportada anteriormente, nunca foi reportado o seu comportamento cinético nem o seu estudo por espectroscopia de UV-Visível ou Fluorescência, apenas por ¹H RMN, visto que é um analito que não tem características espectroscópicas de relevo.

A cinética observada (Figura 2.41) consiste na diminuição de absorvância da banda a 485 nm, imediatamente após a adição do competidor, e aumento da absorvância da banda a 565 nm. A primeira banda é característica do complexo 1:1 recetor:corante e a banda com maior comprimento de onda característica do complexo 2:1. Como a titulação foi iniciada com o complexo na forma de cápsula completa dimérica, estes resultados indicam que, quando se coloca o competidor nesta solução, existe uma dissociação rápida do complexo 2:1 para se formar complexo 1:1 com o corante (banda a 485 nm) e com o competidor. No entanto, contrariamente ao que seria expectável, após a adição do competidor verifica-se uma regeneração lenta do complexo 2:1 C1:MeDASPI.

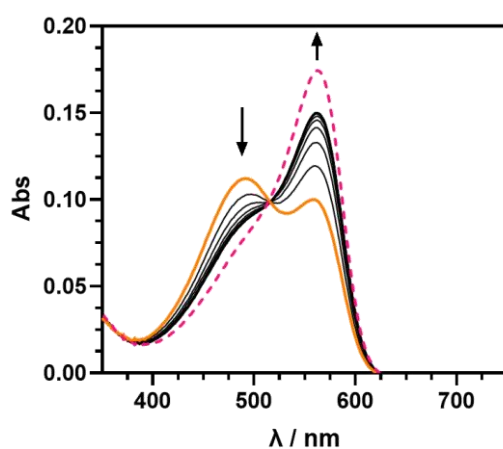


Figura 2.41 Espectro de UV-Visível da cinética de uma solução C₁₂MeDASPI (8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M respetivamente) quando adicionado 2.5×10^{-5} M de ciclohexanona (B2) à solução, em água, ao longo do tempo (minutos). Antes da adição corresponde ao espectro rosa a tracejado, após a adição de B2 corresponde ao espectro a laranja e no final do tempo obteve-se o espectro rosa a cheio. Os pontos experimentais a 565 nm encontram-se presentes ligados entre si para melhor compreensão

A hipótese mais plausível para a capacidade de regeneração da cápsula, é existir uma espécie inativa do cavitando livre que tem a capacidade de repor o equilíbrio pré-estabelecido, no sentido da formação da cápsula completa com o corante (Figura 2.42). Deste modo, a

dissociação competitiva da cápsula deve ser mais rápida que interconversão entre as formas ativas e inativas do cavitando.

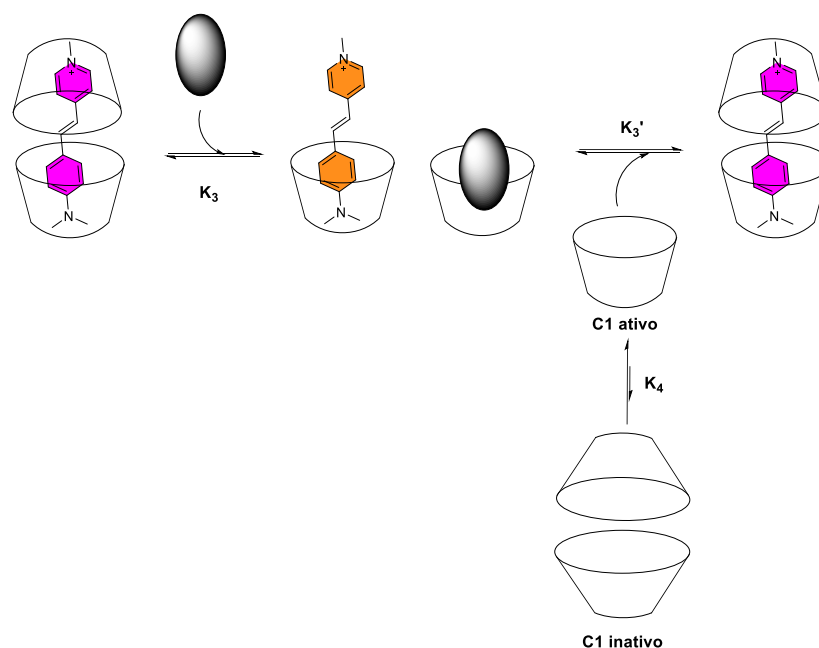


Figura 2.42 Esquema reacional da autorregeneração da cápsula: quando existe excesso da meia cápsula, uma forma inativa do cavitando transforma-se em cavitando ativo (K_4), que permite a encapsulação completa do corante (K_3')

Esta hipótese pode ser válida porque o espectro de RMN do cavitando livre em água deuterada, tem muitos sinais e muitos com pouca definição, o que sugere a presença de agregados e várias conformações envolvidas, como por exemplo a conformação aberta de papagaio (inativa), a qual neste solvente e sem a presença de analitos é altamente estabilizada. Caso exista um excesso de cavitando, muitas moléculas podem estar na conformação referida e depois de um estímulo, como é o caso da adição de um analito, repõe um novo equilíbrio (K_4 e K_3'). Por outro lado, o ensaio cinético a diferentes concentrações de adamantanamina (B1) (Figura A30a) ajudou a entender que a velocidade diminui à medida que se aumenta a concentração do competidor, ou seja, quanto maior a concentração do competidor, o sistema demora mais tempo a atingir uma situação de equilíbrio porque existem mais meias cápsulas para autorregenerar, e assim é preciso mais cavitando inativo se transformar em cavitando ativo e encapsular o corante para reestabelecer o equilíbrio das diferentes conformações. Como a cinética de autorregeneração é relativamente rápida para ser monitorizada por RMN, não foi possível analisar esta cinética através desta técnica para entender se a hipótese é realmente válida.

Desta forma, podemos realizar o paralelismo de que a rápida dissociação para se obter a meia cápsula pode ser considerado o produto cinético e a regeneração da cápsula pode ser assemelhado ao produto termodinâmico.

2.5.1.2 Cinética associada ao tipo de competidor

Nestes ensaios, as concentrações de C₁₂MeDASPI foram mantidas constantes (6×10^{-6} M e 1×10^{-4} M, respetivamente) e as concentrações de diferentes competidores (2.5×10^{-5} M) também foram constantes, de forma a não influenciar o ensaio. Nestas concentrações, a velocidade de autorregeneração do sistema é semelhante, com as exceções de: a dimetilanilina (B4), cuja cinética aparenta ser mais rápida; do dimetilpiridínio (B3), que não teve a capacidade de dissociar a cápsula; e a adamantanamina (B1) que parece ter uma velocidade de associação mais lenta. (Figura A30b)

A conclusão a que se pode chegar é que o competidor é um dos elementos que contribuem para a cinética lenta e que não parece existir uma relação entre a forma do competidor (tamanho, carga, aromaticidade) e a velocidade da regeneração do sistema.

2.5.2 Equilíbrio com Competidores

As soluções para o estudo das constantes de afinidade dos competidores foram realizadas em *batch*. A uma solução aquosa do complexo ternário C₁₂MeDASPI, foram adicionadas concentrações crescentes dos diferentes competidores, para se observar a capacidade de dissociação da cápsula. A titulação foi seguida por espectroscopia de UV-Visível e Fluorescência e para os diversos competidores obtiveram-se os espectros que se encontram em anexo (A.6), à exceção do competidor B5 e competidor B6, que servem como exemplo para os restantes competidores e serão discutidos com mais pormenor nesta secção. A absorção foi seguida a 565 nm e 485 nm e o ajuste foi realizado tendo em conta o equilíbrio de afinidade do corante para o cavitando, e também o novo equilíbrio estabelecido na presença de um competidor em solução. As equações utilizadas encontram-se na secção A.2.3.

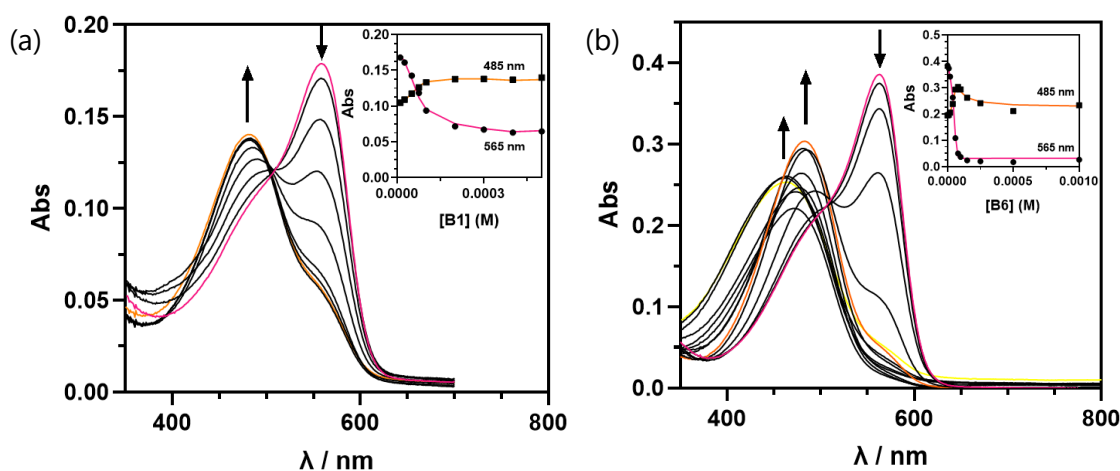


Figura 2.43 (a) Espectro de UV-Visível da titulação de uma solução de C₁₂MeDASPI (8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M respetivamente), quando adicionado concentrações crescentes de anilina (B5) à solução, em água. A titulação iniciou-se no espectro a rosa e terminou no espectro a laranja. (b) Espectro de UV-Visível da titulação de uma solução 2:1 C1:Me-DASPI (1×10^{-4} M e 8×10^{-6} M respetivamente) quando adicionado concentrações crescentes de iodeto de trimetil-dodecilamina (B6) à solução, em água. A titulação iniciou-se no espectro a rosa e terminou no espectro a amarelo. O tratamento dos dados com as respetivas cores dos máximos de absorção também está presente.

As conclusões iniciais quando se realizou o estudo de competição por absorvância é que todos os competidores têm a capacidade de dissociar a cápsula, porque observa-se o desaparecimento da banda a 565 nm (característica do corante encapsulado em 2 cavitandos), para dar lugar à banda a 485 nm proveniente do corante encapsulado num cavitando, ou seja, existe uma afinidade superior ao competidor do que a estabilidade da cápsula completa.

A exceção é o composto B3, o iodeto de 1,4-dimetilpiridínio. Este competidor é um dos precursores dos corantes DASPI e que por ¹H RMN é encapsulado sempre seletivamente em último lugar, quando na presença de excesso de cavitando. Se esta molécula não consegue dissociar a cápsula, significa que existe uma força adicional que favoreça a formação da cápsula completa que não a interação catião-π entre o corante e o interior aromático do recetor. Desta forma, confirma-se o papel importante das ligações de hidrogénio intermoleculares, realizadas pelas benzimidazolonas de ambos os cavitandos têm para o complexo 2:1.

Também foi utilizado outro competidor similar ao precursor dos corantes, a N,N-dimetilanilina (B4), que tem a capacidade de dissociar a cápsula e de dissociar quase por completo o sistema 1:1, quando em concentrações elevadas. Esta hipótese é observada pois há um desvio hipocrómico e hipocrómico do complexo 1:1 mas cujo máximo de absorção não está

completamente centrado a 450 nm (corante livre). Utilizou-se também um análogo da dimetil-anilina, a anilina (B5), tem uma afinidade menor. Isto indica que a anilina, provavelmente por ter hidrogénios com caráter mais hidrofílico e facilmente solvatados em meio aquoso, não tem tanta afinidade para o interior da estrutura hidrofóbica à custa da energia de desolvatação. Já a dimetil-anilina tem os hidrogénios dos metilos que são estabilizados pela interação CH- π com o cavitando e é uma molécula de caráter mais hidrofóbico.

No caso dos competidores com o esqueleto de adamantano, também existe uma ligeira diferença de afinidades, sendo a afinidade da adamantanamina 10 vezes inferior à do adamantol para a cavidade hidrofóbica. Como a amina se encontra carregada na gama de pH estudada, pode existir uma maior dificuldade de encapsulação de moléculas carregadas e por isso a constante de afinidade do adamantol, molécula neutra, é maior. Comparando a adamantanamina com outro competidor carregado, como o B6 que é um surfactante com uma longa cadeia hidrofóbica, este tem uma constante de afinidade superior porque adota a forma *gauche* dentro do recetor. A parte do B6 que se encontra dentro do cavitando é a longa cadeia alquílica devido à maior hidrofobicidade, em comparação com a amina carregada que se encontra fora do cavitando e é facilmente solvatada.

A fluorescência da dissociação também foi estudada, excitando a amostra no ponto isobéptico do processo de dissociação da cápsula, a 510 nm. Os espetros dos competidores B5 e B6 encontram-se abaixo e os restantes em anexo (Figuras A31 a A34). Foi possível entender que existe uma supressão da fluorescência com o aumento da concentração do competidor, relativo à dissociação do corante do cavitando, o que suporta os dados observados por espectroscopia de UV-Vis. Os dados foram tratados como anteriormente e as constantes encontram-se em concordância com o já observado, como pode ser consultado na tabela 5.

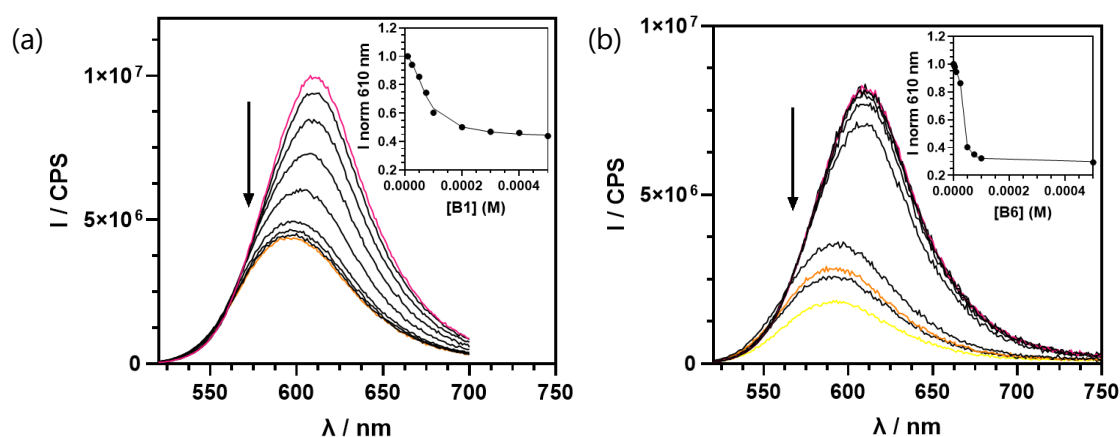


Figura 2.44 Espectro de Fluorescência da titulação de uma solução de C1₂MeDASPI (8×10^{-5} M e 6×10^{-6} M respectivamente) quando adicionado concentrações crescentes de (a) anilina (B5) ou (b) trimetildodecilanilina (B6) à solução, em água. A titulação inicia-se no espectro a rosa. O *ajuste* dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.

Para entender se este processo indireto de determinação da constante de associação do competidor é fidedigno, realizou-se a titulação dos competidores apenas com C1 e seguiu-se a sua banda de absorção a cerca de 300 nm. Novamente, realizou-se o ensaio em *batch* e a uma solução de cavitando (1×10^{-5} M) adicionaram-se concentrações crescentes dos compostos B1-B7 (à exceção daqueles que absorvem nessa zona espectral e impossibilitam a leitura correta das bandas do cavitando, sendo eles a anilina, dimetilanilina e iodeto de 1,4-dimetilpiridínio). A constante de afinidade foi obtida através das equações de um equilíbrio 1:1 presentes em A.2.1, em água. Os espectros de absorção da titulação para exemplificação com o competidor B6, encontra-se na figura 2.45 e os restantes na figura A35, nos anexos. Quando se titula o recetor com o analito, pode observar-se um desvio hipsocrómico da banda centrada a 300 nm para cerca de 290 nm, o que indica que existe uma alteração conformacional no cavitando e origina uma alteração na banda de absorção.

Na tabela 5 encontram-se os valores obtidos pela determinação direta e indireta do valor da constante de associação entre C1 e os competidores e é possível concluir que em todos os casos as constantes são semelhantes (na mesma ordem de grandeza), sendo independentes da técnica e por isso foi possível obter valores de constantes com rigor aceitável.

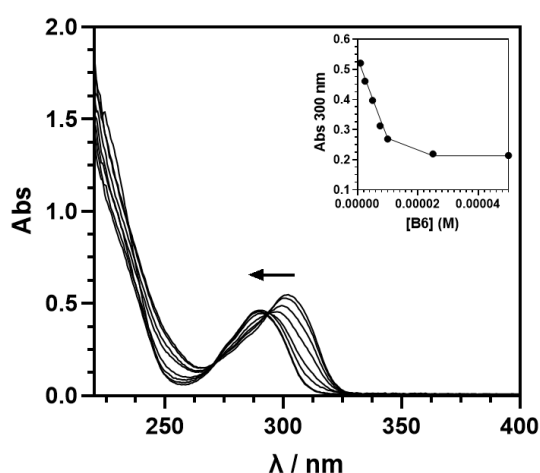
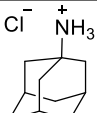

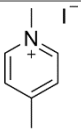
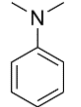
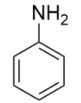
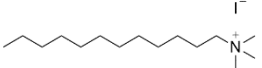
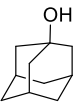


Figura 2.45 Espectro de UV-Visível da titulação de C1 (1.3×10^{-5} M), em água, com adição do competidor B6. Dados experimentais e dados calculados da titulação C1-B6 para o comprimento de onda fixo a 300 nm, em água

Todos os ensaios realizados são úteis para concluir que é possível utilizar este tipo de sistema para *Indicator Displacement Assays*, devido à capacidade de dissociação da cápsula e visto que existe alteração de cor e fluorescência do sistema. Foi possível também determinar indiretamente a afinidade dos competidores, através da dissociação do corante e do recetor. Embora não exista uma relação linear entre a afinidade de cada competidor e as suas características como o tamanho, a carga ou a solubilidade, é possível entender que este recetor é uma estrutura muito versátil pois consegue encapsular seletivamente diversos tipos de moléculas.

Tabela 5. Constantes de afinidade para os 7 diferentes competidores, obtidas através dos dados de absorvância e fluorescência, seja pelo modo direto ou pelo método indireto de IDA

ID	Competidor	Constante de afinidade (M^{-1}) Direta por UV-Vis	Constante de Afinidade (M^{-1}) por UV-Vis - IDA	Constante de Afinidade (M^{-1}) por Fluorescência - IDA
B1		$3.41 (\pm 0.31) \times 10^5$	2.61×10^5	1.40×10^5
B2		$8.79 (\pm 0.43) \times 10^6$	1.83×10^7	9.15×10^6

B3		-	-	-
B4		-	4.76×10^6	9.67×10^6
B5		-	1.53×10^4	2.80×10^4
B6		$2.11 (\pm 0.81) \times 10^7$	9.19×10^6	2.58×10^7
B7		$3.29 (\pm 0.73) \times 10^6$	3.85×10^6	2.62×10^6

2.6 IDA com Benzodiazepinas

Desta forma, pôde-se prosseguir para a detecção de uma molécula de interesse biológico e ambiental como a abordada no início deste trabalho: as benzodiazepinas.

2.6.1 Solubilização do analito – Influência de etanol e metanol

As benzodiazepinas não são solúveis em água, por isso foi necessário adicionar um co-solvente à solução aquosa para ultrapassar este problema. Para tal, utilizou-se primeiramente metanol e utilizando técnicas de espectroscopia, constatou-se que a solubilidade máxima possível para uma solução de 1 mM de BZD1 (concentração média de API por comprimido dissolvido em 2.5 mL) era em 5% MeOH e 95% H₂O. Embora a quantidade de metanol seja baixa, é necessário entender se tem alguma influência na afinidade do sistema C1-MeDASPI. As constantes foram calculadas em lote, mantendo fixa a concentração de corante MeDASPI e alterando a concentração de cavitando C1. Os dados foram tratados de igual forma como feitos anteriormente para soluções totalmente aquosas (equações A13 a A16) e, os espectros de absorção, emissão e respetivo ajuste encontram-se na figura A36.

Em ambas as titulações é possível entender que o comportamento do corante e do cavitando em solução não é consideravelmente afetado com a presença de um solvente orgânico como o metanol, apenas existe diferença a nível das constantes de afinidade. As constantes obtidas em 5% MeOH encontram-se na tabela 6 e parecem ser ligeiramente mais baixas (menos de uma ordem de grandeza de diferença) que as constantes obtidas apenas em água, ou seja, há uma diminuição da afinidade na presença do metanol, porque o metanol pode competir com a cavidade do cavitando, uma vez que é menos hidrofílico que a água.

Tabela 6. Comparação das constantes de afinidade K_1 e K_2 com o recetor C1 e o corante MeDASPI

% Solvente	5% MeOH : 95% H ₂ O		100% H ₂ O	
	UV-Vis	Fluorescência	UV-Vis	Fluorescência
K_1 (M ⁻¹)	-	4.45x10 ⁵	-	3.87x10 ⁶
K_2 (M ⁻¹)	2.15x10 ⁴	1.04x10 ⁴	3.03x10 ⁴	4.75x10 ⁴

Numa situação real a que gostaríamos de aplicar este tipo de sensor, o solvente é composto por uma mistura de etanol e água, por isso realizou-se uma titulação de etanol com o sensor C1₂MeDASPI com concentração fixa, seguida por absorção (Figura A37). O que se observou foi uma maior afinidade do etanol para a cavidade: com 0.5% de etanol já existe dissociação da cápsula e a dissociação é total com 15% de etanol. Foi possível obter a constante de afinidade do etanol com o cavitando C1 pelo mesmo método matemático que anteriormente realizado para os competidores, cujo valor foi de $2.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, numa solução aquosa. Este valor é bastante próximo da constante K_2 de formação da cápsula de C1 com MeDASPI ($3.89 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) e deve-se ao facto de o etanol, por ser menos polar e ter uma cadeia alifática, tem afinidade para a cavidade hidrofóbica. A força motriz associada a retirar moléculas de água da cavidade para albergar uma molécula alifática e que até pode realizar interações não covalentes atrativas (ligação CH- π) é muito mais favorável.

Este resultado põe em causa a capacidade deste recetor ser sensível ao analito em estudo, porque o próprio co-solvente é um interferente. A %v/v que uma bebida alcoólica pode ter varia de 3% a 50% e mesmo diluindo a amostra, a dissociação pode ter uma extensão apreciável, desta forma este tipo de sensores baseados em cavitandos não pode ser utilizado para já para a aplicação pretendida, sendo necessária alguma engenharia do sensor.²⁵

Ainda pode ser possível utilizar este sensor, conjuntamente com um sensor seletivo para o etanol, ou por exemplo para outras aplicações, nomeadamente para o controlo em aeroportos, em controlo de antidepressivos em estações de tratamento de água, entre outras possíveis aplicações.

2.6.2 Ensaio de competição de BZD1

O próximo passo foi titular uma solução de C1₂MeDASPI ($[\text{MeDASPI}] = 4 \times 10^{-6} \text{ M}$ e $[\text{C1}] = 8 \times 10^{-5} \text{ M}$) em 5% MeOH, onde se aumentou a concentração de BZD1 (desde 1 μM a 1 mM), para entender a capacidade que este analito tem para competir com o sistema e dissociar a cápsula, alterando assim o sinal do sensor. A titulação foi realizada em *batch* e estudada através de fluorescência e UV-Vis e os espetros podem ser consultados na figura 2.46.

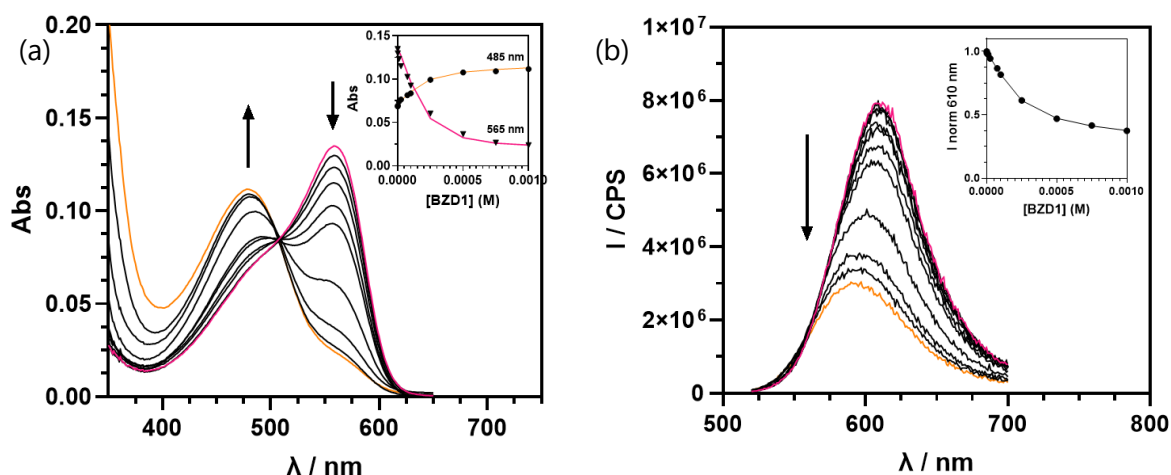


Figura 2.46 (a) Espectro UV-Visível da titulação de uma solução de $C_{12}MeDASPI$ ($[MeDASPI]=4 \times 10^{-6}$ M e $[C1]=8 \times 10^{-5}$ M) quando adicionado concentrações crescentes de BZD1 à solução aquosa com 5% MeOH. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. (b) Espectro Emissão ($\lambda_{ex}=510$ nm) da titulação de uma solução de $C_{12}MeDASPI$ ($[MeDASPI]=4 \times 10^{-6}$ M e $[C1]=8 \times 10^{-5}$ M) quando adicionado concentrações crescentes de BZD1 à solução aquosa com 5% MeOH. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do competidor também se encontra presente.

Os resultados obtidos através da titulação do sensor com o princípio ativo nordiazepam (BZD1), foram positivos, uma vez que foi possível alterar o sinal aquando da adição deste competidor, o que indica que existe afinidade do corante para cavidade do cavitando. Mesmo com concentrações na ordem do μM , foi possível observar espectralmente uma alteração na absorvância e na fluorescência devido à dissociação do complexo $C_{12}MeDASPI$. Os dados experimentais foram analisados de acordo com as equações dos ensaios de competição (Apêndice A.2.3) e foi possível obter uma constante de associação entre o cavitando C1 e a benzodiazepina em estudo. A constante obtida por absorvância foi de $3.21 \times 10^4 M^{-1}$ e por emissão foi de $2.25 \times 10^4 M^{-1}$, o que significa que os resultados observados para ambas as técnicas são concordes. Desta forma e perante os dados atuais, a constante aparente de associação pode ser considerada através de uma média ponderada entre os valores, correspondendo a $2.73 (\pm 0.5) \times 10^4 M^{-1}$, em 5% MeOH. Este valor, embora não seja muito elevado quando comparado com outros competidores que já foram estudados ao longo deste trabalho, é um passo relevante pois é o primeiro quimiossensor para este tipo de moléculas a ser descrito.

A constante de afinidade da BZD1 é da mesma ordem de grandeza da afinidade do etanol para o mesmo recetor. Num exemplo prático de uma bebida de 200 mL com teor de 5% de

álcool significa que a concentração do etanol é de cerca de 0.82 M, já a concentração de BZD1 (comprimido de 5 mg) seria de 0.07 mM. Com estas concentrações o recetor iria encapsular mais rapidamente o etanol por estar 10^4 vezes mais concentrado, originando um sinal falso positivo.

2.6.3 LoD e LoQ

Segundo a IUPAC o limite de deteção é a quantidade ou concentração mínima que pode ser medida através de uma determinada técnica, com uma determinada confiança. A confiança para cada processo tem várias variáveis que precisam de ser acauteladas, como o caso do aparelho que se utiliza, o nível de confiança que se pretende e a sensibilidade do sensor.⁷³

A concentrações baixas de BZD1 na presença do sensor C₁₂MeDASPI, o comportamento da curva de titulação é semelhante a uma regressão linear do tipo: $y = mx + b$, em que m é o declive da curva, que está diretamente relacionado com a sensibilidade do método. Quanto maior o valor de m , maior a sensibilidade, porque existe uma grande variação do sinal para variações de concentração baixas (valores de x).

Outro fator a ter em conta é a sensibilidade da técnica utilizada. Neste caso, a espectroscopia de UV-Visível e Fluorescência tem de ser capazes de variar o sinal com a menor alteração de concentração possível. O ruído do aparelho pode alterar bastante a medição do sinal, por isso é necessário realizar medições dos ensaios a branco com várias soluções de C₁₂MeDASPI, para obter o erro dessa medida, que é expresso no desvio padrão, σ :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_n - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.5)$$

Matematicamente, corresponde ao somatório de todas as medidas realizadas ($n > 5$) e subtraindo pelo valor médio de todas as medições do branco do sensor, neste caso em 5% MeOH.

Por fim, é necessário ter em conta o nível de confiança que se pretende obter e, por convenção, estipulou-se que se x estiver 3σ de distância do valor médio, a área do sinal de x não será menor que 0.0013 (caso tenha uma distribuição normal). Assim, há uma chance de 0,13% de que um sinal medido em x seja o resultado de uma flutuação aleatória do sinal em branco.⁷⁴

Tendo em conta todos os fatores apresentados, obtém-se a fórmula do cálculo do limite de deteção:

$$LoD = \frac{3\sigma}{m} \quad (2.6)$$

O limite de quantificação é a concentração mínima com que se consegue obter um valor confiável/mensurável, e por isso tende a ser maior que a sensibilidade de apenas se obter um sinal detetável. Assim, a equação passa a ser:

$$LoQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (2.7)$$

Na tabela 7 estão sumarizados os valores de LoD e LoQ para as técnicas de Espectroscopia de UV-Visível e Fluorescência.

Tabela 7. Valores de LoD e LoQ do sensor C1₂MeDASPI para BZD1 através de duas técnicas de espectroscopia.

	LoD (µM)	LoQ (µM)
Espectroscopia de Absorção	61.5	114
Espectroscopia de Fluorescência	53.3	124

2.6.4 Caracterização ¹H RMN C1-BZD1

Para entender com mais detalhe a interação do analito BZD1, realizaram-se estudos através de ¹H RMN, iniciando-se com uma solução de 0.5 mM de BZD1 em 5% MeOD e 95% D₂O, que foi titulada com uma solução 5 mM de C1 no mesmo solvente deuterado.

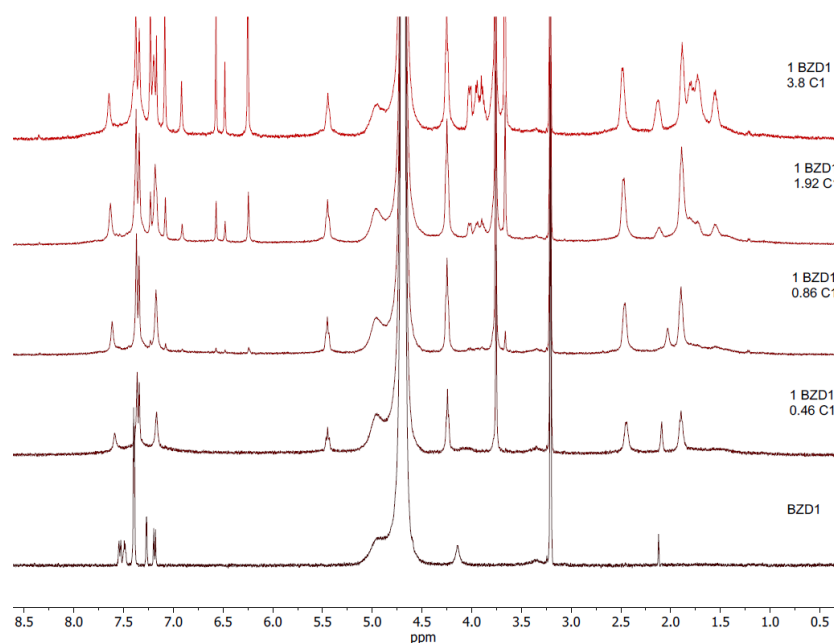


Figura 2.47 Titulação seguida por ^1H RMN de BZD1 (0.5 mM) titulado com C1 em 5:95 MeOD:D₂O. De baixo para cima aumenta a concentração de C1

Com o aumento da concentração de cavitando, era de esperar que a encapsulação do analito originasse o desvio dos seus sinais para campo alto, como foi observado para os corantes, mas neste caso observou-se o desaparecimento de muitos sinais da BZD1 e o aparecimento de alguns com aspeto alargado. A encapsulação dos corantes aparenta ser um processo lento na escala de tempo de RMN, mas neste caso parece que estamos perante um estado intermediário na escala de tempo do desvio químico do RMN. Este fenómeno já foi previamente observado com alcanos de cadeia C8 sem substituintes, porque toda a molécula tem afinidade para a cavidade e por isso não existe uma única orientação do substrato ou hóspede (analito). Assim, o alcano roda (*tumbles*) rapidamente na escala de tempo do RMN dentro da cavidade do hospedeiro. O resultado deste movimento é uma média das ressonâncias dos prótons do alcano que experienciam vários ambientes químicos diferentes.^{75,44}

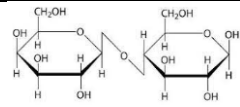
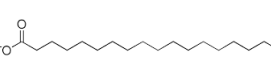
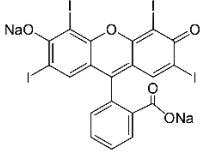
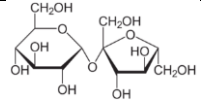
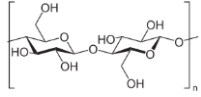
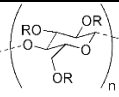
Desta forma, se a benzodiazepina não é encapsulada de forma seletiva pode indicar que se encontra constantemente num processo de saída e entrada da cavidade, e apenas se observa uma média da ressonância dos diversos sinais do cavitando. Contudo, é possível determinar que existe encapsulação deste analito, devido à presença do sinal característico da conformação em vaso quando se adiciona o recetor à BZD1 (H4 a 5.45 ppm). Quando se adiciona um excesso de cavitando à mistura, começam a aparecer os sinais característicos do cavitando na forma de velcrando, o que indica que a encapsulação do analito corresponde a um equilíbrio 1:1. A identificação dos prótons neste caso não pode ser realizada devido à complexidade do espetro obtido.

Também se adquiriu um espetro de ^1H RMN com o cavitando 2 e BZD1 em quantidades equimolares, mas uma vez mais o espetro apresenta os sinais com o mesmo comportamento e, por isso, a alteração estrutural que se realizou em C2 não influencia o comportamento.

2.6.5 Influência de Excipientes

Para testar o sensor obtido numa situação real em que o analito se encontra na forma de um comprimido, é necessário saber se os excipientes das tabletes de comprimidos têm afinidade com o cavitando.

Tabela 8. Lista de excipientes presentes nos comprimidos a testar com as respetivas informações relevantes

ID	Excipiente	Fármaco	Estrutura	Solubilidade	[E] (mM)
E1	Lactose	Alprazolam, Clonazepam		Solúvel	8
E2	Estearato de sódio	Alprazolam, Clonazepam		Pouco solúvel	0.08
E3	Eritrosina	Alprazolam		Solúvel	1
E4	Óxido de Ferro	Alprazolam	Fe ₂ O ₃	Insolúvel	10
E5	Sacarose	Diazepam		Solúvel	15
E6	Celulose	Clonazepam		Solúvel	10
E7	Carboximeti- lamido sódico	Alprazolam	 R = H or CH ₂ CO ₂ H	Pouco Solúvel	0.1

Se existir uma molécula que compita com o corante para a cavidade do cavitando, estamos perante um caso de um interferente que possa erradamente dar um sinal positivo. Para tal, reuniram-se vários excipientes presentes nos comprimidos: Diazepam, Alprazolam e Clonazepam, como se encontra na tabela 8, e que foram numerados de 1 a 7.

À solução de excipientes com a concentração apresentada na tabela anterior, em 10% MeOH, adicionou-se 100 uL da solução aquosa da cápsula de C₁₂MeDASPI ([C₁]=1x10⁻⁴ M e [MeDASPI]=8x10⁻⁶ M) e numa solução aquosa com 10% MeOH realizou-se o controlo (procedimento presente em 5.2.2.5). As soluções foram caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis para entender a possível interferência no IDA. Os espectros de UV-Vis dos excipientes e da solução controlo encontram-se na figura 2.48.

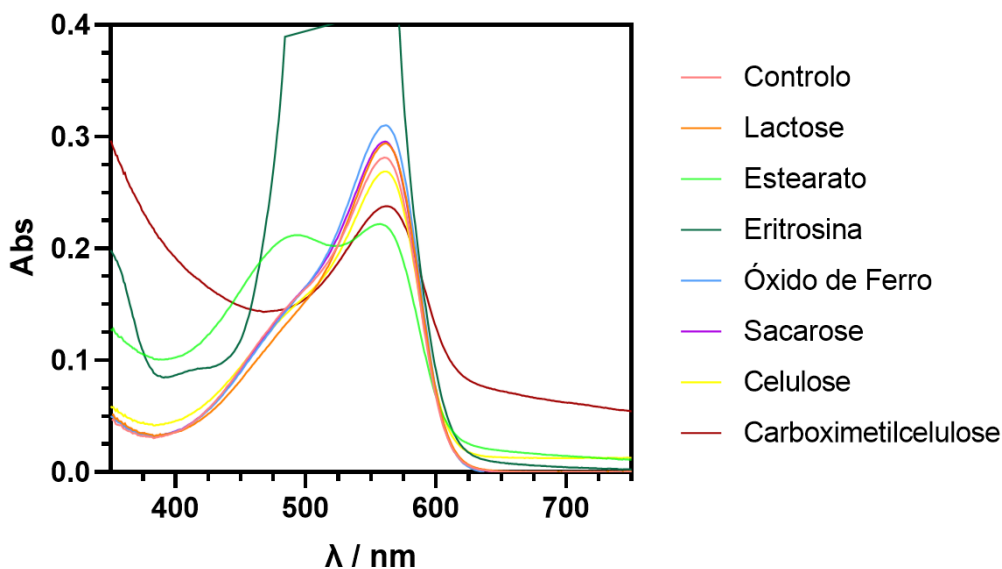


Figura 2.48 Espectro de UV-Vis do composto C₁₂MeDASPI ([C₁] = 1x10⁻⁴ M e [MeDASPI] = 8x10⁻⁶ M) na presença de 7 excipientes diversos numa solução aquosa com 10% MeOH, com as concentrações presentes na tabela 7

Ao observar o espectro de absorção da solução de C₁₂MeDASPI na presença de excipientes, é possível constatar que os excipientes como a lactose, óxido de ferro, sacarose e celulose não têm influência significativa no espectro, por isso pode-se concluir que não têm afinidade relevante para o recetor. Isto deve-se ao facto de moléculas, como a lactose, serem altamente solúveis, graças aos seus grupos hidroxilo que tornam a molécula hidrofílica, e também devido ao tamanho elevado, que impede a entrada em cavidades relativamente pequenas como as do cavitando. Por outro lado, moléculas como o óxido de ferro, que não são solúveis em água, não têm quaisquer influências com o sensor.

Já o estearato de magnésio, E2, alterou o sinal do sensor C₁₂MeDASPI, dissociando parcialmente a cápsula, indicando que este composto tem afinidade para o cavitando. A sua cadeia hidrofóbica tende a estar mais estabilizada num ambiente igualmente hidrofóbico, como o da cavidade do cavitando. Este composto apresenta baixa solubilidade na solução aquosa (0.085 mM), pelo que o sinal obtido foi o máximo de dissociação possível.

No caso da eritrosina, E3, como o seu máximo de absorção se situa a cerca de 530 nm é um interferente no sinal do sensor, pois absorve na mesma zona espectral e impossibilita a leitura correta do sinal do sensor, caso haja um competidor presente.

Por último, a carboximetilcelulose de sódio, faz com que a solução do sensor forme uma dispersão rosa. O máximo de absorção parece não alterar o que indica que possa não haver interação competitiva entre o excipiente e o complexo, mas parece existir alguma interação que precipite a cápsula. Este excipiente é um polieletrólito com várias cargas negativas espalhadas pela sua superfície e podem interagir com os grupos solubilizantes do cavitando, que são catiónicos e esta interação pode causar a precipitação do cavitando com o polímero (Figura 2.49).

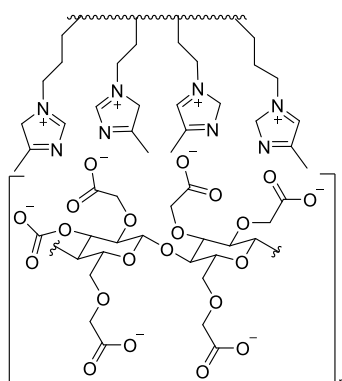


Figura 2.49 Estrutura proposta para a interação entre o polieletrólito E7 e o cavitando C1

As imagens de cada solução de interferente e a solução controlo, com luz ambiente e com luz UV 366 nm, com o sensor encontram-se presentes na figura A38. Este estudo pretende ser apenas qualitativo, uma vez que não existe informação disponibilizada para as concentrações de cada excipiente em cada comprimido.

2.6.6 IDA com comprimidos de Benzodiazepinas

O sistema de IDA utilizado até agora, foi testado em comprimidos de diferentes benzodiazepinas para entender se na presença de todos os excipientes e com a massa presente de cada API, é possível ter um sinal detetável em solução.

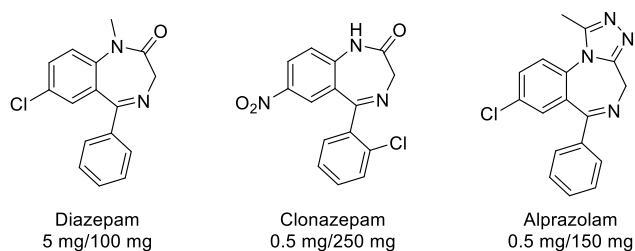


Figura 2.50 Estrutura molecular do princípio ativo presente em cada comprimido de benzodiazepina

Para tal, utilizaram-se comprimidos de Alprazolam (0.5 mg), Clonazepam (0.5 mg) e Diazepam (5 mg) que foram solubilizados em 10% de MeOH (para aumentar a solubilização do API), de acordo com o procedimento presente na secção 4.2.2.6. Os espectros de absorção e de fluorescência são apresentados na figura 2.51a e 2.52a e as fotografias que acompanham cada estudo.

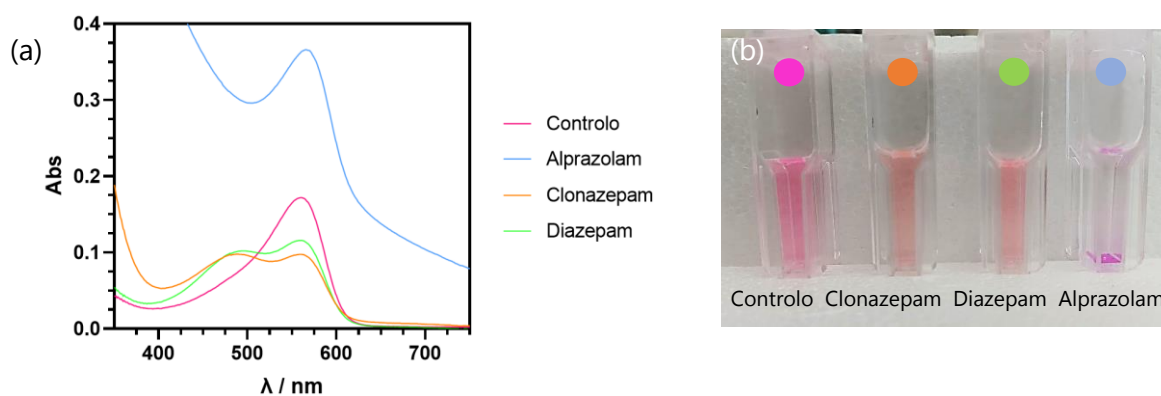


Figura 2.51 (a) Espectro UV-Vis das soluções de comprimidos de benzodiazepinas juntamente com um ensaio controlo. (b) Registo fotográfico das soluções obtidas de benzodiazepinas com o IDA, em 10% MeOH ([Me-DASPI= 6×10^{-6} M e [C1]= 8×10^{-5} M)

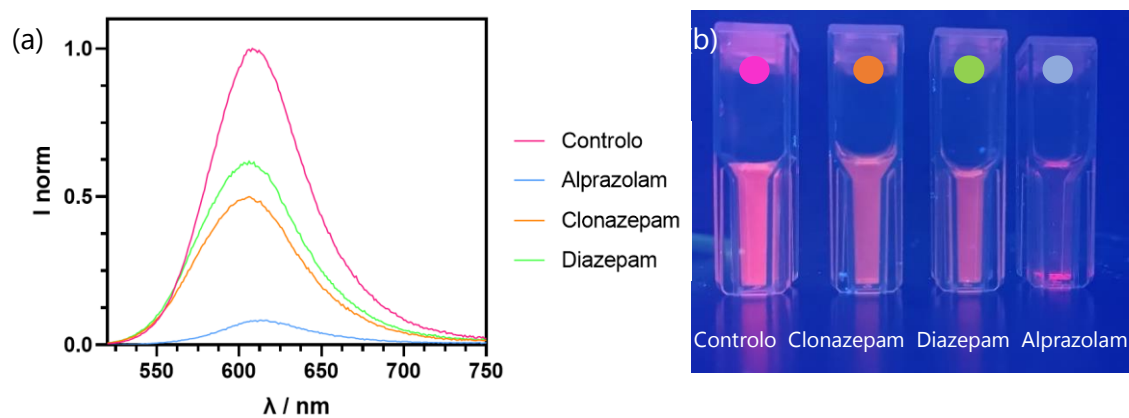


Figura 2.52 (a) Espectro de Emissão das soluções de comprimidos de benzodiazepinas juntamente com um ensaio controlo, quando excitado a 510 nm. (b) Registo fotográfico das soluções obtidas de benzodiazepinas com o IDA, em 10% MeOH ($[MeDASPI]=6 \times 10^{-6}$ M e $[C1]=8 \times 10^{-5}$ M), sob uma lâmpada a 366 nm

Rapidamente se pode observar que tanto o clonazepam como o diazepam têm alguma molécula na sua composição com afinidade para a cavidade do cavitando, pois conseguiram dissociar a cápsula dimérica por complexação competitiva.

Pode-se observar que a dissociação da cápsula não é total, pois existem dois máximos de absorção, correspondentes à cápsula e à meia cápsula com o corante no seu interior. No caso da fluorescência, quando são testados estes dois comprimidos observa-se uma supressão parcial da fluorescência, devido à diminuição da concentração do complexo $C1_2MeDASPI$, responsável pela fluorescência do controlo. A perda de fluorescência no caso do diazepam e do clonazepam foi de cerca de 40-50%, o que corresponde a uma variação considerável, como é possível comprovar pela figura 2.52b. No caso do clonazepam, que tem na sua composição o interferente estearato de magnésio, não é possível atribuir na totalidade a alteração de sinal colorimétrico e de fluorescência apenas à benzodiazepina, pois existe este excipiente presente e interfere no processo de deteção do API (tal como referido na secção 2.6.5).

Já o caso do alprazolam teve uma resposta diferente, uma vez que quando é adicionado o sensor à solução do comprimido, a solução começou a ficar com cor roxa e turva. Este fenómeno pode ser explicado pela presença do excipiente carboximetilcelulose, que precipita o cavitando, o que é igualmente observável a olho nu (figure 2.52b).

A concentração correspondente ao comprimido de diazepam foi de 7 Mm, em solução aquosa com 10% MeOH. Com esta concentração e tendo em conta as concentrações de BZD1 utilizadas no IDA (subcapítulo 2.6.2) era espectável que a dissociação do complexo 2:1 fosse total, uma vez que o nordiazepam (BZD1), que foi estudando com pormenor e com uma estrutura muito semelhante ao diazepam, alterou o sinal do IDA com concentrações 10x inferiores. O que pode significar que a constante de afinidade para este analito é mais baixa ou que a solubilização do API não foi total, porque existem excipientes cujo objetivo é diminuir a biodisponibilidade do API para existir uma libertação mais controlada desde fármaco pelo corpo humano. Caso o problema seja a afinidade mais baixa que o esperado, pode indicar que o local de interação fármaco-recetor pode corresponder ao local em que existe uma mudança

estrutural entre ambos os compostos, que é na amida. A metilação da amida, no caso do diazepam, pode influenciar não só a solubilidade, mas também a interação com a cavidade do cavitando.

Estes resultados não deixam de ser encorajadores uma vez que foi possível obter alteração de sinal por parte do quimiossensor na presença deste tipo de analitos que não possuía um quimiossensor deste género na literatura, ficando também demonstrado o potencial deste IDA para a deteção de BZDs em amostras reais.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho iniciou-se pela síntese de recetores, que foram utilizados para a deteção de benzodiazepinas: o cavitando. Esta síntese foi bem-sucedida e foi possível sintetizar dois recetores diferentes. Também foi necessário sintetizar alguns analitos como o caso de corantes e um análogo de benzodiazepina.

De seguida, procedeu-se à caracterização do sistema recetor:analito com os cavitandos sintetizados e três corantes da classe das estiríl cianinas. Em todos os casos, o sinal da unidade sinalizadora era ratiométrico quando acompanhado por UV-Visível e do tipo *turn-off*, quando estudado por espectroscopia de emissão, devido ao aumento considerável da fluorescência. A constante de afinidade para o complexo binário em todos os casos ronda os 10^6 M^{-1} . No caso do cavitando C1 com os corantes MeDASPI e EtDASPI, foi possível obter a encapsulação completa com duas unidades recetoras, formando um sistema ternário, com uma afinidade de 10^3 a 10^4 M^{-1} e elevados rendimentos quânticos de fluorescência de 0.49 e 0.18, respetivamente. Devido às características satisfatórias do corante totalmente encapsulado, utilizou-se o mesmo para os ensaios de substituição da unidade sinalizadora. Utilizaram-se 7 competidores diferentes: carregados, neutros, alifáticos ou aromáticos e os resultados foram positivos na maioria dos casos: foi possível dissociar a cápsula e obter uma alteração de cor e fluorescência mensurável. Nestes ensaios foi possível observar uma cinética lenta associado ao processo de autorregeneração da cápsula, graças a uma alteração conformacional do cavitando livre, tornando-o ativo e com capacidade de encapsular completamente o corante.

As benzodiazepinas foram sujeitas aos mesmos ensaios de competição com o mesmo sistema e foi possível obter uma resposta colorimétrica e fluorescente satisfatória. A afinidade para uma benzodiazepina sintetizada foi de $2.73 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, com um LoD de $53 \mu\text{M}$ e LoQ de $124 \mu\text{M}$, em 5% metanol.

Como por norma estas substâncias se encontram na forma de comprimido, testaram-se os excipientes de três benzodiazepinas comerciais: Diazepam, Alprazolam e Clonazepam. Alguns excipientes tinham ação comprometedora para o sensor: o carboximetilcelulose de sódio precipita a cápsula e o estearato de magnésio possui alguma afinidade para com a cavidade hidrofóbica, mas apresenta baixa solubilidade. Desta forma, quando se testou o sensor numa solução com comprimidos, obtiveram-se dois sinais positivos: o Clonazepam e o Diazepam, enquanto no caso do Alprazolam há precipitação da cápsula devido à presença do excipiente previamente enunciado.

Por último, quando se procedeu a um ensaio numa matriz alcoólica com etanol obteve-se um sinal falso positivo, pois o álcool tem afinidade para o recetor. Assim, este tipo de ensaios em bebidas alcoólicas fica comprometido devido a esta interação indesejada.

Pode-se concluir que o objetivo deste trabalho, que era sintetizar e caracterizar um sensor para as benzodiazepinas com resposta fluorescente, foi alcançado com sucesso, tendo sido feito um estudo exaustivo do melhor sensor e do respetivo comportamento.

Futuramente, o sistema recetor:corante apresentado neste trabalho precisa de ser estudado com mais cuidado, para estabelecer de forma mais inequívoca todos os equilíbrios possíveis, utilizando outras técnicas espectroscópicas e também entender de forma mais clara a cinética do processo de associação.

Para a aplicação desejada, que seria o estudo da adulteração de bebidas alcoólicas, não vai ser possível utilizar o sensor desenvolvido num futuro próximo, pois ainda precisa de mais engenharia, mas pode-se testar a sua aplicabilidade em matrizes aquosas, como por exemplo para deteção de contrabando destas substâncias, da sua presença em estações de tratamento de águas, entre outras possibilidades. Uma forma de contornar esta problemática seria desenvolver um recetor supramolecular com afinidade para as benzodiazepinas, mas não para moléculas como o álcool ou ter um sensor que primeiro sequestre o etanol e posteriormente deixar o recetor livre para interagir com o analito de interesse.

Para terminar este trabalho seria interessante utilizar mais benzodiazepinas, tanto na forma pura como na forma de comprimido, para ser possível generalizar as várias classes das benzodiazepinas e explorar a diferença da associação entre ambas as unidades.

Futuramente, seria curioso testar estes recetores para outras substâncias ilícitas como por exemplo: escitalopram, paroxetina ou sertralina para obter um sensor de antidepressivos universal para a rápida deteção.

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Síntese

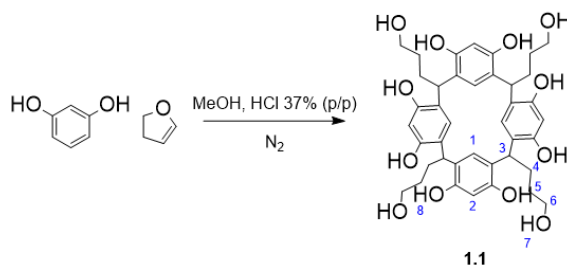
4.1.1 Considerações Gerais

Os solventes foram adquiridos comercialmente e quando necessário foram secos através das técnicas de secagem de solventes standard.⁷⁶ Quando utilizado aquecimento e agitação, utilizaram-se placas *VWR C4 Adv.* Para massas superiores a 100 mg utilizou-se a balança *Metler PK 300* (300 ± 0.001 g) e, para massas inferiores, utilizou-se a balança *Sartorius Research R200S* (200 ± 0.00001 g). Os solventes foram evaporados num rotavapor *BUCHI*. Para homogeneização de soluções utilizou-se o banho termostatizado *HelmaSonic S-100H*. Quando necessário, utilizou-se a centrifugadora *DM0412 Lan Techniques* com 4500 rpm e entre 5-10 minutos, com tubos *Falcon* com capacidade para 15 mL.

As reações foram controladas através da técnica de cromatografia de camada fina (TLC – *Thin Layer Chromatography*), em placas de sílica gel 60 Å F254 com suporte em alumínio e de fase normal (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV 254 nm - espessura de 0,20 mm). As purificações foram realizadas através de colunas cromatográficas, do tipo *flash* de fase normal, utilizando sílica 60 Å, 40-63 Å μ , com fluxo de ar comprimido.⁷⁷

4.1.2 Síntese de Cavitandos

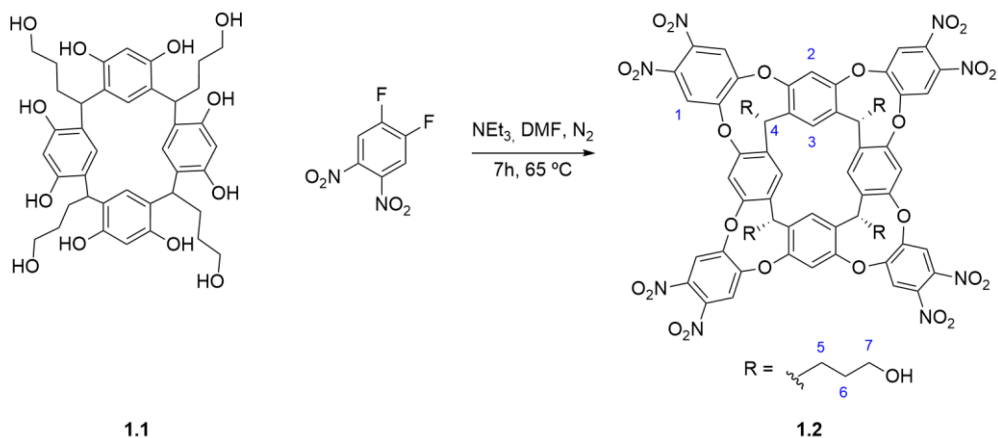
4.1.2.1 Síntese de tetra(hidroxipropil)calix[4]resorcinareno (1.1)



A um balão de 500 mL, foi adicionado 96 mL de metanol e foi colocado num banho de gelo para posteriormente ser adicionado 24 mL de ácido clorídrico 37% (p/p) lentamente e sob agitação. Adicionou-se o resorcinol (20 g, 182 mmol, 1 eq.) e a solução foi deixada a agitar, a 0 °C, até todo o conteúdo estar dissolvido, o que originou uma solução acastanhada. Realizou-se a desgaseificação do solvente começando inicialmente por criar uma atmosfera inerte no balão e de seguida mergulhou-se a seringa com N₂ no solvente durante 30 minutos e a 0 °C. Depois deste passo, adicionou-se o 2,3-dihidrofurano (13,8 mL, 182 mmol, 1 eq.) gota a gota durante 2 horas. A solução foi deixada aquecer e de seguida colocou-se o balão a 50 °C, sob atmosfera de azoto e agitação durante 6 dias, sendo o seu aspeto uma pasta amarelada. A mistura foi deixada arrefecer para de seguida ser filtrada a vácuo com 2x30 mL de água destilada a 0 °C. O precipitado esbranquiçado foi transferido para um balão onde se dissolveu em 800 mL de água destilada a 0 °C e colocado nos ultrassons durante 1 hora para dilacerar os agregados. Novamente, foi realizada uma filtração a vácuo e o precipitado foi lavado com 2x30 mL de água destilada a 0 °C. O precipitado foi transferido para um balão onde se adicionou 100 mL de THF e com o auxílio do rotavapor, com o banho a 65 °C, o pó branco dissolveu-se e obteve-se uma solução castanha límpida que foi evaporada para se obter um sólido esbranquiçado com um rendimento de 88% (28.72 g).

¹H RMN (400 MHz, DMSO, 298 K): δ 8,89 (s, 8H, H-8); 7,22 (s, 4H, H-1); 6,14 (s, 4H, H-2); 4,19 (t, 7,8 Hz, 4H, H-3); 3,41 (t, 6,7 Hz, 8H, H-6); 2,08 (q, 7,4 Hz, 8H, H-4); 1,33 (q, 8 Hz, 8H, H-5).

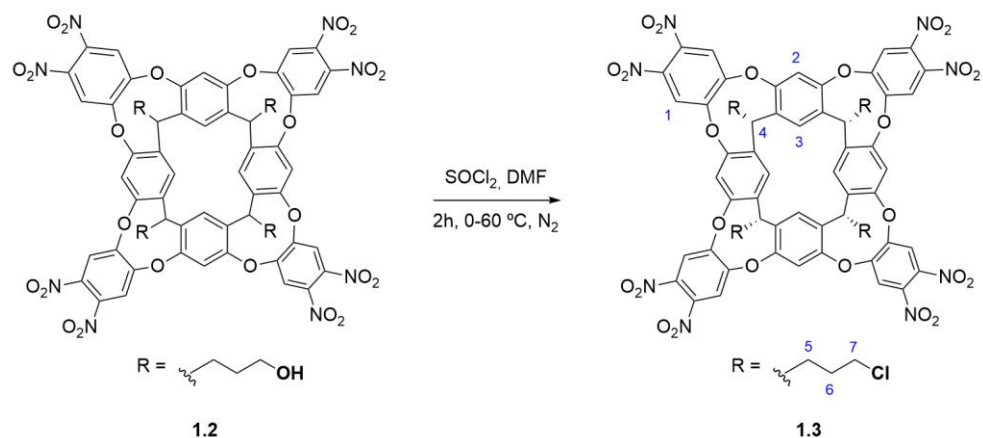
4.1.2.2 Síntese de tetra(hidroxipropil)octanitrocavitando (1.2)



A um balão de 250 mL com um agitador magnético, foram adicionados os compostos no estado sólido: resorcin[4]eno 1.1 (4,42g; 6,13 mmol, 1 eq.) e o 1,2-difluoro-3,4-dinitrobenzeno (5g, 24,5 mmol, 4 eq.). O balão foi purgado para realizar a reação numa atmosfera inerte de N₂ e com auxílio de uma seringa adicionou-se 90 mL de N,N'-dimetilformamida, seco previamente. A trietilamina (8,5 mL; 61,3 mmol; 10 eq.) foi adicionada com auxílio de uma seringa e a solução passou de laranja brilhante a castanho-escuro. A reação permaneceu durante 7 horas a 65 °C, com agitação constante e sob atmosfera de azoto. Terminado este tempo a solução arrefeceu e realizou-se uma microdestilação de solventes com recurso a vácuo para remover o DMF. Obteve-se um sólido laranja ao qual se adicionou 100 mL de metanol. Para facilitar a suspensão do sólido utilizou-se os ultrassons durante 10 minutos e de seguida realizou-se uma montagem de filtração a vácuo para isolar um pó amarelo. Este sólido foi transferido para um balão de 250 mL, juntamente com 80 mL de metanol e um agitador magnético para que se deixasse a agitar durante 1 hora a 65 °C, para retirar o excesso de trietilamina. Após este processo, a mistura reacional arrefeceu e novamente recorreu-se à filtração a vácuo para recolher o sólido amarelo que foi novamente lavado com metanol e éter etílico. O composto puro foi recolhido e seco na linha de vácuo, obtendo-se um rendimento final de 65 % (5,45 g).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ: 8.83 (s, 8H, H-1), 8.24 (s, 4H, H-3), 7.90 (s, 4H, H-2), 5.55 (s, 4H, H-4), 4.52 (s, 4H, OH), 3.52 (d, *J* = 4.2 Hz, 8H, H-7), 2.43 (s, 8H, H-5), 1.43 (s, 8H, H-6).

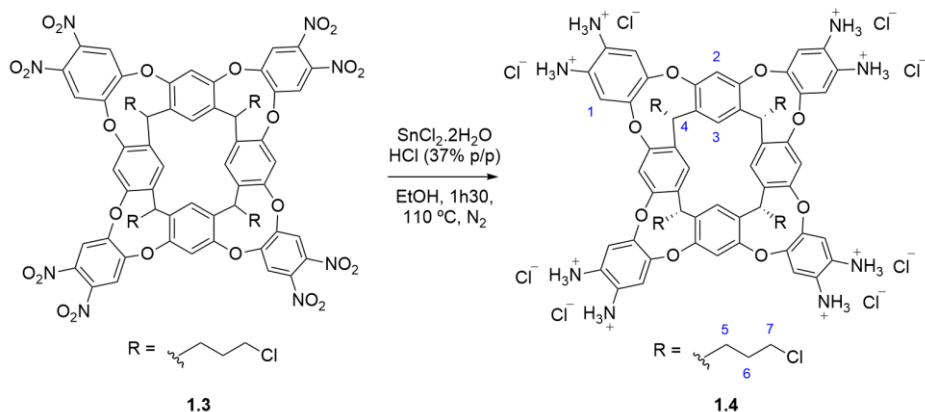
4.1.2.3 Síntese de tetra(cloropropil)octanitrocavitando (1.3)



Num balão de 250 mL de 2 tubuladuras com um agitador magnético, foi pesado o cavitando 1.2 (5,02 g, 3,60 mmol) e realizou-se a purga do balão. Sob a atmosfera de azoto, foi adicionado DMF seco (30 mL) e após a dissolução adicionou-se o SOCl_2 (35 mL) gota a gota para a solução que se encontrava num banho de gelo, a solução passou de castanha para amarelo límpido. O balão foi deixado a agitar durante 2 horas a 60 °C e no final obteve-se uma solução amarela turva. Numa tentativa de retirar os gases que se encontravam em solução realizou-se uma montagem de extração a vácuo, com recurso à trompa de água. Utilizou-se uma *trap* com uma solução saturada de NaHCO_3 para neutralizar o HCl libertado. Após a formação de uma espuma realizou-se uma microdestilação de solventes, mas neste caso com uso da linha de Schlenk, como no passo anterior. Para neutralizar o restante SOCl_2 adicionou-se metanol a 0 °C à solução que se encontrava num banho de gelo. A solução foi agitada durante 15 minutos a 0 °C e 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, realizou-se uma filtração e lavou-se o resíduo com metanol e éter etílico. Obteve-se um sólido amarelo-pálido com um rendimento de 82% (4.31 g).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ : 8.84 (s, 8H, H-1), 8.29 (s, 4H, H-3), 7.87 (s, 4H, H-2), 5.60 (s, 4H, H-4), 3.73 (s, 8H, H-7), 1.75 (s, 8H, H-6).

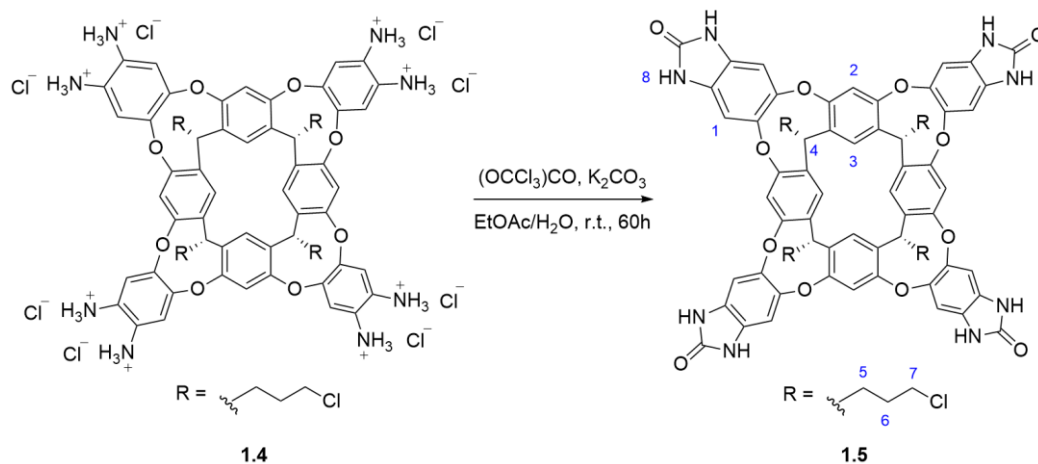
4.1.2.4 Síntese de tetra(cloropropil)octaminocavitando (1.4)



Num balão de 500 mL pesou-se 3,96 g do precursor (2,76 mmol), que foi dissolvido em 225 mL de etanol a 0 °C. Foi adicionado 66 g de cloreto de estanho di-hidratado e 85 mL de HCl 37% (p/p) a 0 °C e neste momento a solução passou de amarela para laranja. A reação foi deixada a 110 °C com agitação durante 1 hora e 30 minutos, sob atmosfera de azoto. Findo este tempo, a cor da solução encontrava-se amarela-pálida, por isso, o aquecimento foi desligado e deixou-se arrefecer. O solvente foi evaporado até se obter um resíduo creme ao qual se adicionou 400 mL de HCl 3M a 0 °C, sob atmosfera inerte de azoto. A suspensão foi deixada a 0 °C durante 1 hora e o sólido foi filtrado sob vácuo, lavado com HCl 3M a 0 °C, ACN a 0 °C e éter etílico. Quando se iniciaram as lavagens com solventes orgânicos o filtrado passou a ter uma cor amarela, sinal de degradação em contacto com o ar, por isso, o sólido foi guardado sob atmosfera inerte de azoto e obteve-se 6,22 g de sólido amarelo-pálido.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 7.81 (s, 4H, H-3), 7.70 (s, 8H, H-1), 7.23 (s, 4H, H-2), 5.58 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H, H-4), 3.69 (t, $J = 6.4$ Hz, 8H, H-7), 1.69 (m, 8H, H-6).

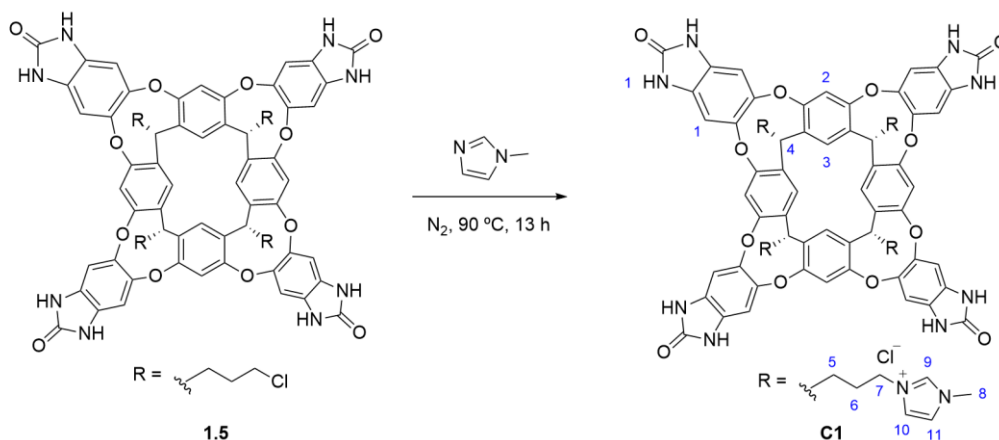
4.1.2.5 Síntese de tetra(cloropropil)tetraureiacavitando (1.5)



Num balão de 2 tubuladuras de 500 mL, adicionou-se 100 mL de uma solução de K_2CO_3 (7g) e 100 mL de acetato de etilo, colocou-se a agitar vigorosamente e num banho de gelo para se adicionar o precursor 1.4 (1,29 g) e o trifogeno (1g, 3,37 mmol) rapidamente. De seguida, fez-se a purga do balão com ciclos de vácuo seguido de azoto e deixou-se a reação a reagir sob azoto, durante 60 horas, à temperatura ambiente ($\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$). A solução passou de amarela para esbranquiçada, assim passado o tempo reacional adicionou-se 15 g de cloreto de sódio, para facilitar a separação de fases, e agitou-se até à dissolução total do sal. Isolou-se a fase orgânica com uma ampola de decantação, à mesma foi adicionada 30 mL de ACN e evaporou-se o resíduo amarelo até à secura. O próximo passo foi a sonificação do pó em 50 mL de água destilada durante 30 minutos e de seguida filtrou-se a vácuo. O sólido foi lavado com água e com metanol e de seguida repetiu-se o mesmo processo, mas utilizando metanol no lugar da água. Por último, o sólido foi lavado com acetonitrilo para retirar a água e obteve-se um sólido amarelado com um rendimento de 52 % (480 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 10.14 (s, 8H, H-8), 7.82 (s, 4H, H-3), 7.63 (s, 4H, H-2), 7.44 (s, 8H, H-1), 5.56 (s, 4H, H-4), 3.71 (s, 8H, H-7), 2.43 (s, 8H, H-5), 1.71 (s, 8H, H-6).

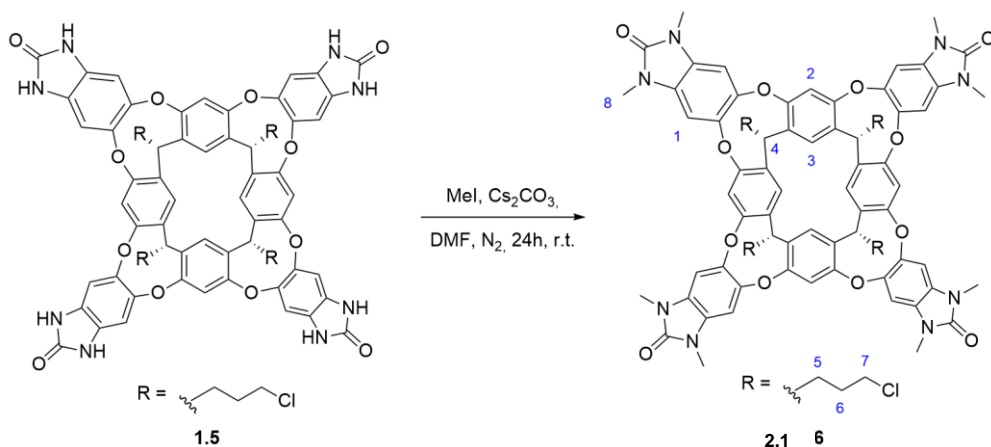
4.1.2.6 Síntese de cloreto de tetra(1-metilimidazolio-propil)tetraureiacavitando (C1)



O precursor (470 mg, 0,36 mmol, 1 eq.) foi adicionado a um balão de fundo redondo de 100 mL e de 2 tubuladuras, realizou-se a purga com ciclos de vácuo e azoto e quando o balão se encontrava em atmosfera inerte adicionou-se 30 mL de 1-metilimidazole. A solução foi agitada durante 1 hora a temperatura ambiente, até à dissolução completa do composto, posteriormente aumentou-se a temperatura para os 90 °C e a solução que anteriormente se encontrava amarela límpida começou a ficar turva e esbranquiçada. Passadas 13 horas, a solução encontrava-se cor-de-rosa com um sólido creme. A mesma solução foi deixada arrefecer e de seguida colocada num banho de gelo por 1 hora. O sólido foi filtrado a vácuo e lavado com acetona e transposto para o mesmo balão com 60 mL de acetona e deixou-se 24 horas a refluxar (~ 57 °C). Por fim, o sólido creme foi novamente filtrado sob vácuo e lavado com acetona e seco na linha de vácuo para se obter o composto final com um rendimento de 81% (470 mg).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ: 10.35 (s, 8H, H-12), 9.51 (s, 4H, H-9), 8.06 (s, 4H, H-10), 7.98 (s, 4H, H-3), 7.76 (s, 4H, H-11), 7.69 (s, 4H, H-2), 7.39 (s, 8H, H-1), 5.44 (s, 4H, H-4), 4.32 (s, 4H, H-7), 3.88 (s, 12H, H-8), 2.63 (s, 8H, H-5), 1.72 (s, 8H, H-6).

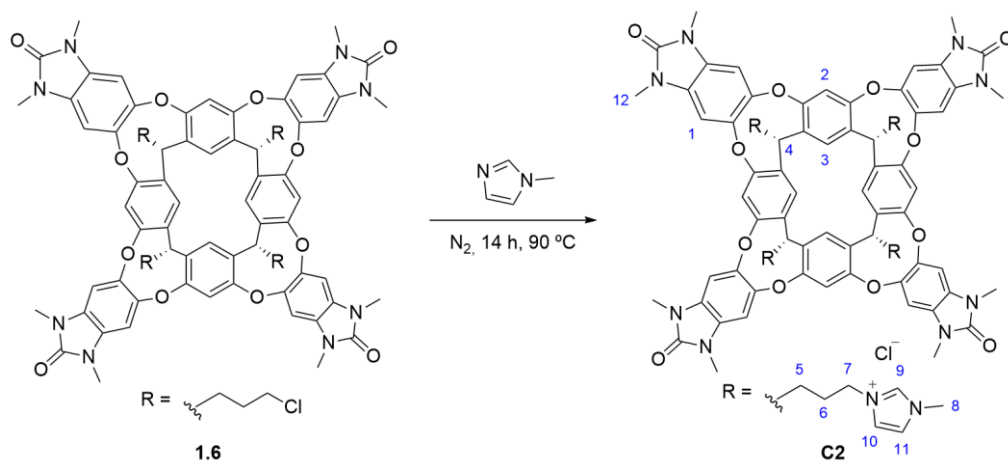
4.1.2.7 Síntese de tetra(cloropropil)tetrametilureiacavitando (2.1)



Num balão de 100 mL com um agitador magnético, foi dissolvido 320 mg (0.24 mmol, 1 eq.) do cavitando 1.5 em 30 mL de DMF. A esta solução adicionou-se Cs_2CO_3 (3.39 g, 9.6 mmol, 40 eq.) e iodeto de metano (2.73 g, 19.2 mmol, 80 eq.), sob um banho de gelo e com agitação. A solução foi purgada e deixada sob atmosfera inerte durante 24 horas, a temperatura ambiente. A solução encontrava-se turva com um sólido amarelado que foi filtrado e ao filtrado foi adicionado 200 mL de água desionizada e a solução outrora amarelada passou a ser esbranquiçada. A solução foi centrifugada e o precipitado branco foi lavado com água e metanol e seco sob vácuo, com um rendimento de 50% (160 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 7.86 (s, 4H, H-3), 7.76 (s, 4H, H-2), 7.70 (s, 8H, H-1), 5.68 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H, H-4), 3.75 (s, 8H, H-7), 3.14 (s, 24, H-8), 1.75 (s, 8H, H-5).

4.1.2.8 Síntese do cloreto de tetra(1-metilimidazóliopropil)tetrametilureiacavitando (C2)

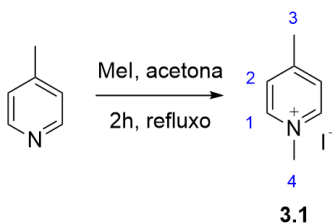


A um balão de 25 mL com 2 tubuladuras e com um agitador magnético foi adicionado 150 mg do composto sintetizado no passo anterior (0.1 mmol, 1 eq.), ao qual foi submetido a ciclos de vácuo e azoto e deixado sob atmosfera inerte para ser adicionado o 1-metilimidazole (10 mL, 112 mmol, 100 eq.) e deixou-se o sólido solubilizar a temperatura ambiente (a solução passou de esbranquiçada a amarela límpida). Findo este processo, foi aumentada a temperatura para 90 °C e deixou-se reagir por 20 horas. A solução foi arrefecida num banho de gelo e adicionado 50 mL de éter etílico frio para precipitar o produto. Passado 1 hora, filtrou-se o precipitado que foi lavado copiosamente com acetona. O precipitado foi recolhido e ressuspendido em 50 mL de acetona que refluxou durante 16 horas. Por fim, filtrou-se novamente o precipitado obtido e lavou-se com acetona para se obter um sólido creme que foi seco a vácuo, com um rendimento de 45% (75 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 9.55 (s, 4H, H-9), 8.11 (s, 8H, H-3 e H-10), 7.83 (s, 4H, H-2), 7.79 (s, 4H, H-11), 7.71 (s, 8H, H-1), 5.54 (t, $J = 8.1$ Hz, 4H, H-4), 4.36 (s, 8H, H-7), 3.91 (s, 12H, H-8), 3.14 (s, 24H, H-12), 2.70 (s, 8H, H-5), 1.76 (s, 8H, H-6).

4.1.3 Síntese dos corantes

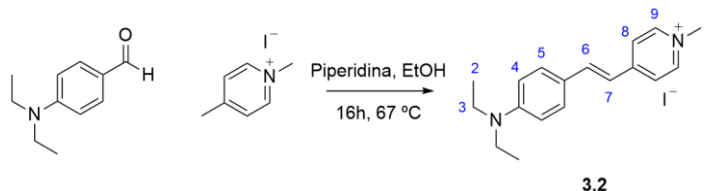
4.1.3.1 Síntese de Iodeto de 1,4-dimetilpiridínio (3.1)



A um balão de 50 mL com duas tubuladuras equipado com um agitador magnético foi adicionado 20 mL de acetona, 1.12 g de 4-metilpicolina (12 mmol, 1 eq.) e 1 mL de iodometano (16.8 mmol, 1.3 eq.). A solução foi deixada a solubilizar a temperatura ambiente e depois 2 horas a refluxar. A solução passou de transparente para amarelada com um precipitado branco que foi filtrado e lavado com acetona. O sólido foi recolhido e seco na estufa com um rendimento de 33% (960 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 8.82 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-1), 7.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-2), 4.27 (s, 3H, H-4), 2.60 (s, 3H, H-3).

4.1.3.2 Síntese de Iodeto de (E)-4-(4-dietilestiril)-1-metilpiridínio (3.2 – EtDASPI)

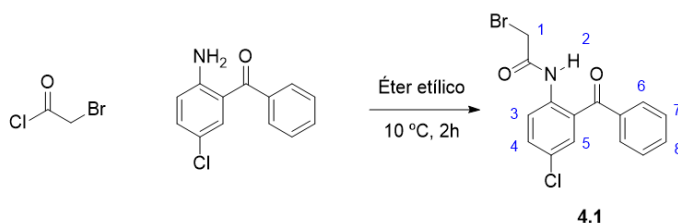


A um balão de 2 tubuladuras de 25 mL, foi adicionado 245 mg de iodeto de dimetilpiridina (1.04 mmol, 1.3eq.) e 140 mg do aldeído (0.79 mmol, 1 eq.) e de seguida 6 mL de etanol para dissolver os reagentes a temperatura ambiente. Adicionou-se cerca de 0.2 mL de piperidina e a solução passou de amarelada para vermelho-escuro. A solução foi deixada a refluxar durante 24 horas e passado esse tempo colocada em gelo para precipitar o produto. O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Como o filtrado encontrava-se ainda vermelho-escuro, porque o corante apresenta alguma solubilidade em etanol, foi evaporado os solventes e recristalizado em etanol onde se obteve o produto com um rendimento de 20% (75 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 8.66 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-9), 8.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-8), 7.88 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-7), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-5), 7.11 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-6), 6.75 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-4), 4.16 (s, 3H, H-1), 3.42 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H, H-3), 1.12 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, H-2).

4.1.4 Síntese de Benzodiazepinas

4.1.4.1 Síntese de 2-Bromoacetamida-5-clorofenilbenzoilo (4.1)

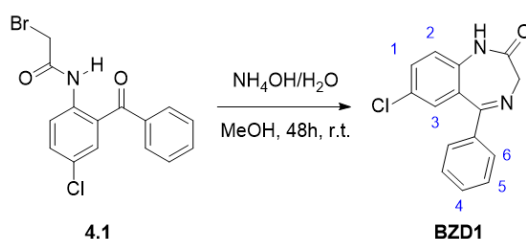


Dissolveram-se 500 mg de 2-amino-5-clorofenil-fenilmetanona (2.16 mmol, 1 eq.) em 20 mL de éter e posteriormente adicionou-se 500 μL de cloreto de bromoacetilo (5.4 mmol, 2.5 eq.) enquanto a solução se encontrava a 10 °C e sob agitação. A solução foi deixada a reagir nas condições anteriores durante 2 horas e a mesma que outrora se encontrava amarela passou a ser translúcida. Findo o tempo de reação, foi adicionada gota a gota uma solução de 5%

NH₄OH/MeOH (20 mL) enquanto o balão reacional se encontrava em gelo e sob agitação. A fase orgânica foi separada e lavada com 20 mL da solução básica anterior e 2 vezes com água desionizada (20 mL). A fase etérea foi seca com MgSO₄ e evaporada à secura. O sólido foi lavado com n-hexano para retirar a cor amarela proveniente do reagente de partida e seco em alto vácuo para se obter um sólido branco com 47% de rendimento (355 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.31 (s, 1H, 2), 8.58 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3), 7.73 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8), 7.54 (m, 4H), 4.02 (s, 2, H-1).

4.1.4.2 Síntese de Nordiazepam (BZD1)



Num balão de 25 mL de 2 tubuladuras equipado com um agitador magnético, um condensador e uma mangueira mergulhada numa solução HCl 0.1 M (trap ácida), foi dissolvido 335 mg do composto sintetizado anteriormente (0.38 mmol, 1 eq.) em 15 mL de metanol. Foram adicionados 6 mL de uma solução 15% NH₄OH/H₂O lentamente e a solução foi deixada a agitar durante 72h a temperatura ambiente. A reação inicialmente era turva, passou a translúcida. Passado o tempo de reação foi adicionado 15 mL de H₂O e 15 mL de DCM para formar duas fases, a fase orgânica foi lavada com 15 mL de H₂O e seca com Na₂SO₄ para posteriormente ser evaporada e obter-se um sólido amarelado. Como ainda existia produto na fase aquosa (devido à afinidade do metanol para esta fase, evaporou-se o metanol e precipitou um sólido acinzentado, como a TLC mostrava que este precipitado não estava puro mas tinha o produto realizou-se uma purificação por coluna cromatográfica de sílica gel flash, com o eluente 1:1 hexano:acetato de etilo e adsorvido em celite. As fases com o produto foram reunidas, evaporadas e secas a alto vácuo para se obter um sólido branco com 46% rendimento (118 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.13 (s, 1H, NH), 7.53 – 7.37 (m, 6H), 7.30 (s, 1H, H-3), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.33 (s, 2H, H-7).

4.2 Caracterização

4.2.1 Considerações gerais

Os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN foram adquiridos num espectrofotômetro *Bruker AVANCE III* 400 MHz (^1H) ou *Bruker AVANCE NEO* 500 MHz (^1H), os desvios químicos, σ , foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento, J , em Hertz. O sinal de solvente residual foi registado a 2.50 ppm, 4.79 ppm e 7.26 ppm (DMSO, D_2O e CDCl_3 , respetivamente) no RMN de ^1H .⁷⁸

Os espectros de UV-Vis foram registados num espectrofotômetro *Varian CARY 100 Bio* ou *Varian CARY 5000* (este último apenas utilizado no estudo de cinéticas), utilizando cuvetes de plástico de absorção com 1.5 mL ou 3 mL, com um percurso ótico de 1 cm ou cuvetes de quartzo, com 1 cm de percurso ótico, quando realizado o estudo do RQF. As bandas foram expressas em comprimento de onda, λ , em unidades nm e representadas em função da absorvância.

Os espectros de emissão e excitação foram registados num espectralfluorímetro *Horiba-Jovin-Yvon SPEX Fluorolog-3 Model FL3-22*, utilizando cuvetes de plástico de fluorescência com um percurso ótico de 1 cm e cuvetes de quartzo com 1 cm de percurso ótico, quando realizado o estudo do RQF, em modo *right angle*. As bandas foram expressas em comprimento de onda, λ , em unidades nm e representadas em função da intensidade da emissão (CPS – *counts per second*) ou intensidade normalizada.

O pH foi ajustado com um medidor *Crison basic 20+ pH*. Os solventes utilizados nestes estudos foram água milli-q, metanol e etanol absoluto com pureza de HPLC. Para soluções aquosas utilizaram-se micropipetas da marca *Eppendorfe* para soluções orgânicas utilizaram-se microseringas de vidro da marca *Hamilton Company*.

Quando necessário filtrar soluções foram utilizados filtros para seringas ALWSCI, com 0.45 μm e de nylon.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Estudo computacional

Utilizou-se o programa *ChemDraw* para desenhar as estruturas supramoleculares (cavitando, cucurbiturilo, calixareno, entre outras), o flunitrazepam e os corantes MeDASPI e EtDASPI. Posteriormente, as estruturas foram otimizadas geometricamente em separado e em vácuo, com a ferramenta *HyperChem8*, utilizando o método de otimização de geometria de *Polak Riberie*,

a terminar quando não existir uma alteração superior a 0.1 kcal. De seguida utilizaram-se as estruturas anteriores em conjunto e pela mesma estratégia obtiveram-se as estruturas de associação otimizadas.

4.2.2.2 RMN

As soluções para RMN foram feitas maioritariamente com D₂O, apenas no caso da BZD1 utilizou-se uma mistura de 5% MeOD. A concentração de analito variou entre 0.5 a 1 mM e a solução de cavitando stock foi de 5 mM em D₂O e no caso das titulações foi adicionada esta solução nas proporções apresentadas normalmente: 0:1, 0.5:1, 1:1, 2:1. O volume total foi de 500 uL de solução.

4.2.2.3 Titulações monitorizadas por espectroscopias óticas

As soluções stock de cavitandos e de analitos foram feita através da pesagem e dissolução em água mili-q para se obter uma solução de 2 mM. A BZD1 foi dissolvida em MeOH com uma concentração de 10 mM. A concentração foi ajustada através do coeficiente de extinção molar de cada espécie.

As titulações cavitando:corante foram realizadas em células de plástico, em lote, com concentrações fixas de corante e concentrações superiores de cavitando e perfeitas com água mili-q. Foi necessário deixar as soluções equilibrar no caso de C1 3 horas e no caso de C2 16 horas. As soluções foram monitorizadas através de espectroscopia de UV-Vis e emissão. No caso da emissão, é necessário manter a absorvância do ponto de excitação inferior a 0.1 u.a.. Os dados foram tratados consoante o equilíbrio que apresentam e de acordo com as equações em apêndice (A.2.1 e A.2.2)

As titulação com variação de pH foram realizadas em contínuo, mantendo fixa a concentração de analito ou de recetor:analito e adicionando pequenos volumes de soluções de HCl (0.01 M ou 0.1 M). Os espetros de absorção foram registados e os dados tratados de acordo com o apêndice A.2.5.

As titulações dos ensaios de competição foram feitas em água mili-q, excetuando a BZD1 que foi feito em 5% MeOH, com concentrações fixas de corante e de cavitando e aumentando a concentração do competidor. As soluções foram deixadas a equilibrar durante 3 horas antes de monitorizar a situação de equilíbrio por espectroscopia de absorção e emissão e a constante de afinidade foi obtida através do apêndice A.2.3.

4.2.2.4 Cinética

A cinética foi monitorizada por absorção, em células de plástico com 1 cm e em água mili-q.. No caso da encapsulação do corante, foi mantida fixa a concentração de corante e antes de se iniciar a medição do espectro adicionou-se a solução de cavitando a diferentes concentrações. No caso de C2 os espectros foram registados com intervalos de 10 minutos e no caso de C1 a aquisição foi a cada 1 minuto. Nos ensaios de competição o procedimento foi semelhante, adicionando-se por último o competidor e mediram-se os espectros a cada 1 minuto.

4.2.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Uma solução do analito, em água, é adicionada até perfazer todo o volume da célula. Uma solução do recetor 10 vezes mais concentrada que a de analito é colocado na seringa de injeção, onde é adicionado 2 uL a cada injeção, a cada 30 minutos. A cada injeção existe uma alteração de temperatura em relação à célula de referência (que contém água mili-q) e o aparelho repõe a diferença do calor absorvido ou gerado. Os dados foram tratados de acordo com o subcapítulo A.1.4.

4.2.2.6 Estudo de Excipientes

A 900 uL da solução de excipientes dissolvido em 90% água e 10% MeOH, com a concentração apresentada na tabela 7, adicionou-se 100 uL da solução aquosa da cápsula de C1₂MeDASPI ([C1]=0.1 mM e [MeDASPI]=8 µM). A concentração dos excipientes foi ajustada entre 0.08 e 15 mM devido à sua solubilidade, mas também pois não existe a informação da quantidade de cada composto num comprimido e por isso estes resultados são meramente qualitativos.

4.2.2.7 Tratamento de um comprimido para análise

Utilizaram-se comprimidos de Alprazolam (0.5 mg), Clonazepam (0.5 mg) e Diazepam (5 mg) que foram esmagados no almofariz. O pó foi dissolvido em 2.5 mL de uma solução aquosa com 10% metanol. A solução foi sujeita a ultrassons durante meia hora, a 35 °C, para aumentar a solubilização da parte orgânica do comprimido. Como uma grande parte dos excipientes são insolúveis procedeu-se à centrifugação da amostra e o sobrenadante foi filtrado com filtros de seringas. Foi feito um espectro da solução e posteriormente adicionou-se 50 uL da solução com o sensor ([C1] = 0.08 mM e [MeDASPI] = 4 µM) à solução com 950 uL de água e 10% MeOH.

BIBLIOGRAFIA

- 1 J. A. Hall and C. B. T. Moore, Drug facilitated sexual assault - A review, *J. Forensic Leg. Med.*, 2008, **15**, 291–297.
- 2 S. C. Swan, N. V. Lasky, J. E. Fisher, B. S. Woodbrown, V. D. Bonsu, P. R. Schramm, A. T. Warren, A. L. Coker and C. M. Williams, Just a dare or unaware? Outcomes and motives of drugging (“drink spiking”) among students at three college campuses, *Psychology of Violence*, 2017, **7**, 253–264.
- 3 P. Raven, One in ten women say they have had their drink spiked, <https://yougov.co.uk/topics/society/articles-reports/2022/12/28/one-ten-women-say-they-have-had-their-drink-spiked>.
- 4 S. D. Brown and T. C. Melton, Trends in bioanalytical methods for the determination and quantification of club drugs: 2000–2010, *Biomed. Chromatogr.*, 2011, **25**, 300–321.
- 5 D. S. M. Ribeiro and J. L. M. Santos, Controlo químico de bebidas adulteradas em crimes facilitados com drogas Beverage Chemical control adulterated in drug facilitated crimes, *Acta Farm. Port.*, 2013, **2**, 121–134.
- 6 C. E. Griffin, A. M. Kaye, F. Rivera Bueno and A. D. Kaye, Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects, *Ochsner J.*, 2013, **13**, 214–223.
- 7 S. U. Son, S. Jang, B. Kang, J. Kim, J. Lim, S. Seo, T. Kang, J. Jung, K. S. Lee, H. Kim and E. K. Lim, Colorimetric paper sensor for visual detection of date-rape drug γ -hydroxybutyric acid (GHB), *Sensors Actuators B Chem.*, 2021, **347**, 130598.
- 8 M. A. Tantawy, M. A. Farag and A. M. Yehia, A gold-carbon dots nanoprobe for dual mode detection of ketamine HCl in soda drinks, *New J. Chem.*, 2020, **44**, 7058–7064.
- 9 S. Lv, X. Xu, L. Guo, L. Xu, L. Liu, H. Kuang and C. Xu, Development of a gold nanoparticle-based lateral-flow strip for the detection of cannabidiol in functional beverages, *Analyst*, 2023, **148**, 1703–1711.
- 10 L. A. Baumes, M. B. Sogo, P. Montes-Navajas, A. Corma and H. Garcia, A colorimetric sensor array for the detection of the date-rape drug γ -Hydroxybutyric acid (GHB): A supramolecular approach, *Chem. - A Eur. J.*, 2010, **16**, 4489–4495.
- 11 M. A. Beatty, A. J. Selinger, Y. Li and F. Hof, Parallel Synthesis and Triagem of Supramolecular Chemosensors That Achieve Fluorescent Turn-on Detection of Drugs in Saliva, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 16763–16771.
- 12 E. G. Shcherbakova, B. Zhang, S. Gozem, T. Minami, P. Y. Zavalij, M. Pushina, L. D. Isaacs and P. Anzenbacher, Supramolecular Sensors for Opiates and Their Metabolites, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 14954–14960.
- 13 EMCDDA, *New benzodiazepines in Europe – a review*, 2021.

- 14 S. C. Licata and J. K. Rowlett, Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABAA receptor modulation and beyond, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2008, **90**, 74–89.
- 15 F. Torres-Bondia, J. De Batlle, L. Galván, M. Buti, F. Barbé and G. Pinöl-Ripoll, Trends in the consumption rates of benzodiazepines and benzodiazepine-related drugs in the health region of Lleida from 2002 to 2015, *BMC Public Health*, 2020, **20**, 1–9.
- 16 R. W. Olsen and W. Sieghart, International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update, *Pharmacol. Rev.*, 2008, **60**, 243–260.
- 17 C. H. Vinkers and B. Olivier, Mechanisms underlying tolerance after long-term benzodiazepine use: A future for subtype-selective GABAA receptor modulators?, *Adv. Pharmacol. Sci.*, , DOI:10.1155/2012/416864.
- 18 V. R. Preedy, *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*, 2016, vol. 3.
- 19 H. Druid, P. Holmgren and J. Ahlner, Flunitrazepam: An evaluation of use, abuse and toxicity, *Forensic Sci. Int.*, 2001, **122**, 136–141.
- 20 R. T. DeRienz, J. M. Holler, M. E. Manos, J. Jemionek and M. R. Past, Evaluation of four immunoassay triagem kits for the detection of benzodiazepines in urine, *J. Anal. Toxicol.*, 2008, **32**, 433–437.
- 21 Z. Qriouet, Z. Qmichou, N. Bouchoutrouch, H. Mahi, Y. Cherrah and H. Sefrioui, Analytical Methods Used for the Detection and Quantification of Benzodiazepines, *J. Anal. Methods Chem.*, 2019, **2019**, 1–11.
- 22 M. Dagar, S. Yadav, V. V. R. Sai, J. Satija and H. Bhatia, Emerging trends in point-of-care sensors for illicit drugs analysis, *Talanta*, 2022, **238**, 123048.
- 23 N. Leesakul, S. Pongampai, P. Kanatharana, P. Sudkeaw, Y. Tantirungrotechai and C. Buranachai, A new triagem method for flunitrazepam in vodka and tequila by fluorescence spectroscopy, *Luminescence*, 2013, **28**, 76–83.
- 24 Y. Te Yen, Y. S. Lin, T. H. Chen, S. C. Chyueh and H. T. Chang, A Carbon-Dot Sensing Probe for Triagem of Date Rape Drugs: Nitro-containing Benzodiazepines, *Sensors Actuators, B Chem.*, 2020, **305**, 127441.
- 25 M. L. Wang, Y. M. Choong, N. W. Su and M. H. Lee, A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography, *J. Food Drug Anal.*, 2003, **11**, 133–140.
- 26 P. C. K. Cheung and B. M. Mehta, *Handbook of food chemistry*, 2015.
- 27 A. Haywood and B. D. Glass, Pharmaceutical excipients - where do we begin?, *Aust. Prescr.*, 2011, **34**, 112–114.
- 28 R. Patel, J. Barker and A. Elshaer, Pharmaceutical excipients and drug metabolism: A mini-review, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 1–21.
- 29 C. Guo, A. C. Sedgwick, T. Hirao and J. L. Sessler, Supramolecular fluorescent sensors : An historical overview and update, *Coord. Chem. Rev.*, 2021, **427**, 213560.

- 30 B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*, 2001, vol. 8.
- 31 J. Krämer, R. Kang, L. M. Grimm, L. De Cola, P. Picchetti and F. Biedermann, Molecular Probes, Chemosensors, and Nanosensors for Optical Detection of Biorelevant Molecules and Ions in Aqueous Media and Biofluids, *Chem. Rev.*, 2022, **122**, 3459–3636.
- 32 S. D. Choudhury and H. Pal, Supramolecular and supramolecular photochemistry: a perspective overview, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2020, **22**, 23433–23463.
- 33 A. C. Sedgwick, J. T. Brewster, T. Wu, X. Feng, S. D. Bull, X. Qian, J. L. Sessler, T. D. James, E. V. Anslyn and X. Sun, Indicator displacement assays (IDAs): The past, present and future, *Chem. Soc. Rev.*, 2021, **50**, 9–38.
- 34 B. The Huy, D. T. Thangadurai, M. Sharipov, N. Ngoc Nghia, N. Van Cuong and Y. I. Lee, Recent advances in turn off-on fluorescence sensing strategies for sensitive biochemical analysis - A mechanistic approach, *Microchem. J.*, 2022, **179**, 107511.
- 35 N. P. Organization, The Nobel Prize in Chemistry 1987, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/summary/>, (accessed 5 October 2022).
- 36 X. Ma and Y. Zhao, Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 7794–7839.
- 37 HyperCub Inc., *HyperChem Release 7 Manual*, 2002.
- 38 R. J. Hooley and J. Rebek, Chemistry and Catalysis in Functional Cavitands, *Chem. Biol.*, 2009, **16**, 255–264.
- 39 A. R. Far, A. Shivanyuk and J. Rebek, Water-Stabilized Cavitands, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4–5.
- 40 S. Mosca, Y. Yu and J. Rebek, Preparative scale and convenient synthesis of a water-soluble, deep cavitand, *Nat. Protoc.*, 2016, **11**, 1371–1387.
- 41 M. M. Tang, K. Kanagaraj, J. Rebek and Y. Yu, Role of Rim Functions in Recognition and Selectivity of Small-Molecule Guests in Water-Soluble Cavitand Hosts, *Chem. - An Asian J.*, 2022, **17**, 1–6.
- 42 Y. Zhu, M. Tang, H. Zhang, F. U. Rahman, P. Ballester, J. Rebek, C. A. Hunter and Y. Yu, Water and the Cation- π Interaction, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 12397–12403.
- 43 K. Da Zhang, D. Ajami, J. V. Gavette and J. Rebek, Complexation of alkyl groups and ghrelin in a deep, water-soluble cavitand, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 4895–4897.
- 44 S. M. Biroš and J. Rebek, Structure and binding properties of water-soluble cavitands and capsules, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 93–104.
- 45 S. Mosca, Y. Yu, J. V. Gavette, K. Da Zhang and J. Rebek, A Deep Cavitand Templates Lactam Formation in Water, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 14582–14585.
- 46 N. W. Wu, I. D. Petsalakis, G. Theodorakopoulos, Y. Yu and J. Rebek, Cavitands as Containers for α,ω -Dienes and Chaperones for Olefin Metathesis, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2018, **57**, 15091–15095.

- 47 D. Masseroni, S. Mosca, M. P. Mower, D. G. Blackmond and J. Rebek, Cavitands as Reaction Vessels and Blocking Groups for Selective Reactions in Water, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2016, **55**, 8290–8293.
- 48 H. S. Ashbaugh, B. C. Gibb and P. Suating, Cavitand Complexes in Aqueous Solution: Collaborative Experimental and Computational Studies of the Wetting, Assembly, and Function of Nanoscopic Bowls in Water, *J. Phys. Chem.*, 2021, **125**, 3253–3268.
- 49 M. H. K. Ebbing, M. J. Villa, J. M. Valpuesta, P. Prados and J. De Mendoza, Resorcinarenes with 2-benzimidazolone bridges: Self-aggregation, self-assembled dimeric capsules, and guest encapsulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 4962–4966.
- 50 K. Da Zhang, D. Ajami, J. V. Gavette and J. Rebek, Alkyl groups fold to fit within a water-soluble cavitand, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5264–5266.
- 51 K. Da Zhang, D. Ajami and J. Rebek, Hydrogen-bonded capsules in water, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 18064–18066.
- 52 A. D. Gill, B. L. Hickey, W. Zhong and R. J. Hooley, Selective sensing of THC and related metabolites in biofluids by host:guest arrays, *Chem. Commun.*, 2020, **56**, 4352–4355.
- 53 Y. Liu, L. Perez, M. Mettry, A. D. Gill, S. R. Byers, C. J. Easley, C. J. Bardeen, W. Zhong and R. J. Hooley, Site selective reading of epigenetic markers by a dual-mode synthetic receptor array, *Chem. Sci.*, 2017, **8**, 3960–3970.
- 54 Y. Liu, L. Perez, M. Mettry, C. J. Easley, R. J. Hooley and W. Zhong, Self-Aggregating Deep Cavitand Acts as a Fluorescence Displacement Sensor for Lysine Methylation, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 10746–10749.
- 55 A. Gill, B. Hickey, S. Wang, M. Xue, W. Zhong and R. Hooley, Sensing of Citrulline Modifications in Histone Peptides by Deep Cavitand Hosts, *Chem. Commun.*, 2019, **55**, 13259–13262.
- 56 C. Reichardt and T. Welton, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition*, 2010.
- 57 A. Marini, A. Muñoz-Losa, A. Biancardi and B. Mennucci, What is solvatochromism?, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 17128–17135.
- 58 X. Cao, R. W. Tolbert, J. L. McHale and W. D. Edwards, Theoretical study of solvent effects on the intramolecular charge transfer of a hemicyanine dye, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 2739–2748.
- 59 C. Wang, W. Chi, Q. Qiao, D. Tan, Z. Xu and X. Liu, Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: From mechanisms to rational designs of bright and sensitive fluorophores, *Chem. Soc. Rev.*, 2021, **50**, 12656–12678.
- 60 W. Rettig, Photoinduced Charge Separation via Twisted Intramolecular Charge Transfer States, *Top. Curr. Chem.*, 1994, **69**, 255–258.
- 61 F. Vega, A. Sanna, B. Navarrete, M. M. Maroto-Valer and V. J. Cortés, Degradation of amine-based solvents in CO₂ capture process by chemical absorption, *Greenh. Gases Sci. Technol.*, 2014, **4**, 707–733.

- 62 P. Anastas and T. Williamson, *Green chemistry: designing chemistry for the environment*, 1996, vol. 34.
- 63 K. Senthil, S. Kalainathan and A. Ruban Kumar, Effect of additives on the large-size growth of 4-N,N-dimethylamino-4-N-methyl stilbazolium naphthalene-2-sulfonate (DSNS) single crystal: An efficient stilbazolium derivative NLO crystal with potential terahertz wave properties, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 9847–9856.
- 64 E. Cortés, R. Salazar, O. García, C. Universitaria, F. E. S. Cuautitlán-unam, C. Izcalli and E. De México, Synthesis and Spectral Properties of 2- [(o - and p -Substituted) aminophenyl] -3 H -5- [(o - and p -substituted) phenyl] -7-chloro-1 , 4-benzodiazepines, *J. Heterocycl. Chem.*, 2001, **12**, 663–669.
- 65 D. Tzeli, I. D. Petsalakis, G. Theodorakopoulos, F. U. Rahman, Y. Yu and J. Rebek, The role of electric field, peripheral chains, and magnetic effects on significant ¹H upfield shifts of the encapsulated molecules in chalcogen-bonded capsules, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2021, **23**, 19647–19658.
- 66 Diamagnetic Anisotropy, <https://theory.labster.com/diamagnetic-anisotropy/>.
- 67 T. Solomon, The definition and unit of ionic strength, *J. Chem. Educ.*, 2001, **78**, 1691.
- 68 J. H. Jordan, H. S. Ashbaugh, J. T. Mague and B. C. Gibb, Buffer and Salt Effects in Aqueous Host-Guest Systems: Triagem, Competitive Binding, or Both?, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 18605–18616.
- 69 P. K. Zarzycki and H. Lamparczyk, A Simple Experiment Demonstrating the Temperature Effect in Supramolecular Chemistry, *J. Chem. Educ.*, 1996, **73**, 459–460.
- 70 J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge and D. B. Collum, Method of Continuous Variations: Applications of Job Plot to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2013, **52**, 11998–12013.
- 71 S. Prahl, PhotoChemCad Spectra, <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/index.html>, (accessed 18 July 2023).
- 72 S. M. Biroš, E. C. Ullrich, F. Hof, L. Trembleau and J. Rebek, Kinetically Stable Complexes in Water: The Role of Hydration and Hydrophobicity, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 2870–2876.
- 73 A. McNaught and A. Wilkinson, *Limit of Detection in Analysis*, 1997.
- 74 G. L. Long and J. D. Winefordner, Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 713A-724A.
- 75 J. M. Yang, Y. Q. Chen, Y. Yu, P. Ballester and J. Rebek, Rigidified Cavitand Hosts in Water: Bent Guests, Shape Selectivity, and Encapsulation, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 19517–19524.
- 76 D. B. G. Williams and M. Lawton, Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 8351–8354.
- 77 W. C. Still, M. Kahn and A. Mitra, Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution, *J. Org. Chem.*, 1978, **43**, 2923–2925.

- 78 G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, R. Gan and H. Apiezon, NMR Chemical Shifts of Trace Impurities : Common Laboratory Solvents , Organics , and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, *Organometallics*, 2010, **29**, 2176–2179.
- 79 R. Silverstein, F. Webster, D. Kiemle and D. Bryce, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 2007.
- 80 L. Field, H. Li and A. Magill, *Organic Structures from 2D NMR Spectra*, 2015.
- 81 M. Bria, Two Dimensional NMR Spectroscopy, http://rmn2d.univ-lille1.fr/rmn2d_en/co/RMN2D_web.html, (accessed 17 August 2023).
- 82 M. Levitus, Tutorial: Measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples, *Methods Appl. Fluoresc.*, 2020, **8**, 33001.
- 83 Malvern, 2015, 10–14.
- 84 S. Akram and Q. ul Ann, Newton Raphson method calculator, *Int. J. Sci. Eng. Res.*, 2015, **6**, 1748–1752.
- 85 A. Credi and L. Prodi, Inner filter effects and other traps in quantitative spectrofluorimetric measurements: Origins and methods of correction, *J. Mol. Struct.*, 2014, **1077**, 30–39.
- 86 P. Thordarson, Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1305–1323.
- 87 A. K. Gaigalas and L. Wang, Measurement of the fluorescence quantum yield using a spectrometer with an integrating sphere detector, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 2008, **113**, 17–28.
- 88 A. M. Brouwer, Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 2213–2228.

APÊNDICE

A.1 Breve elucidação das técnicas utilizadas

A.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN tem-se mostrado bastante útil na elucidação de estruturas supramoleculares, sendo possível obter informação sobre as interações a nível molecular, os ambientes químicos, constantes de afinidade, cinéticas, entre outros.

Esta informação pode ser retirada devido à propriedade de spin nuclear que os núcleos apresentam. Esta propriedade está interligada com o número de spin, I_N , dos núcleos e para aqueles com spin 1/2, podem ter dois estados de energia ($2I_N + 1$) quando aplicado um campo magnético externo, B_0 . Dividem-se em duas populações de spins opostos, sendo que o nível de menor energia tem excesso populacional, de acordo com Boltzmann, com uma diferença de energia, ΔE , que pode ser dado pela equação:

$$\Delta E = \frac{\gamma h B_0}{2\pi} \quad (\text{A1})$$

Onde γ corresponde à razão magnetogírica do núcleo em estudo (para o caso de ^1H 2.67×10^8 rad/s.T) e h é a constante de Plank (6.63×10^{-34} J.s). A esta população é aplicada uma radiofrequência com energia na mesma ordem que ΔE (efeito de ressonância), o que origina a transição de alguns spins entre o estado de energia inferior para o de maior energia. Quando este pulso finaliza, os spins voltam ao seu estado inicial com uma determinada frequência, num movimento de precessão. Esta radiofrequência é obtida em função do tempo e transformada através da transformada de *Fourier* num sinal de RMN.⁷⁹

Cada núcleo de cada protão vai ter uma frequência de precessão diferente, porque dependem da variável σ , uma constante magnética de blindagem.

$$v_{eff} = \frac{\gamma B_0(1-\sigma)}{2\pi} \quad (A2)$$

A blindagem é causada pela densidade eletrônica que cada núcleo experiencia, formando um campo magnético local diferente para cada núcleo. A capacidade de precessar em torno de B_0 vai ser diferente e assim se obtém um espectro de ^1H RMN unidimensional, onde é possível obter informação sobre o ambiente químico dos diversos prótons de um sistema receptor:analito. Quando existe um aumento do campo magnético local os prótons estão mais blindados e o sinal encontra-se a campo alto, quando o campo magnético local é mais desvigoroso os prótons estão desprotegidos tendo sinais a campo baixo.⁷⁹

Por outro lado, o RMN bidimensional permite acrescentar outra dimensão e é possível obter informação através de ligações ou também através do espaço e permite a identificação de sistemas complexos.

Neste trabalho utilizou-se o ^1H - ^1H COSY (*CORrelated Spectroscopy*), que consiste na correlação entre dois spins a cerca de 3 ligações de distância. O primeiro pulso de radiofrequência faz com que os spins dos núcleos excitem e entrem em ressonância com uma dada frequência e um segundo pulso de radiofrequência passa a magnetização anterior para spins acoplados.

^1H - ^1H ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) é uma técnica empregue para determinar quais sinais surgem de prótons que estão próximos uns dos outros no espaço (até cerca de 5 Å), mesmo que não estejam ligados entre si e que sintam o efeito nuclear de Overhauser (quando se aplica um pulso de radiofrequência num núcleo observa-se a sua ressonância noutro), portanto um espectro ROESY é obtido através de correlações de espaço por relaxamento de spin-spin. Experimentalmente, é necessário um bloqueio do spin para que seja possível obter sinais com fase diferente da diagonal. Este género de experiência é utilizado para moléculas maiores devido a terem tempos de correlações igualmente grandes.⁸⁰



Figura A1. Pulsos de radio frequência numa experiência de COSY (à esquerda) e ROESY (à direita)⁸¹

A.1.2 Espectroscopia de Absorção

Caso a unidade sinalizadora possua um cromóforo, a alteração de sinal pode ser monitorizada através da espectroscopia de absorção.

Uma molécula quando irradiada com luz de um determinado comprimento de onda, λ , tem a capacidade de absorver um fóton e promover um elétron para a LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), o estado excitado. Por norma, o estado fundamental corresponde a uma orbital π e caso existam heteroátomos a HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) corresponde a uma orbital n , que são os pares não ligantes dos heteroátomos. O estado excitado pode corresponder a uma orbital π^* , de natureza antiligante. Estas são as transições permitidas por simetria e as de menor energia, por isso podem ser vistas na janela do UV e Visível que corresponde a 200-800 nm.

Quando a luz incide sobre uma amostra, as moléculas absorvem parte para promoverem elétrons para o estado excitado e assim ao detetor apenas chega parte da luz que não foi absorvida. Como normalmente existe uma referência para entender que parte da luz incide no detetor quando o cromóforo não está presente, é possível obter a luz que é absorvida a um determinado λ pela expressão:

$$Abs = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (A3)$$

Em que I , corresponde à intensidade luz que chega ao detetor depois de passar pela amostra e I_0 à intensidade de luz que chega ao detetor depois de passar por uma referência.

A absorvância relaciona-se com a concentração através da Lei de Lambert-Beer:

$$Abs = \varepsilon \times l \times [X] \quad (A4)$$

Onde ε , o coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$), corresponde a uma constante que quantifica a capacidade que uma molécula tem de absorver luz, l é o percurso ótico da solução que altera a quantidade de moléculas que absorvem e $[X]$ corresponde à concentração do analito. Caso esta linearidade não se observe, pode ser indicação de que existam outras espécies a absorver ou existem a formação de agregados.³⁰

A.1.3 Espectroscopia de Fluorescência

Caso a unidade sinalizadora possua um fluoróforo, a alteração de sinal pode ser monitorizada através da espectroscopia de fluorescência, mais especificamente por emissão.

Uma molécula, quando excitada para o seu respetivo estado excitado, tem a tendência para voltar para o seu estado fundamental, devido à maior estabilidade do mesmo. Para tal, pode perder essa respetiva energia de vários processos: radiativo ou não radiativo (Figura A2). No

caso da perda de energia seja de forma radiativa, corresponde à emissão de luz por fluorescência, fosforescência ou uma reação química no estado excitado, caso contrário a perda de energia pode se dar por inúmeros processos não radiativos que incluem conversão térmica, passagem intersistemas para um estado tripuleto, transferência de energia para outra molécula, por exemplo de solvente, entre outros.⁸²

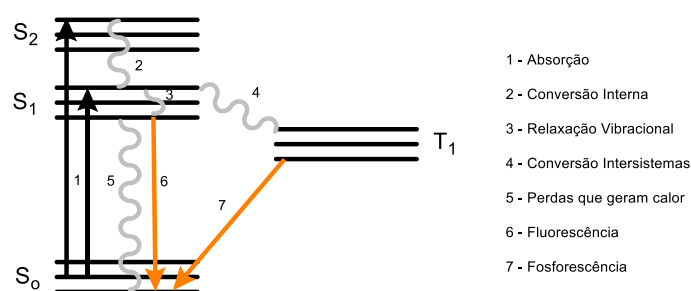


Figura A2. Diagrama de Jablonsky simplificado com as perdas e os ganhos energéticos por parte de uma molécula quando irradiada

O caso mais usual de luminescência é a fluorescência, que corresponde à transição entre estados singuleto, transição esta permitida por simetria. Quando o elétron que se encontra no estado excitado S_1 e pretende voltar ao fundamental, S_0 , começa por perder energia através da relaxação vibracional até alcançar o estado de menor energia de S_1 e depois ocorre a emissão de energia devido à perda de um fóton. Esta energia de emissão será menor que a energia de absorção e é por esta razão que o espectro de emissão se encontra a comprimentos de onda superiores.

A fluorescência das moléculas é altamente sensível a estímulos externos e por isso é uma técnica muito usada para sensores de pH, temperatura, entre outros. O facto de se medir diretamente a fluorescência da amostra, sem o uso de referência e utilizar concentrações muito baixas para manter a linearidade da medida e evitar fenómenos de filtro interno e reabsorção, tornam a técnica de eleição para o estudo de sensores óticos.³⁰

A.1.4 Calorimetria por Titulação Isotérmica

O calor de cada injeção de recetor numa solução de analito é calculado através da integração dos dados brutos (potência) de cada injeção ao longo do tempo, em relação a uma célula de referência. Na figura seguinte observa-se o tratamento de cada calor de injeção individual,

normalizado pela quantidade de titulante injetado, em função da razão molar de titulante/material celular numa célula de amostra.

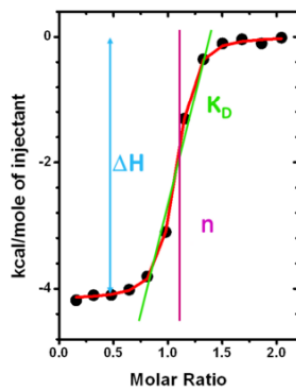


Figura A3. Tratamento de dados por CTI e respectivos parâmetros termodinâmicos (Adaptado⁸³)

Neste caso, a curva é ajustada para um modelo 1:1 e os parâmetros termodinâmicos n (número de locais de ligação), K_D (constante de dissociação do complexo), e ΔH (diferença da entalpia do processo de associação) são retirados da seguinte forma: a entalpia é ajustada diretamente com o calor de 100% da ligação. A estequiometria é indicada pelo ponto médio da titulação. A inclinação do aumento para a saturação está relacionada com a afinidade de ligação. Com estes parâmetros pode-se obter também a Energia Livre de Gibbs (ΔG) e a entropia do sistema (ΔS) pelas seguintes equações:

$$\Delta G = -RT\ln(K_D) \quad (A5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (A6)$$

Para minimizar os erros relativos aos valores de c é necessário que o Parâmetro de Wiseman, c , se encontre entre 10 e 500. Este valor é calculado pela expressão:

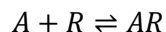
$$c = \frac{n \times [A]}{K_D} \quad (A7)$$

Em que $[A]$ corresponde à concentração do analito presente na célula.

A.2 Cálculo de Constantes de Afinidade, pKa e RQF

A.2.1 Equilíbrio 1:1 Recetor:Analito

O equilíbrio a ser estudado entre um recetor R, e um analito A, para originar o complexo AR é dado pela seguinte expressão:



A constante de afinidade entre dois compostos, K_1 , cujo equilíbrio é 1:1 é dada por:

$$K_1 = \frac{[RA]}{[R][A]} \quad (\text{A8})$$

O balanço de massa das espécies em equilíbrio das diversas espécies é dado pelas seguintes equações:

$$[A]_o = [A] + [RA] \quad (\text{A9})$$

$$[R]_o = [R] + [RA] \quad (\text{A10})$$

Substituindo as concentrações presentes na equação das constantes de afinidade pelo balanço de massas que já foi previamente calculado e trabalhou-se a equação para ficar uma equação de segundo grau em ordem à concentração de recetor do tipo $ax^2+bx+c=0$, $x=[R]$. À constante K_1 é dado um valor arbitrário e a concentração inicial de R e A, $[R]_o$ e $[A]_o$ respetivamente, corresponde à concentração adicionada em cada momento da titulação de cada um dos compostos.

$$K_1[R]^2 + (1 + K_1[A]_o - K_1[R]_o)[R] - [R]_o = 0 \quad (\text{A11})$$

Esta equação pode ser resolvida através da fórmula resolvente:

$$x = \frac{b \pm \sqrt{a-4ac}}{2a} \quad (\text{A12})$$

E substituindo os valores de a, b e c na equação obtêm-se dois valores de $[R]$, o valor que for positivo é o correto. Através da equação x, é possível calcular a concentração de $[RA]$ no equilíbrio e posteriormente retirar concentração de $[A]$ pelo balanço de massas do analito. Desta forma obtêm-se as concentrações das espécies no equilíbrio 1:1.

A.2.2 Equilíbrio 2:1 Recetor:Analito

Quando o equilíbrio envolve mais uma molécula de recetor é necessário utilizar as equações para equilíbrios 2:1 bem como os a equação de constantes de afinidade K_2 , para além da constante K_1 já apresentada:



Através da titulação não é possível saber diretamente as concentrações dos complexos formados e dos compostos na forma livre, mas podem ser retirados através dos balanços de massa das diversas espécies:

$$[R]_o = [R] + [RA] + 2[R_2A] \quad (\text{A14})$$

$$[A]_o = [A] + [RA] + [R_2A] \quad (\text{A15})$$

Quando as equações das constantes de afinidade e balanços de massa se conciliam e quando se coloca tudo em função da concentração do recetor, obtém-se uma equação de terceira ordem do tipo:

$$A[R]^3 + B[R]^2 + C[R] + D = 0 \quad (\text{A16})$$

$$A = K_1 \times K_2$$

$$B = 2K_1K_2[A]_o - K_1K_2[R]_o + K_2$$

$$C = K_2[A]_o - K_1[R]_o + 1$$

$$D = -[R]_o$$

As equações de terceiro grau podem ser resolvidas de diversas formas, o método escolhido foi o de Newton-Raphson, que permite determinar iterativamente as raízes de uma função de acordo com a seguinte equação:⁸⁴

$$x(n+1) = x(n) - \frac{f(x)}{f'(x)} \quad (\text{A17})$$

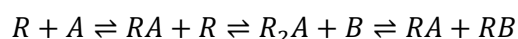
Este método pretende convergir a diferença apresentada até que não haja nenhuma mudança relevante. No caso em estudo, o primeiro valor de $x(n)$ utilizado foi $[R]_o$, $f(x)$ corresponde à resolução da equação x com o valor de $x(n)$ e $f'(x)$ é a derivada da função presente na equação x :

$$f'(x) = 3A[R]^2 + 2B[R] + C \quad (\text{A18})$$

A solução obtida é utilizada novamente e este processo repete-se até a diferença da equação x não se alterar (quando $x(n+1) \sim x(n)$). A partir do valor de $[R]$ é possível determinar os valores de $[A]$, $[AR]$, $[R_2A]$.

A.2.3 Competição de um competidor no equilíbrio 2:1

Para entender a extensão da interação com os competidores, é necessário saber a constante de afinidade do competidor, B , com o recetor, R , definida como K_3 , tendo em conta as restantes constantes de afinidade do cavitando com o corante, A .



O equilíbrio simplificado entre o competidor e recetor pode ser escrito através da equação da constante de equilíbrio K_3 :

$$K_3 = \frac{[R][B]}{[RB]} \quad (A19)$$

O balanço de massa de todos os constituintes encontra-se nas equações abaixo:

$$[R]_o = [R] + [RA] + 2[R_2A] + [RB] \quad (A20)$$

$$[A]_o = [A] + [RA] + [R_2A] \quad (A21)$$

$$[B]_o = [B] + [RB] \quad (A22)$$

A partir das equações das constantes de afinidade e dos balanços de massa foi possível substituir as incógnitas do balanço de massas e obter uma equação do quarto grau, cuja incógnita é $[R]$. A equação final encontra-se presente na equação 23:

$$a[R]^4 + b[R]^3 + c[R]^2 + d[R] + e = 0 \quad (A23)$$

$$a = K_1 K_2 K_3$$

$$b = -K_1 K_2 K_3 [R]_o + K_1 K_2 + K_1 K_2 + 2K_1 K_2 K_3 [A]_o + K_1 K_2 K_3 [B]_o$$

$$c = -K_1 K_3 [R]_o - K_1 K_2 [R]_o + K_1 + K_3 + K_1 K_3 [A]_o + 2K_1 K_2 [A]_o + 2K_1 K_3 [B]_o$$

$$d = -K_3 [R]_o + K_1 [R]_o + 1 + K_1 [A]_o + K_3 [B]_o$$

$$e = -[R]_o$$

O passo seguinte é resolver iterativamente a função de Newton até a mesma convergir, como se encontra na equação 24. Neste caso a derivada da função é:

$$4a[R]^3 + 3b[R]^2 + 2c[R] + d = 0 \quad (A24)$$

O valor de $[R]$ no equilíbrio é conhecido e a partir deste é possível determinar as restantes concentrações das diversas espécies no equilíbrio.

A.2.4 Ajuste dos dados experimentais

A contribuição da absorção a um determinado comprimento de onda é dada pelo somatório das frações molares dos compostos e multiplicado pela sua absorção nesse comprimento de onda.

$$A(\lambda) = \sum X_n A_n(\lambda) \quad (\text{A25})$$

No caso da emissão é necessário fazer primeiro uma correção da emissão. A intensidade necessita de ser corrigidas uma vez que nos comprimentos de onda escolhidos, que são os pontos isobésticos de cada equilíbrio mas como existe a absorção diferente de outras espécies de outros equilíbrios, e por isso é preciso ter em conta o fator da absorção de luz por parte da amostra, tal como mostrado na equação 26.⁸⁵

$$I_{norm} = \frac{I}{I_{m\acute{a}x}(1-10^{-Abs})} \quad (\text{A26})$$

A emissão total calculada para um determinado comprimento de onda de excitação e seguindo a um determinado comprimento de onda de emissão escolhido, $I(\lambda)$ é a soma ponderada de todas as intensidades de emissão das espécies.

$$I(\lambda) = \sum X_n I_n(\lambda) \quad (\text{A27})$$

Tendo o valor da absorvância ou emissão experimentais, calculam-se os mínimos quadrados entre o valor da absorção ou emissão calculada e o valor experimental. A soma destes valores para todas as concentrações é otimizada para ser a menor possível através da ferramenta *solver*, que otimiza parâmetros como a constante de afinidade K_3 , a absorção/intensidade das espécies para serem os mais semelhantes aos dados experimentais, desta forma obtém-se o valor da constante de afinidade, K_3 .⁸⁶

A.2.5 Cálculo do pKa

Para realizar o tratamento de uma titulação ácido base em que uma espécie, A, é protonada com um ácido forte, H, é necessário ter em conta a equação da associação do ácido:

$$Ka = \frac{[H][A]}{[HA]} \quad (\text{A28})$$

A concentração de A inicial, isto é, do corante desprotonado pode ser expressa como:

$$[A]_o = [A] + [AH] \quad (\text{A29})$$

Rearranjado as duas equações anteriores é possível obter a concentração de A ao longo da titulação:

$$[A] = \frac{[A]_0 \times K_a}{[H] + K_a} \quad (A30)$$

Pela equação A28 obtém-se também a concentração do ácido no equilíbrio e com estas concentração é possível monitorizar os dados ao longo do tempo e obter o valor da constante de associação do ácido. Matematicamente, pode-se rearranjar as equações para se obter o valor de pKa, correspondente ao logaritmo da dissociação.

A.2.6 Rendimento Quântico de Fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência é dado pela seguinte fração:

$$\Phi = \frac{n^\circ \text{ fotões } \frac{\text{emitidos}}{\text{área}} / s}{n^\circ \text{ fotões } \frac{\text{absorvidos}}{\text{área}} / s} \quad (A31)$$

O RQF pode ser determinado diretamente através desta expressão, caso se utilize uma esfera integradora acoplada num espectralfluorímetro. Este equipamento permite refletir a luz que chega à amostra pela superfície da esfera e assim obter a totalidade dos fotões que conseguem emitir luz, o que permite ter uma medida o mais correta possível do poder radiativo da amostra.⁸⁷

Um espectralfluorímetro convencional apenas é capaz de detetar uma fração da luz que é emitida pela amostra porque o instrumento apenas extrai o número de fotões emitidos a um determinado ângulo fixo. Existem maneiras de contornar este processo através de formas indiretas como por exemplo a determinação da quantidade de calor que é gerado pelo sistema quando a molécula passa do estado excitado para o estado fundamental, mas a forma mais usual consiste em utilizar uma molécula com fluorescência e que seja utilizada como referência para o estudo (r). A referência é uma molécula com um rendimento quântico conhecido e devidamente quantificado e é utilizado para determinar indiretamente o rendimento da amostra em estudo. Por norma, estas moléculas têm coeficientes de extinção molar elevados e por isso absorvem muita luz e também são corantes fluorescentes, com bandas estreitas e pequenos desvios de Stokes. É necessário que o comprimento de onda de excitação seja igual para ambas as moléculas e que a sua absorvância seja semelhante ao comprimento de onda de excitação.⁸⁸

Assim o cálculo do RQF de uma amostra desconhecida (a) pode ser simplificado para a seguinte equação:

$$\frac{\Phi_a}{\Phi_r} = \frac{I_a/A_a}{I_r/A_r} \quad (\text{A32})$$

I corresponde à intensidade de fluorescência, experimentalmente corresponde à área da banda de emissão do composto. Como a absorvância da amostra, A, e da referência não é exatamente igual no comprimento de onda de excitação e como é dependente da transmitância, a mesma equação pode ser corrigida da seguinte forma:

$$\frac{\Phi_a}{\Phi_r} = \frac{I_a \times (1 - 10^{-A_r})}{I_r \times (1 - 10^{-A_a})} \quad (\text{A33})$$

Por último, resta ter em conta o índice de refração do solvente (n_i) da amostra e da referência, caso seja diferente, de forma a corrigir a diferença de luz que é refratada pela amostra.

$$\frac{\Phi_a}{\Phi_r} = \frac{I_a \times (1 - 10^{-A_r})}{I_r \times (1 - 10^{-A_a})} \times \frac{n_{i_a}^2}{n_{i_r}^2} \quad (\text{A34})$$

A.3 Caracterização por ^1H RMN

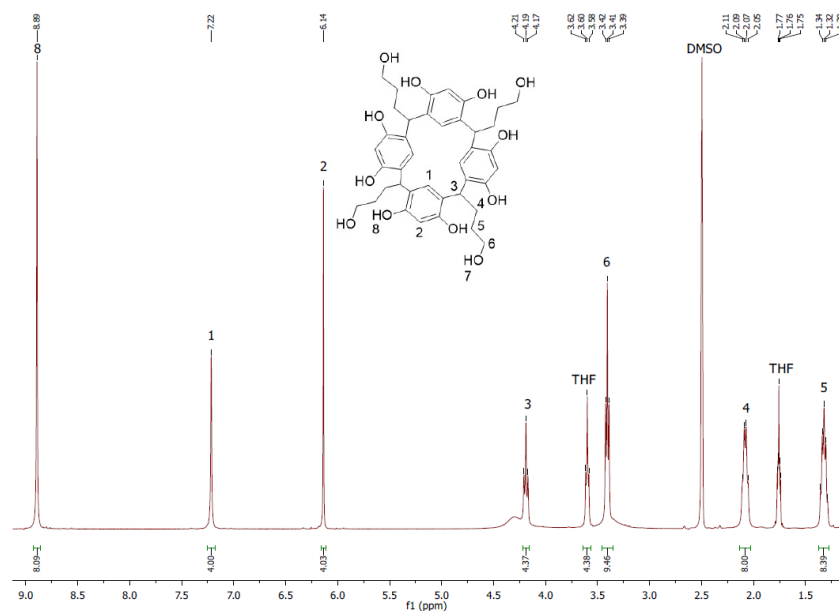


Figura A4. RMN ^1H do composto 1.1, em DMSO

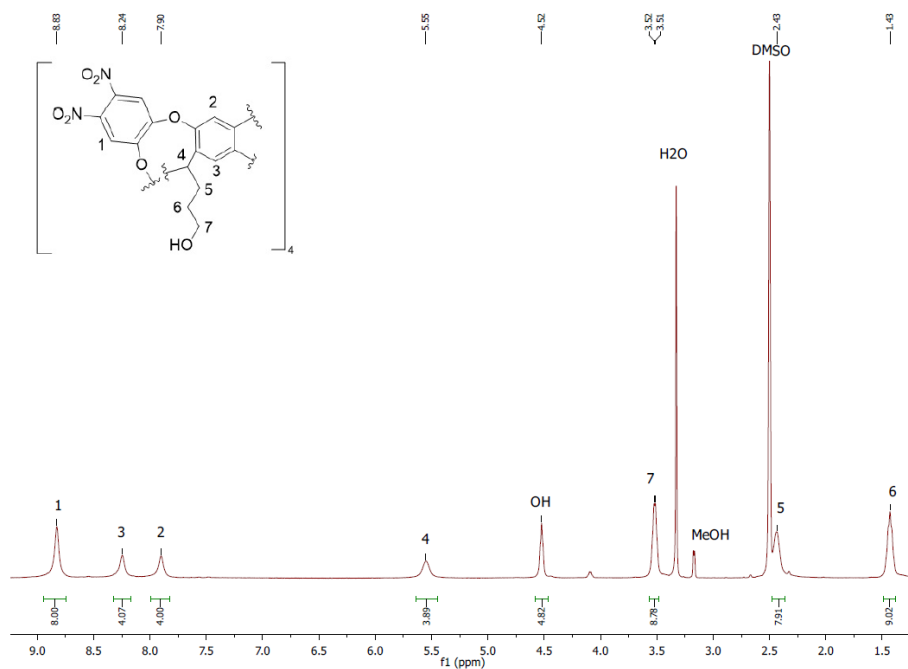


Figura A5. RMN ^1H do composto 1.2, em DMSO

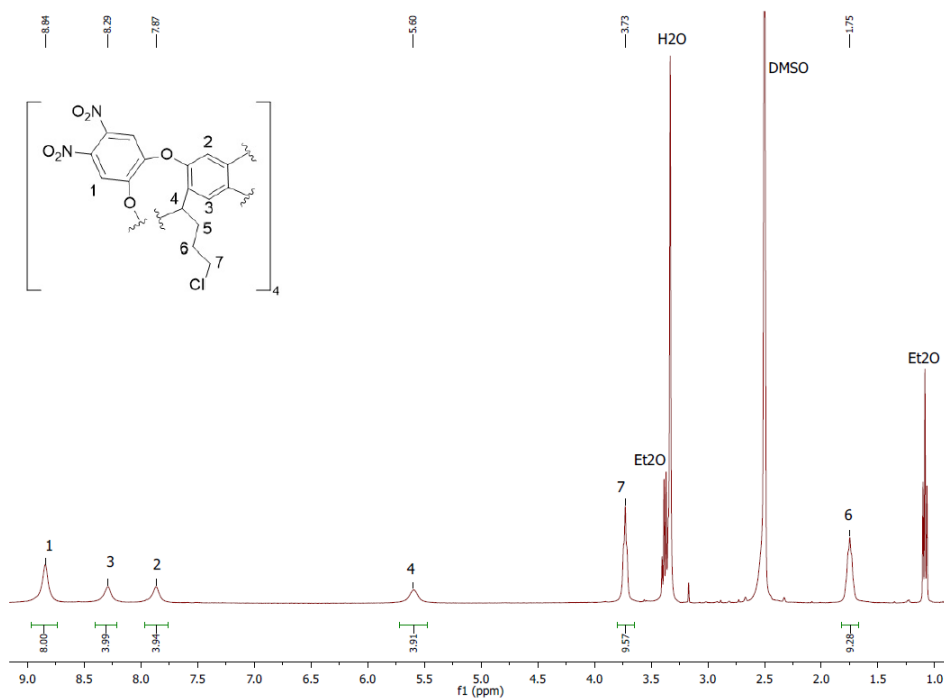


Figura A6. RMN ¹H do composto 1.3, em DMSO

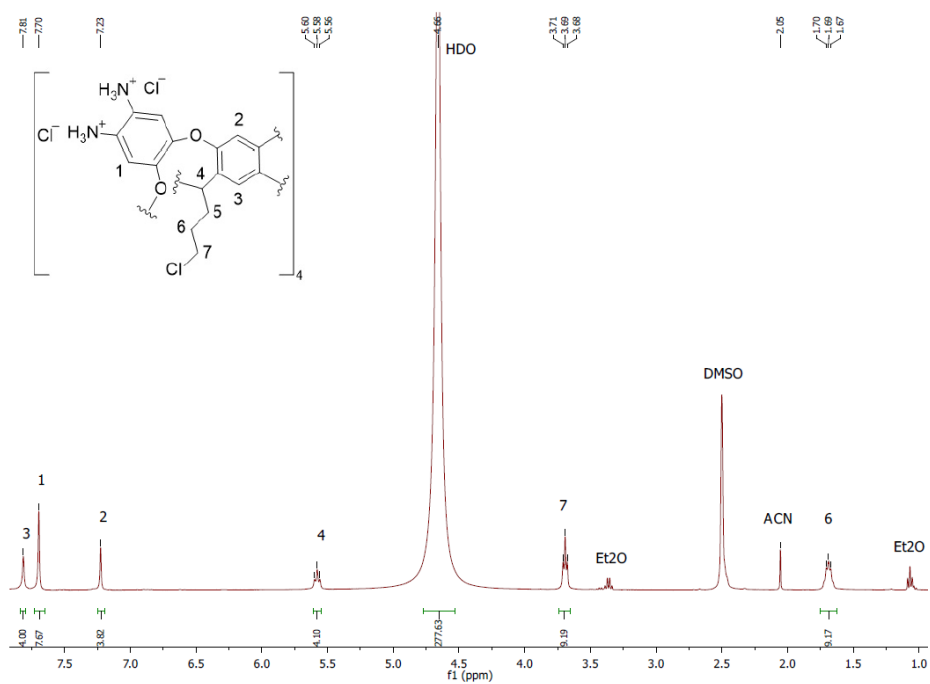


Figura A7. RMN ¹H do composto 1.4, em DMSO

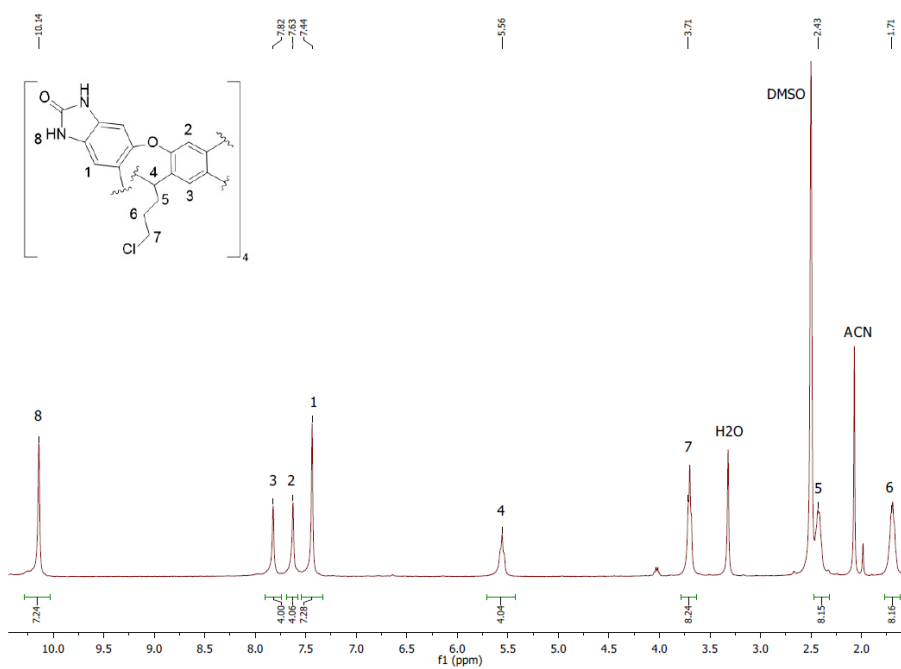


Figura A8. RMN ^1H do composto 1.5, em DMSO

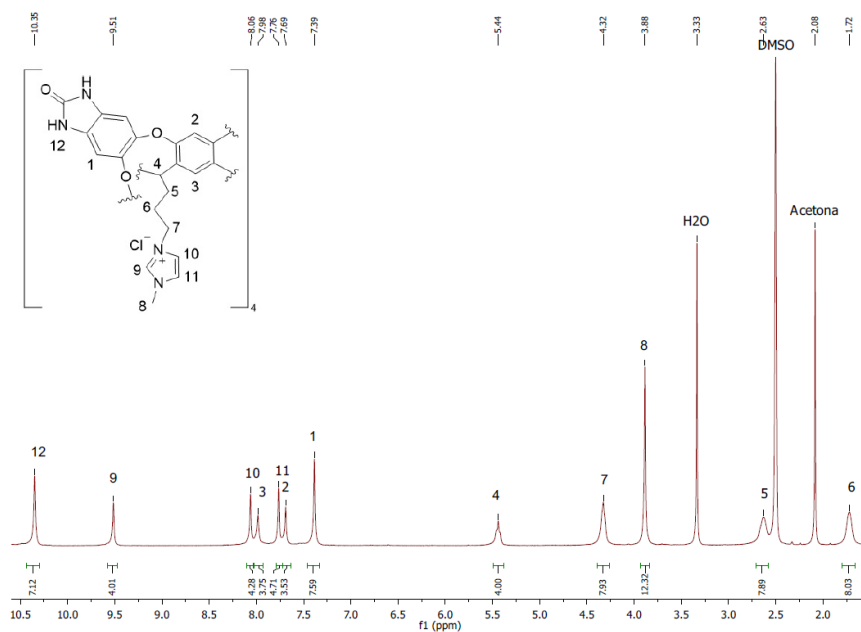


Figura A9. RMN ^1H do composto C1, em DMSO

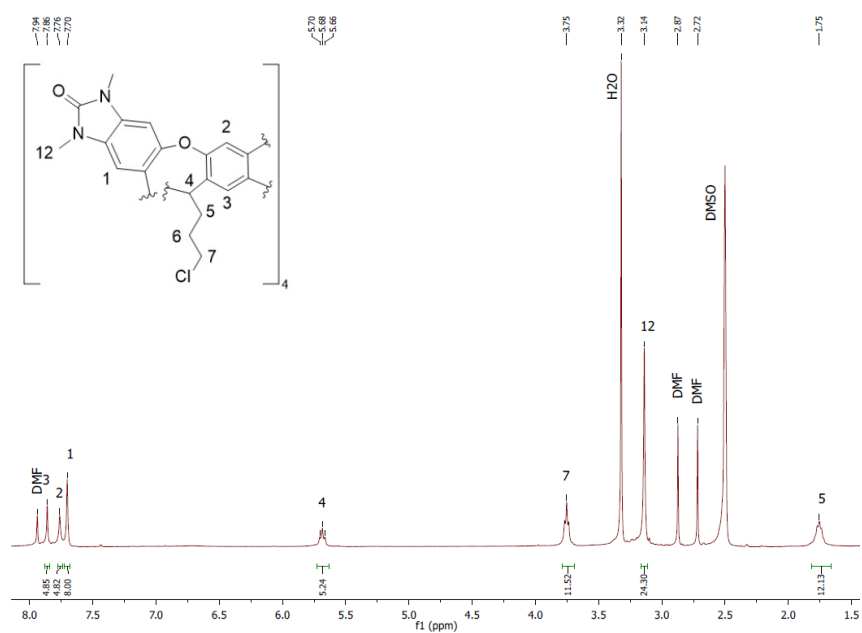


Figura A10. RMN ¹H do composto 2.1, em DMSO

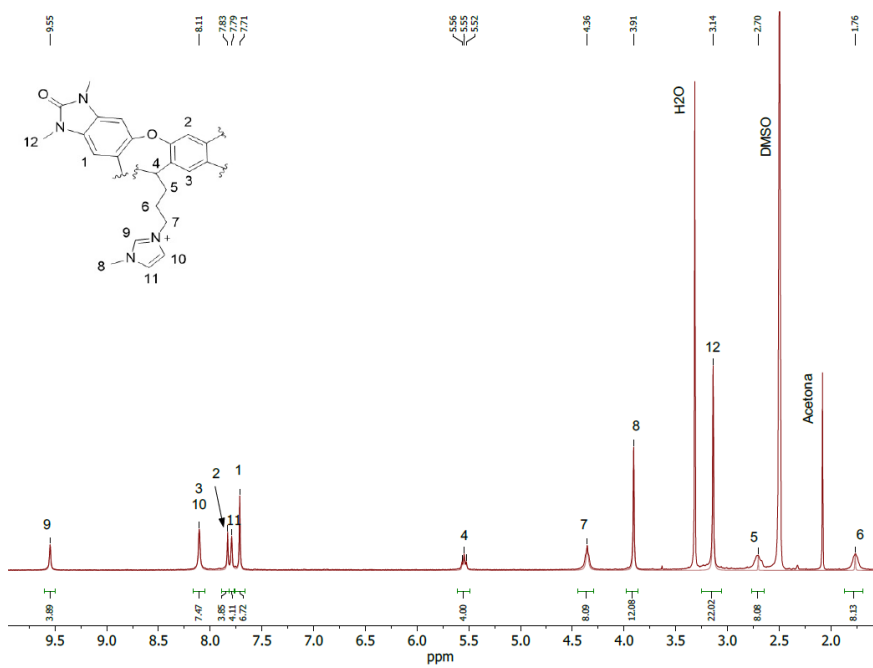


Figura A11. RMN ¹H do composto C2, em DMSO

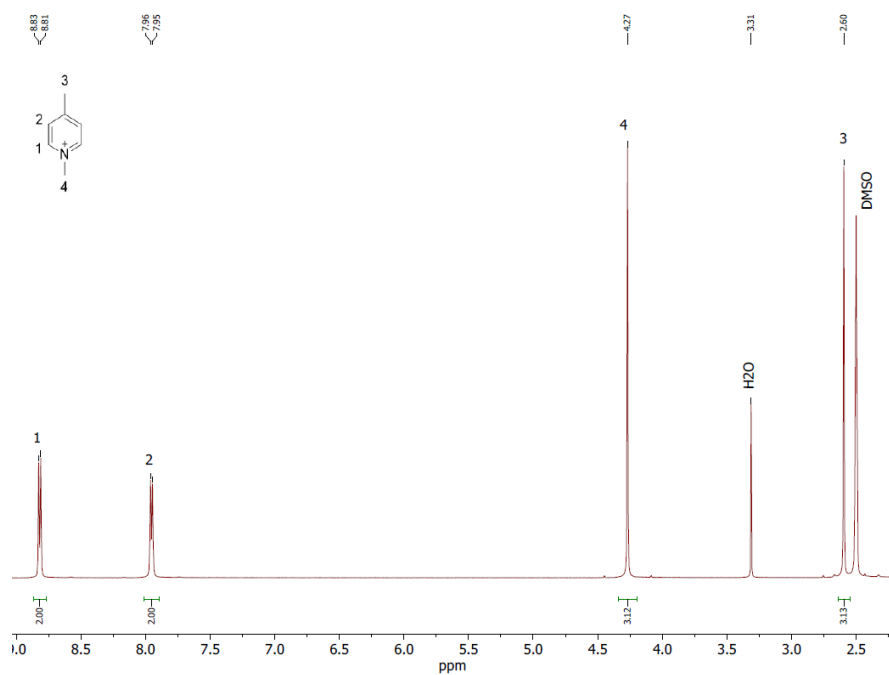


Figura A12. RMN ¹H do composto 3.1, em DMSO

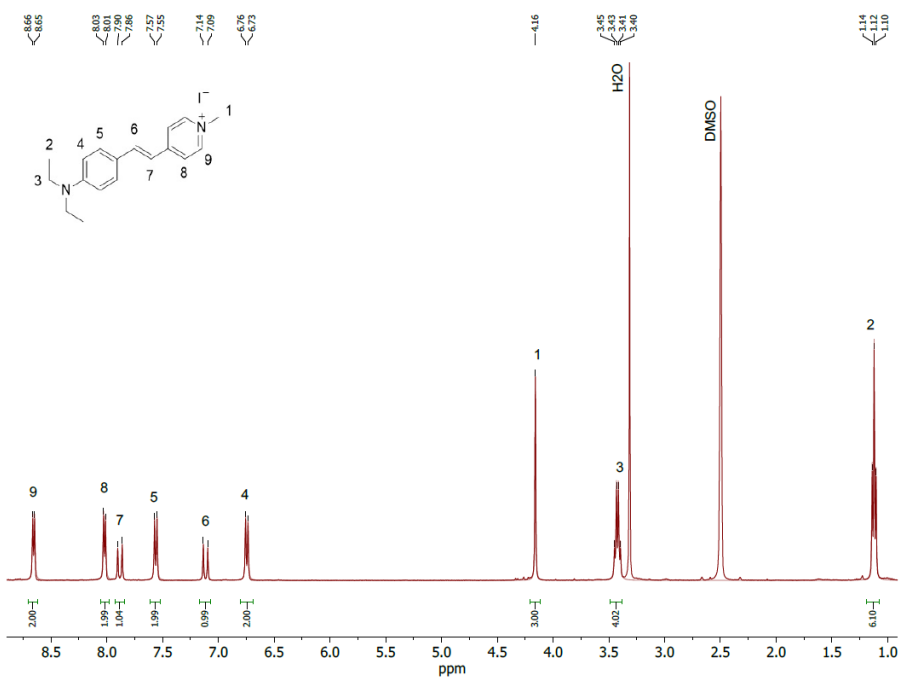


Figura A13. RMN ¹H do composto 3.2 (EtDASPI), em DMSO

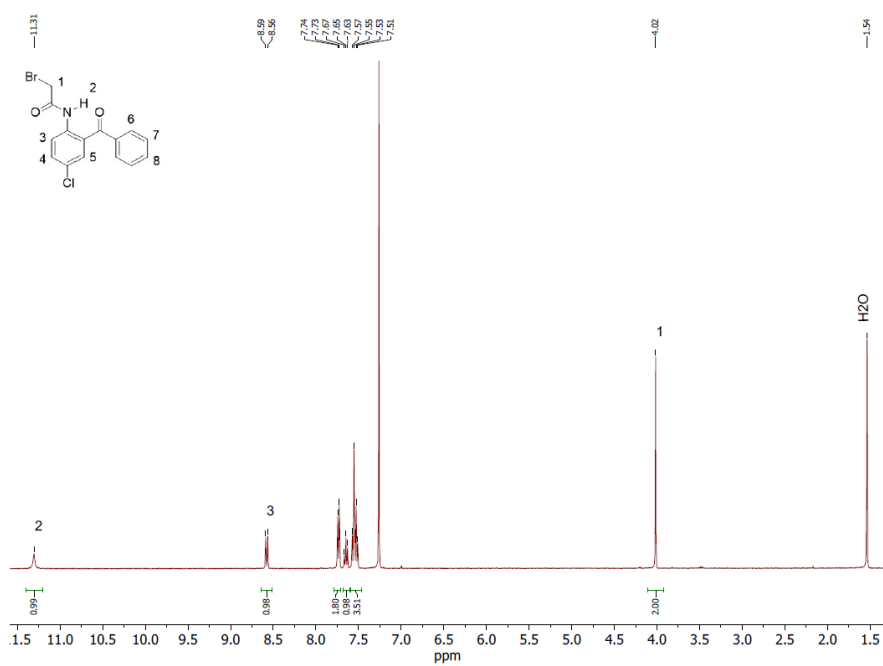


Figura A14. RMN ^1H do composto 4.1, em CDCl_3

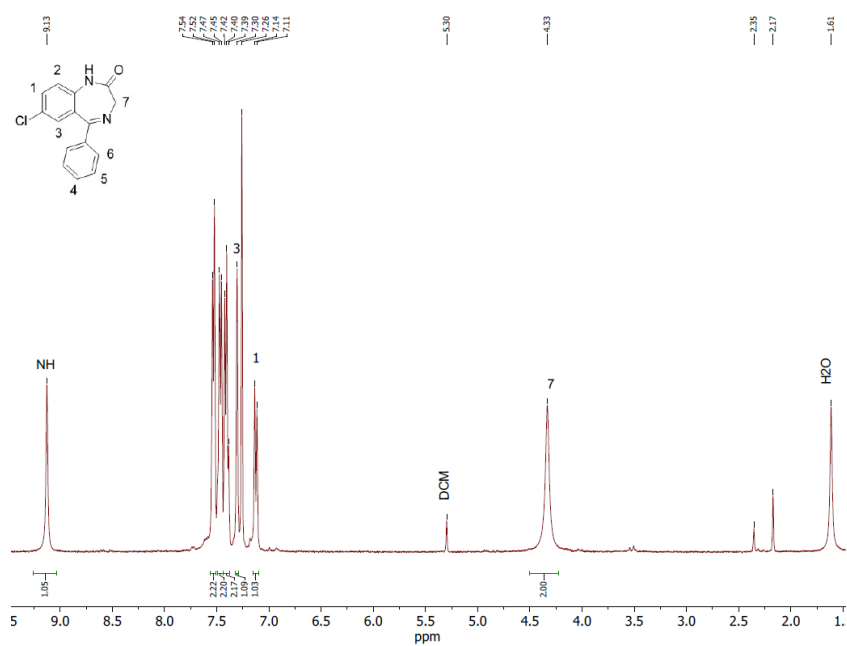


Figura A15. RMN ^1H do composto BZD1, em CDCl_3

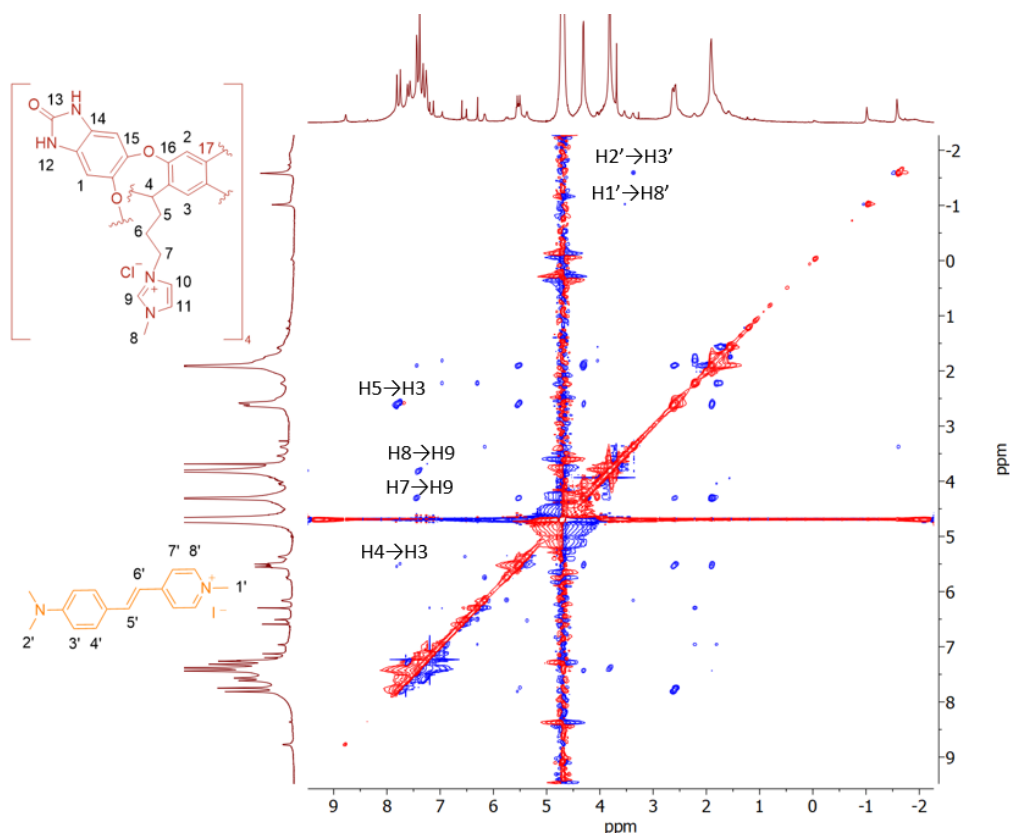


Figura A16. ^1H - ^1H ROESY do equilíbrio 2:1 C1:MeDASPI em D_2O

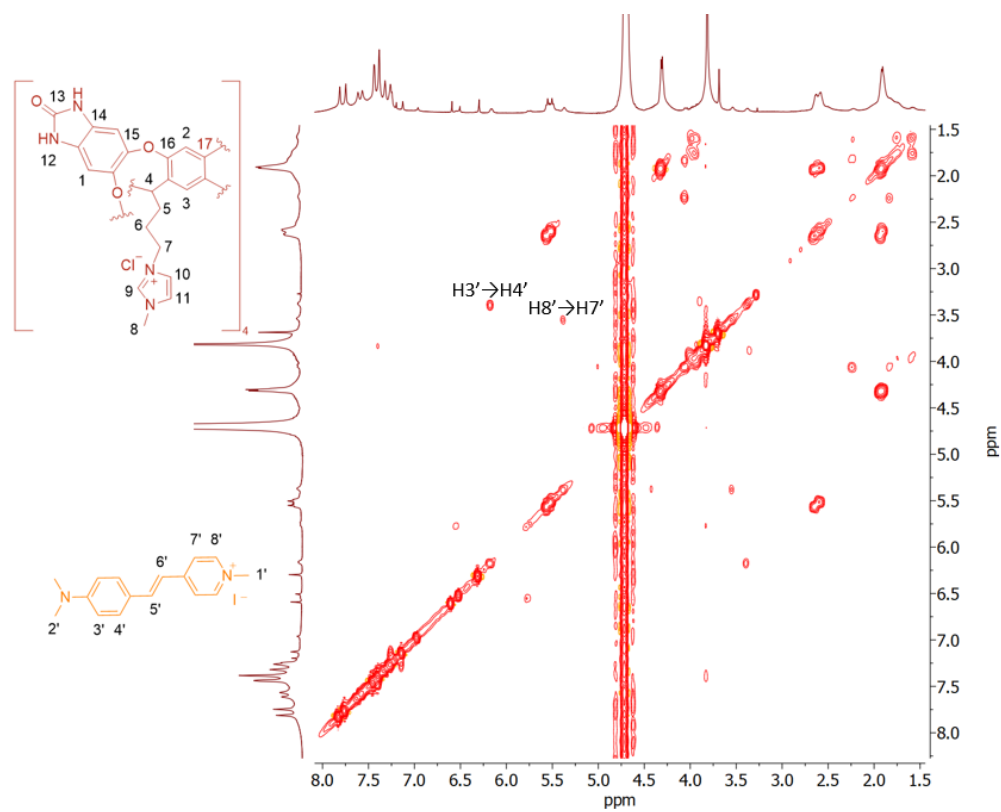


Figura 17. ^1H - ^1H COSY do equilíbrio 2:1 C1:MeDASPI em D_2O

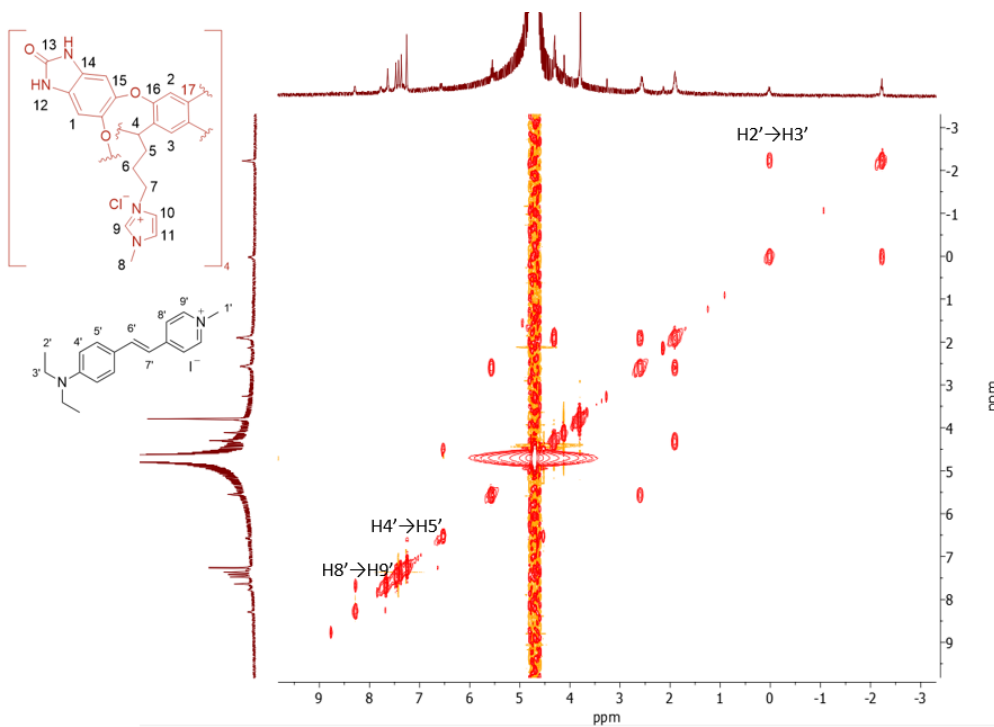


Figura A18. ^1H - ^1H COSY do equilíbrio 1:1 C1:EtDASPI em D_2O

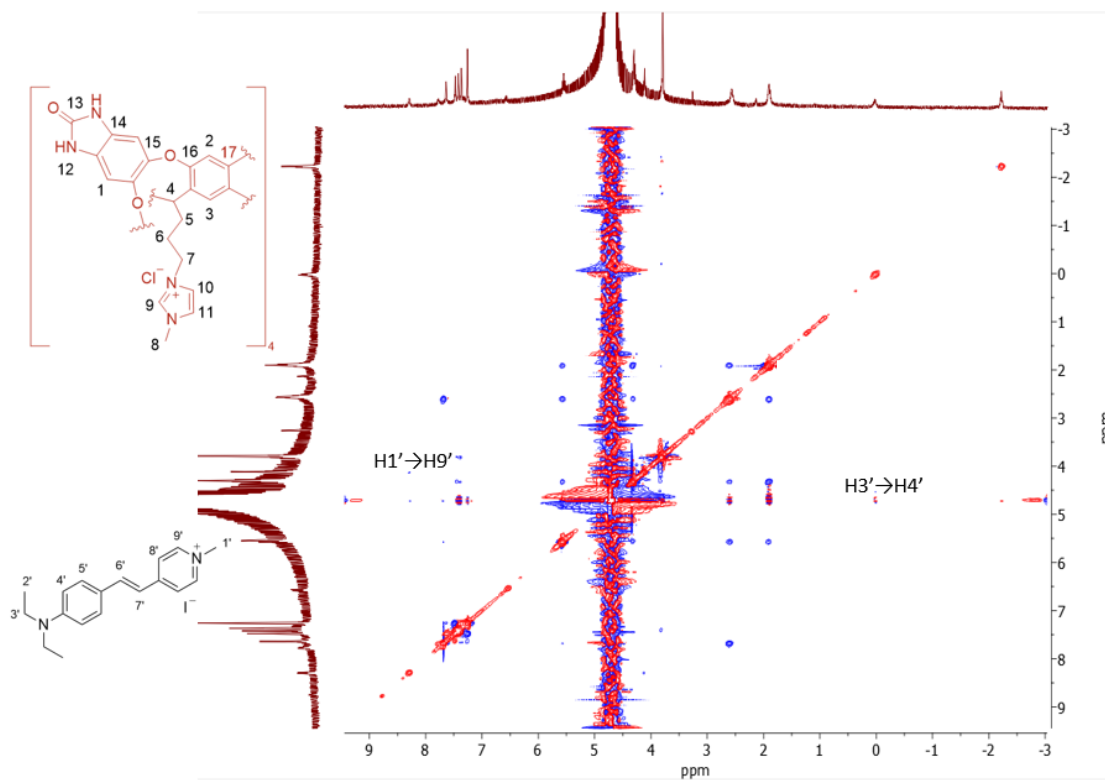


Figura A19. ^1H - ^1H ROESY do equilíbrio 1:1 C1:EtDASPI em D_2O

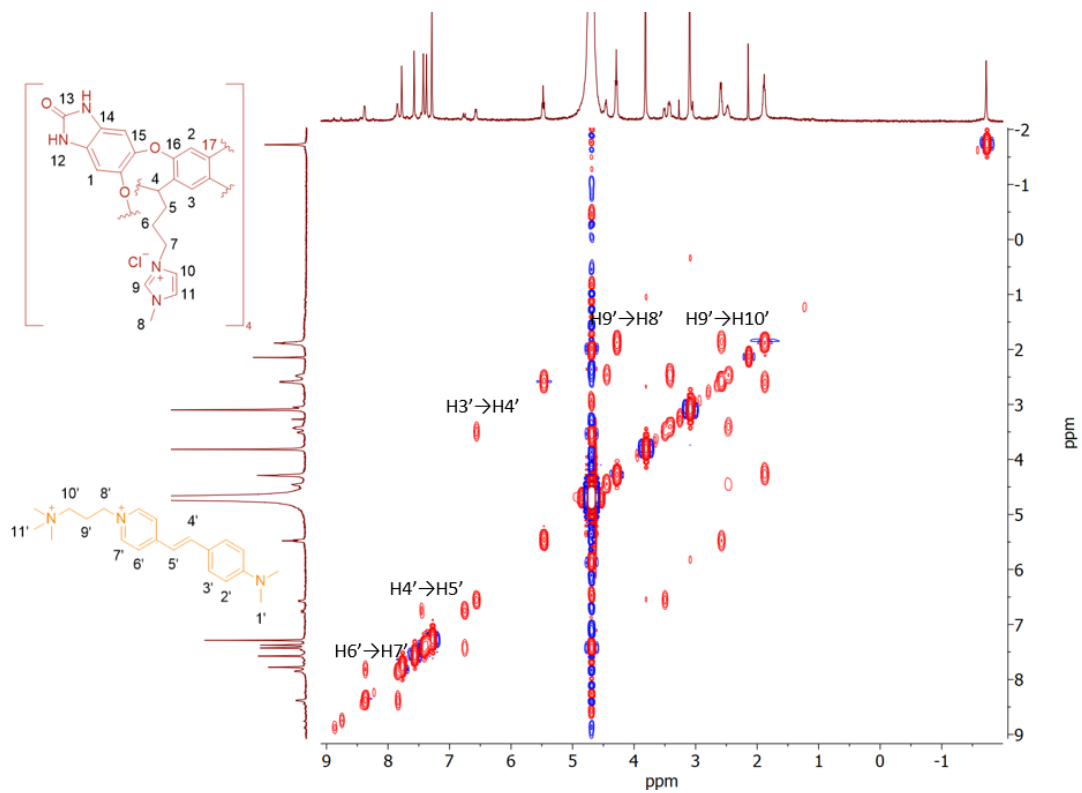


Figura A20. ¹H-¹H ROESY do equilíbrio 1:1 C1:JDASPI em D₂O

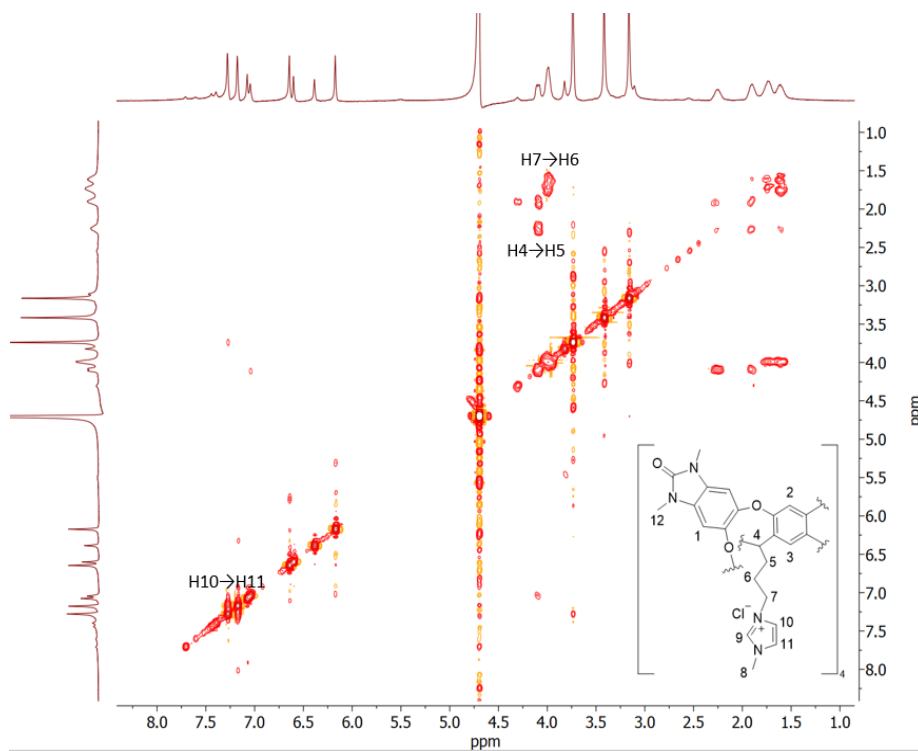


Figura A21. ¹H-¹H COSY do cavitando C2, em D₂O

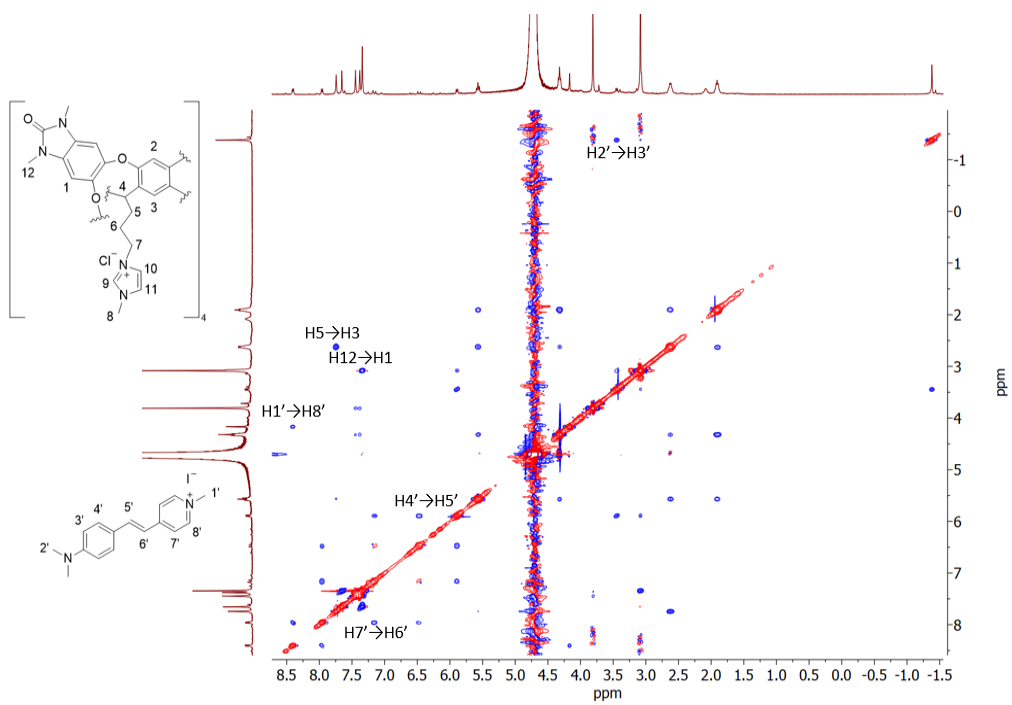


Figura A24. ^1H - ^1H ROESY do complexo C2:MeDASPI, em D_2O

A.5 Caracterização por UV-Vis e Emissão

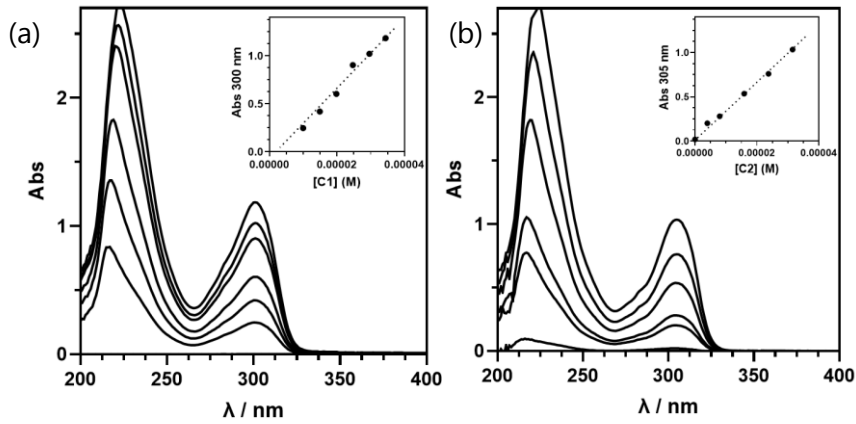


Figura A25. Espectro de Absorção de (a) C1 e (b) C2 com concentrações superiores em água. Cálculo do coeficiente de extinção molar de C1 a 300 nm originou um valor de $33739 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Cálculo do coeficiente de extinção molar de C2 a 305 nm originou um valor de $32956 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

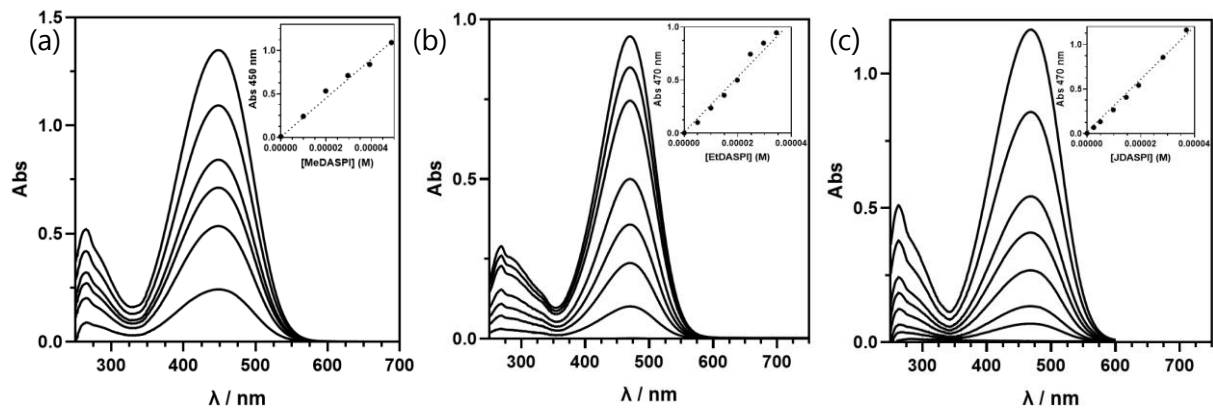


Figura A26. Espectro de Absorção de (a) MeDASPI, (b) EtDASPI e (c) JDASPI com concentrações superiores em água. Cálculo do coeficiente de extinção molar a 450 nm originou um valor de $22923 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para MeDASPI, $27654 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 470 nm para EtDASPI e $30244 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 470 nm para JDASPI.

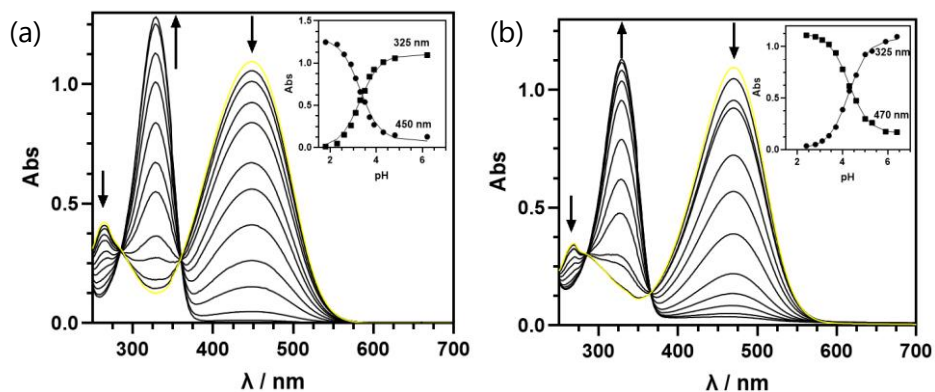


Figura A27. Espectros de Absorção do (a) MeDASPI e (b) EtDASPI (4×10^{-5} M, em água), obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de HCl (Do espectro a amarelo iniciou-se a titulação a $\text{pH} > 6$ e terminou com $\text{pH} < 2$. O ajuste para obtenção do pK_a através dos máximos de absorção também se encontra presente

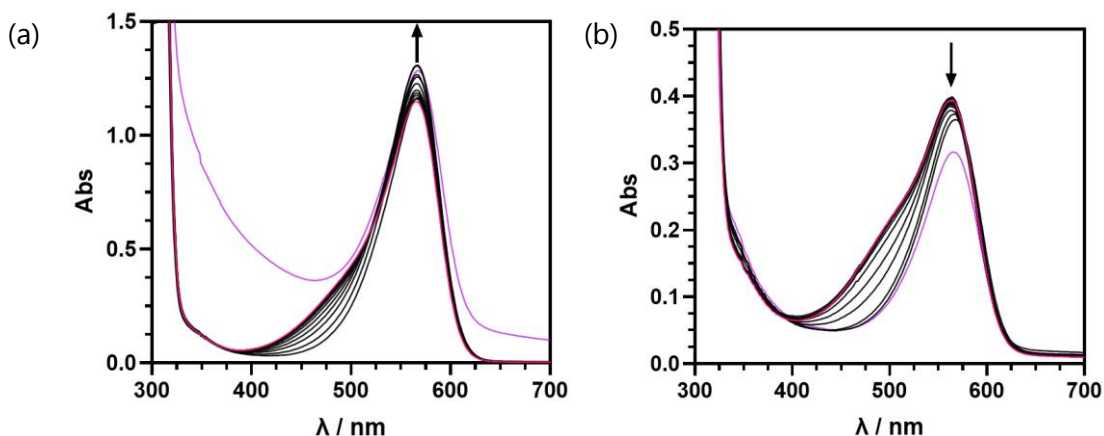


Figura A28. Espectros de Absorção do (a) $\text{C}_{12}\text{MeDASPI}$ e (b) $\text{C}_{12}\text{EtDASPI}$, em água, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de HCl (Do espectro a rosa iniciou-se a titulação a $\text{pH} > 6$ e terminou com $\text{pH} < 2$, espectro a roxo).

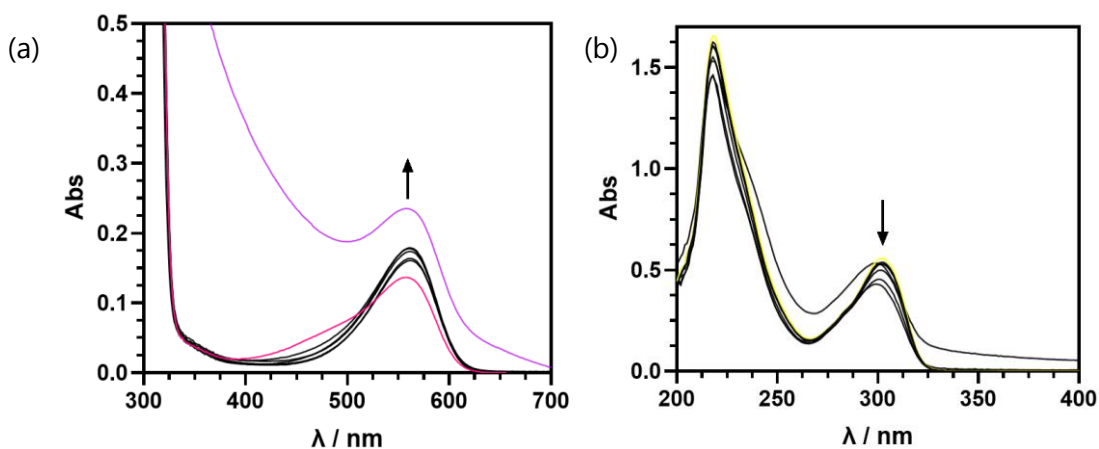


Figura A29. Espectros de Absorção de (a) $\text{C}_{12}\text{EtDASPI}$ (8×10^{-5} M ou 6×10^{-6} M respectivamente) em água, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de NaCl (Do espectro a rosa iniciou-se a titulação e terminou com 100 mM, espectro a roxo) (b) C1 (2×10^{-5} M), em água, obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de HCl (Do espectro a amarelo iniciou-se a titulação e terminou com 250 mM).

A.6 Indicator Displacement Assay

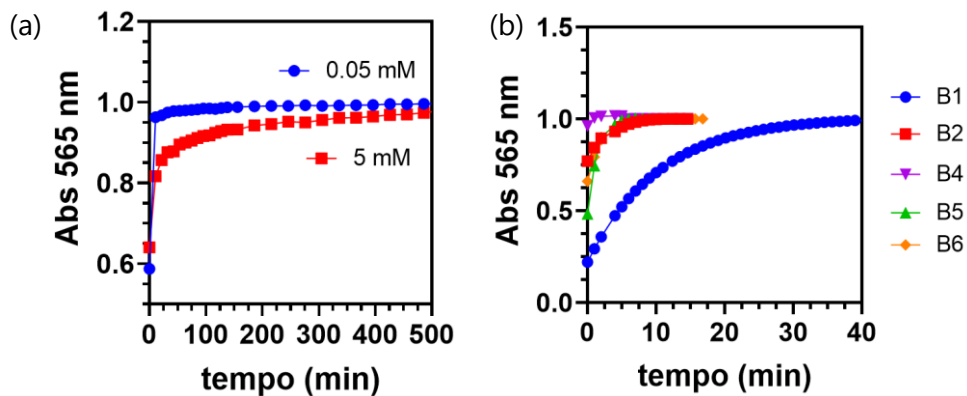


Figura A30. Espectro das absorvância fixado a 565 nm de (a) o competidor adamantanamina com o complexo C₁₂MeDASPI ao longo do tempo a diferentes concentrações e (b) dos competidores (com concentrações fixas de competidor 2.5×10⁻⁵ M) com o complexo C₁₂MeDASPI ao longo do tempo,

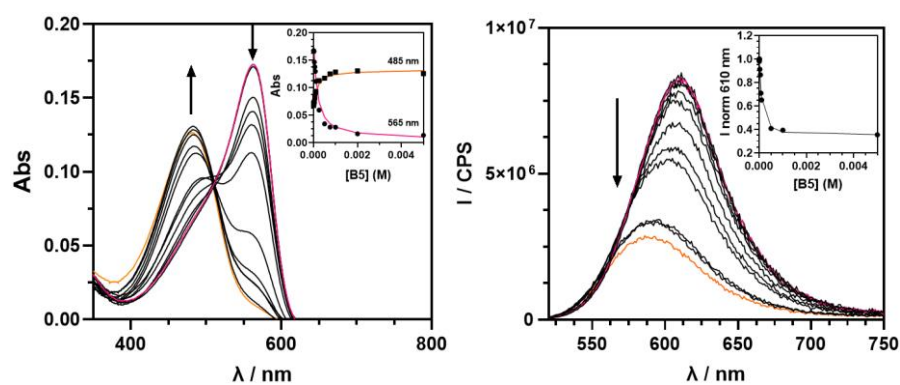


Figura A31. Espectro de UV-Visível e Emissão ($\lambda_{ex}=510$ nm) da titulação de uma solução C₁₂MeDASPI (8×10⁻⁵ M ou 6×10⁻⁶ M respetivamente) quando adicionado concentrações crescentes de adamantanamina à solução, em água. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.

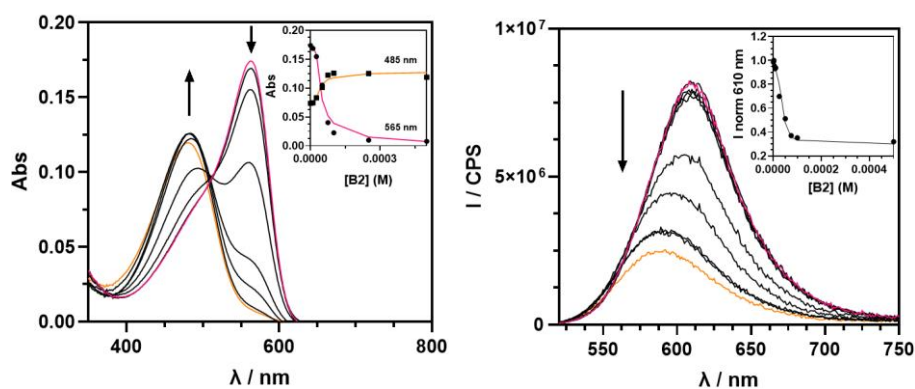


Figura A32. Espectro de UV-Visível e Emissão ($\lambda_{ex}=510$ nm) da titulação de uma solução $C_{12}MeDASPI$ (8×10^{-5} M ou 6×10^{-6} M respectivamente) quando adicionado concentrações crescentes de ciclohexanona à solução, em água. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. O *ajuste* dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.

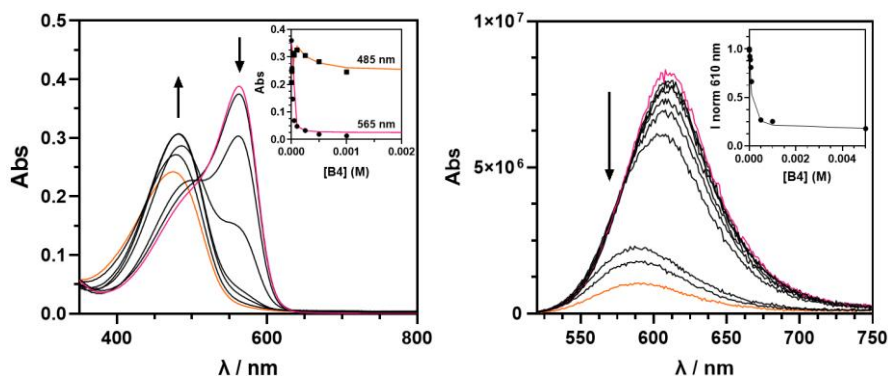


Figura A33. Espectro de UV-Visível e Emissão ($\lambda_{ex}=510$ nm) da titulação de uma solução $C_{12}MeDASPI$ (8×10^{-5} M ou 6×10^{-6} M respectivamente) quando adicionado concentrações crescentes de dimetilnilina à solução, em água. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.

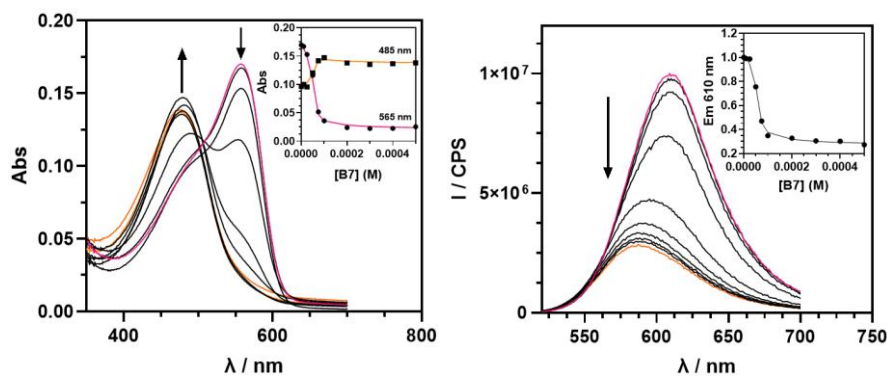


Figura A34. Espectro de UV-Visível e Emissão ($\lambda_{ex}=510$ nm) da titulação de uma solução $C_{12}MeDASPI$ (8×10^{-5} M ou 6×10^{-6} M respectivamente) quando adicionado concentrações crescentes de adamantol à solução, em água. A titulação inicia-se no espectro a rosa e termina no espectro a laranja. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.

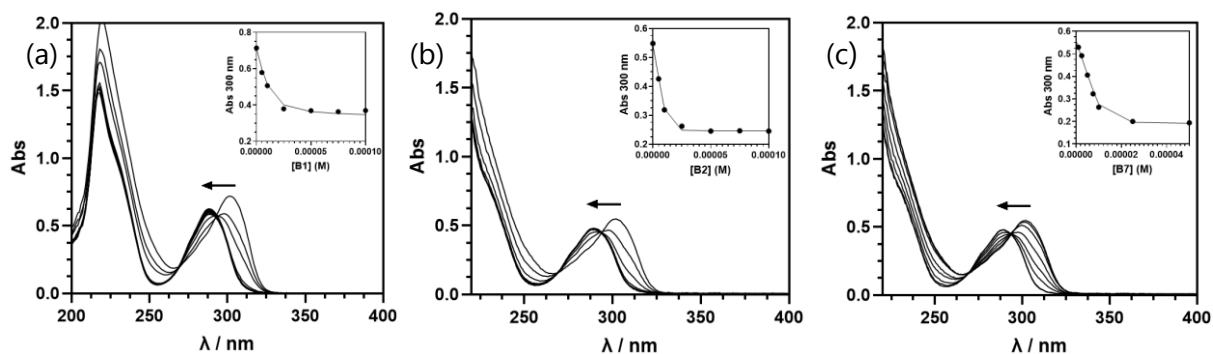


Figura A35. Espectro de UV-Visível da titulação de C1 (2×10^{-5} M), em água, com adição do competidor (a) adamantamina, (b) ciclohexanona e (c) adamantol e respectivos dados experimentais e dados calculados da titulação para o comprimento de onda fixo a 300 nm, em água.

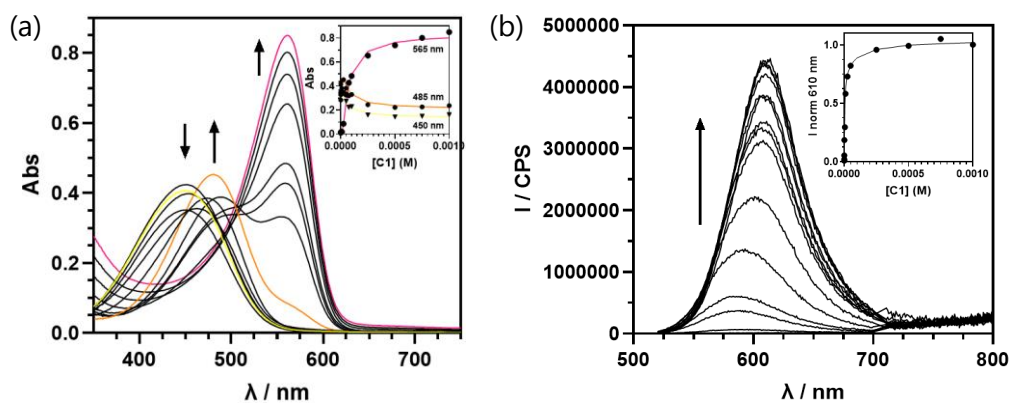


Figura A36. (a) Espectro de UV-Visível da titulação de uma solução de MeDASPI (2×10^{-5} M) quando adicionado concentrações crescentes de C1 à solução, em 5% Metanol. A titulação inicia-se no espectro a amarelo e termina no espectro a rosa. (b) Espectro de Emissão ($\lambda_{ex} = 510$ nm) da titulação de uma solução de MeDASPI (2×10^{-6} M) quando adicionado concentrações crescentes de C1 à solução, em 5% Metanol. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do cavitando com o corante também se encontra presente.

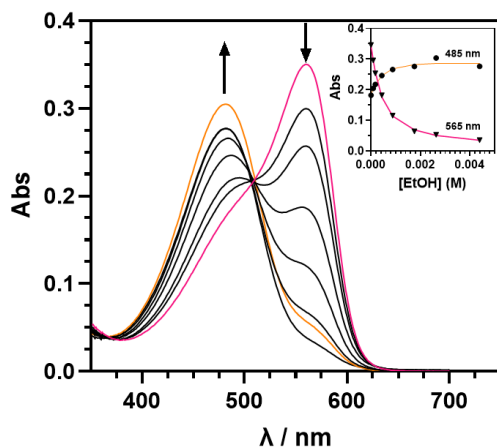


Figura A37. Espectro de UV-Visível da titulação de uma solução 2:1 C1:MeDASPI quando adicionado concentrações crescentes de etanol à solução, num solução aquosa. A titulação inicia-se no espectro a amarelo e termina no espectro a rosa. O ajuste dos dados experimentais da titulação da associação do competidor com o corante também se encontra presente.

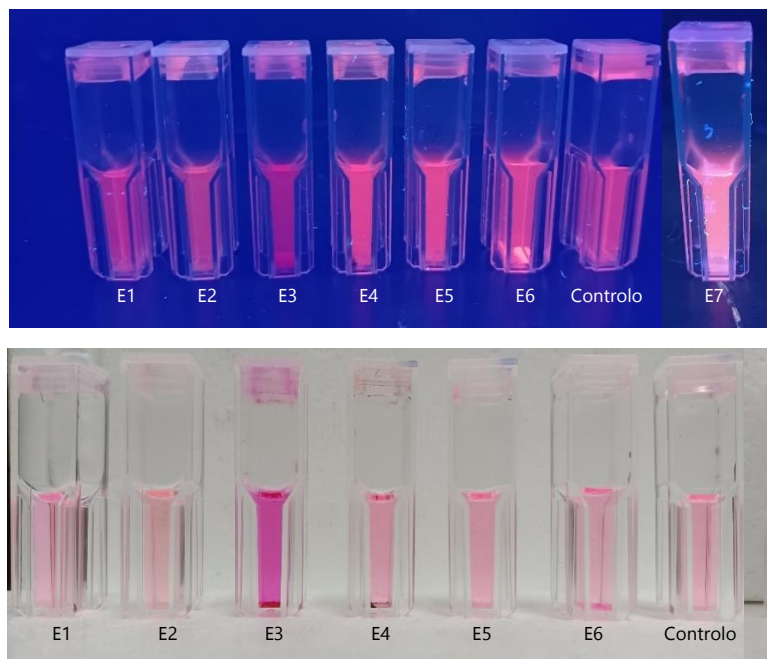


Figura A38. Registo fotográfico da solução C₁₂MeDASPI na presença de sete excipientes encontrados em comprimidos de benzodiazepinas, numa solução 10% MeOH com e sem irradiação a 366 nm

COMUNICAÇÕES ORAIS

Ao longo da dissertação foram várias as oportunidades para apresentar o meu trabalho e a sua evolução.

Em setembro participei na Edição "Verão com Ciência 2022", desenvolvida pelo REQUIMTE. No final do mês de estágio apresentei o meu trabalho "*Design and synthesis of a water-soluble receptor for the recognition of Benzodiazepines*", que incidiu preliminarmente na síntese dos recetores utilizados neste trabalho.

Em fevereiro, realizei duas comunicações orais, nas Jornadas da Química, organizadas pelo Núcleo de Química Aplicada e nas Jornadas Intercalares de Mestrado do Departamento de Química da FCT NOVA., onde foi possível apresentar a síntese e caracterização dos recetores com diversas estiril cianinas.

Em março, apresentei o meu trabalho em comunicação oral no Encontro Nacional de Estudantes de Química, no Porto onde foi possível incidir sobre o tema dos ensaios de competição com diversos analitos "*Using water-soluble Cavitands in Fluorescent Indicator Displacement Assays*".

No mesmo mês pude participar no Encontro Nacional de Química Física, realizado pela Sociedade Portuguesa de Química que decorreu de forma online. Realizei uma vez mais uma comunicação oral com o título "*Study of deep cavity cavitand encapsulation of fluorescent dyes in aqueous media*".

Por fim, em julho decorreu o Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, em Aveiro e apresentei o culminar do trabalho com dados para o desenvolvimento de um quimiossensor com sensibilidade para benzodiazepinas, intitulado "*Indicator Displacement Assays using Water-soluble Deep Cavity Cavitands for the detection of Benzodiazepines*".



2023

BEATRIZ RAIMUNDO

FLUORESCENT CHEMOSENSOR ENSEMBLE FOR THE DETECTION OF
BENZODIAZEPINES IN AQUEOUS MEDIA