



ROBSON AUGUSTO PEREIRA

**ESTUDO TEÓRICO DE COMPOSTOS DE
INCLUSÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E
DICAMBA EM β -CICLODEXTRINA**

**LAVRAS-MG
2016**

ROBSON AUGUSTO PEREIRA

**ESTUDO TEÓRICO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO DOS
HERBICIDAS 2,4-D E DICAMBA EM β -CICLODEXTRINA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para a obtenção do título
de Doutor.

Prof. Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi
Orientador

**LAVRAS – MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Robson Augusto.

Estudo teórico de compostos de inclusão dos herbicidas 2,4-D e dicamba em β -ciclodextrina : / Robson Augusto Pereira. – Lavras : UFLA, 2017.

96 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Cleber Paulo Adrada Anconi.

Bibliografia.

1. Ciclodextrinas. 2. Agrotóxicos. 3. Complexos de Inclusão. 4. Métodos Teóricos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ROBSON AUGUSTO PEREIRA

**ESTUDO TEÓRICO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO DOS
HERBICIDAS 2,4-D E DICAMBA EM β -CICLODEXTRINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 05 de agosto de 2016.

Dr. Clebio Soares Nascimento Junior	UFSJ
Dra. Luciana de Matos Alves Pinto	UFLA
Dr. Marcus Vinicius Juliaci Rocha	UFLA
Dr. Matheus Puggina Freitas	UFLA

Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi
Orientador

**LAVRAS – MG
2016**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida... duas vezes.

À minha família.

À Universidade Federal de Lavras, desde 2006 responsável pela minha formação profissional e pessoal.

Ao Departamento de Química onde realizei este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade de realização deste curso.

Aos órgãos CAPES, FAPEMIG, CNPq e Rede Mineira de Química pelo apoio financeiro na realização deste projeto e pela concessão de bolsa de doutorado.

Ao professor Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi pela confiança, parceria e orientação neste trabalho. A amizade, os ensinamentos e os fatos vividos ao longo desses três anos são memoráveis, obrigado.

Ao professor Dr. Clebio Soares Nascimento Junior pelas importantes contribuições para realização deste trabalho e disponibilidade em participar da banca de defesa.

Ao professor Dr. Matheus Puggina Freitas, pelos conhecimentos compartilhados durante as aulas de química orgânica na graduação, durante o trabalho de mestrado e agora participando da banca de defesa.

À professora Dra. Luciana de Matos Alves Pinto pela contribuição na qualificação e disposição em participar da banca de defesa.

Ao professor Dr. Marcus Juliaci Rocha pela amizade e participação na banca de defesa.

Aos professores Dr. Wagner de Almeida e Dr. Hélio dos Santos pela colaboração e disponibilidade dos recursos computacionais para realização deste trabalho.

Ao Will pela amizade e companheirismo nos momentos que mais precisei ao longo desses três anos de doutorado, valeu brother!

Ao Cristian, parceiro do LQF que, assim como o Will, esteve sempre à disposição para rodar cálculos e mais cálculos.

Aos amigos da República K-Zona, Crocodilo, La Tutcha e Nathan pelo companheirismo e moradia na vida em Lavras.

Aos colegas do LQF: Toru, Laís, Andressa, Alice e demais alunos da professora Katia.

A todos professores e colegas do Departamento de Química; e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram para minha formação ao longo desses dez anos de UFLA.

Em especial à Rafaela Bastos, presente de Deus.

Muito obrigado!

"If quantum mechanics hasn't profoundly shocked you, you haven't understood it yet. Everything we call real is made of things that cannot be regarded as real."

Niels Bohr

RESUMO

Este trabalho contempla o estudo teórico do processo de inclusão envolvendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na forma neutra e desprotonada, seu isômero dicamba (DIC), na forma desprotonada, e a molécula hospedeira β -ciclodextrina (β -CD). Na primeira parte do trabalho foram estudados a estabilidade e o arranjo espacial do complexo de inclusão 2,4D@ β -CD. Diferentes arranjos espaciais foram avaliados no vácuo, fase gasosa e em solução aquosa através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Modelos contínuos de solvatação (PCM e SMD) foram empregados para avaliar o efeito solvente na estabilidade dos complexos. Nesse trabalho foi possível distinguir a geometria do arranjo espacial mais adequado ao complexo, com uma tendência de inclusão da porção aromática da molécula hóspede na cavidade da CD via “head”. Esta geometria obtida apresenta a mesma orientação espacial encontrada por trabalhos experimentais de complexos utilizando β -CD modificada. Na segunda parte foi feita uma análise teórica utilizando o modelo de solvatação SMD e funcionais distintos de DFT (PBE0, B97-D e M06-2X), além de simulações de Dinâmica Molecular, para investigar a melhor abordagem para o estudo de compostos de inclusão entre as moléculas hóspedes 2,4-D e DIC, ambos na forma desprotonada, com β -CD, para os quais existem dados experimentais disponíveis. A energia livre de Gibbs na fase condensada obtida pelos funcionais B97-D e M06-2X apresentaram resultados em melhor concordância com os dados experimentais. A Dinâmica Molecular não produziu nenhuma informação confiável para os compostos de inclusão sob investigação, em função das grandes flutuações identificadas durante as simulações.

Palavras-chave: Mecânica Quântica. DFT. Ciclodextrinas. 2,4-D. Dicamba.

ABSTRACT

The present work comprises a theoretical study on the inclusion process involving the acid 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) in neutral and deprotonated forms, its isomer dicamba (DIC) in deprotonated form and the host molecule β -cyclodextrin (β -CD). In the first part of the work the stability and spatial arrangement of the inclusion complex 2,4D@ β -CD were studied. Different spatial arrangements were evaluated in vacuum, gas phase and aqueous solution through the Density Functional Theory (DFT). Continuous models of solvation (PCM and SMD) were applied to evaluate the solvent effect on the stability of complexes. It was possible to distinguish the geometry of the most adequate spatial arrangement with a tendency to include the aromatic portion of the host molecule in the CD cavity via head. Such geometry presents the same spatial orientation found by experimental studies of complexes using modified β -CD. In the second part a theoretical analysis was conducted using the solvation model SMD and distinct functionals of DFT (PBE0, B97-D and M06-2X), as well as simulations of Molecular Dynamics in order to investigate the best approach to study inclusion compounds between the host molecules 2,4-D and DIC, both deprotonated, with β -CD, for which there are experimental data available. The Gibbs free energy in the condensed phase obtained by the functionals B97-D and M06-2X presented better results in accordance with experimental data. The Molecular Dynamics did not produce any trustful information for the investigated inclusion compounds in function of the large variations during simulations.

Keywords: Quantum Mechanics. DFT. Cyclodextrins. 2,4-D. Dicamba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da taxa de crescimento de vendas de agrotóxicos.....	16
Figura 2 – Estrutura química do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (a) e dicamba (DIC) (b).....	18
Figura 3 – Geometria do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (a) e dicamba (DIC) (b) obtida pelo software GAUSSIAN 09.....	20
Figura 4 – Esquema da estrutura de uma ciclodextrina.....	22
Figura 5 – Dimensões de α -CD (a), β -CD (b) e γ -CD (c).....	23
Figura 6 – Representação da formação de um complexo de inclusão com ciclodextrina.....	25
Figura 7 – Identificação dos hidrogênios na glicose (a) e ciclodextrinas (b)	34

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
	INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO	11
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Agrotóxicos	16
2.2	Ciclodextrinas.....	21
2.3	Complexos de inclusão com ciclodextrinas	24
2.4	Abordagem experimental de complexos de inclusão	29
2.5	Fundamentos de métodos teóricos.....	38
2.6	Abordagem teórica de complexos de inclusão	45
3	CONCLUSÃO	50
	SEGUNDA PARTE	60
	ARTIGO 1	60
	Stability and spatial arrangement of the 2,4-dichlorophenoxyaceticacid and β-cyclodextrin inclusion compound: A theoretical study	60
	ARTIGO 2	78
	Theoretical inclusion of deprotonated 2,4-D and dicamba pesticides in β-cyclodextrin.....	78

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) e diversas outras substâncias têm sido estudados e utilizados de maneira promissora em diferentes áreas do conhecimento, possibilitando inclusive sua aplicação no que se refere aos agrotóxicos (FLAHERTY et al., 2013; SHEN et al., 2012). Os sistemas químicos envolvendo complexos de inclusão são estudados, principalmente, quanto a sua estabilidade, neste caso, a energia de interação entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. Essa interação depende de um conjunto de propriedades que governam a inclusão da molécula na cavidade das CDs (CONNORS, 1997).

Um complexo de inclusão pode ser isolado em um sólido cristalino estável ou estar presente em uma solução aquosa em equilíbrio com a CD e a molécula hóspede na forma isolada (DEL VALLE, 2014). Para confirmar a formação de um complexo de inclusão, CDs e moléculas hóspedes são comumente estudadas de forma isolada, em forma de uma mistura simples e após a reação de complexação (MURA, 2014). Quando o complexo de inclusão é formado, as propriedades químicas da molécula hóspede são modificadas em virtude das interações com as CDs, permitindo o estudo da formação destes complexos a partir de técnicas experimentais.

Na abordagem experimental, por exemplo, é comum o estudo de alguma propriedade química ou biológica da molécula hóspede antes e após a formação do complexo, assim também como a caracterização do complexo formado por meio de técnicas analíticas (MURA, 2014). Entre as diversas técnicas experimentais existentes destacam-se a espectroscopia de ultravioleta (UV-

Visível) e de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) e suas variações como 2D-NOESY, difração de raios X (DRX), análises térmicas, como a termogravimetria (TG), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC) (MURA, 2014, 2015; SZEJTLI, 2004).

A caracterização analítica completa de complexos de inclusão de CDs, tanto em solução quanto no estado sólido, não é uma tarefa simples e requer o uso de diferentes técnicas analíticas, cujos resultados devem ser avaliados em conjunto, uma vez que de forma isolada algumas delas apenas evidenciam a interação entre os grupos químicos das moléculas envolvidas, não sendo possível confirmar o processo de inclusão (MURA, 2015).

Quando um complexo de inclusão formado em solução é isolado em forma de um sólido, a confirmação da inclusão pode ser feita pela combinação de algumas destas técnicas anteriormente citadas. No entanto, em soluções aquosas esta confirmação torna-se mais difícil, mesmo para complexos que apresentam uma estequiometria hóspede-hospedeiro bem definida, já que estão presentes em equilíbrio dinâmico com os seus constituintes sem a presença de ligações covalentes (CONNORS, 1997).

Entre as técnicas experimentais para o estudo de complexos de inclusão destacam-se a ressonância magnética nuclear (RMN ou NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*) e a calorimetria de titulação isotérmica (ITC – *Isothermal Titration Calorimetry*). A ITC constitui uma das principais ferramentas para calcular a estequiometria e obter um perfil termodinâmico completo dos complexos de inclusão com CDs (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

A análise de espectros de RMN permite a confirmação do processo de inclusão, uma vez que fornece informações úteis sobre a forma de interação entre a molécula hóspede e a cavidade da CD (SCHNEIDER et al., 1998). O uso de técnicas bidimensionais (2D) de RMN como a NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) e ROESY (*Rotational Overhauser Effect Spectroscopy*)

facilita a interpretação dos espectros de correlação entre a molécula hóspede e a CD, permitindo assim definir a orientação da inclusão em sua cavidade (MURA, 2014; SMITH et al., 2010).

Apesar de sua reconhecida eficácia e aplicabilidade, em alguns casos as técnicas experimentais atestam a formação, mas não são capazes de prever a orientação de inclusão dos complexos em solução aquosa, indicando a possibilidade de diferentes arranjos espaciais do complexo (SUREZ et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2006; YATSU et al., 2013)

Neste contexto, o uso da modelagem molecular surge como uma importante ferramenta para auxiliar na interpretação dos resultados experimentais, pois permite avaliar diferentes orientações de inclusão na cavidade das CDs, auxiliando na definição da estrutura molecular mais provável dos complexos. Além disso, a energia de interação e propriedades termodinâmicas podem ser calculadas por meio de métodos teóricos e, o seu uso em conjunto com técnicas analíticas de caracterização, tem apresentado resultados satisfatórios na definição do arranjo espacial de complexos de inclusão (COWINS et al., 2015; FERNANDES et al., 2013; PASSOS et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013).

Estudos teóricos têm apresentado papel fundamental no desenvolvimento de novos compostos, como os fármacos, por exemplo. Este tipo de abordagem teve início no século passado, a partir da aplicação da teoria da Mecânica Quântica (LIPKOWYTZ, 1998).

A Mecânica Quântica Molecular pode ser considerada um dos pilares do desenvolvimento da Química Moderna e o seu formalismo fornece aos químicos uma importante ferramenta de trabalho. Embora em sua maior parte seja elaborada por matemáticos e físicos, contendo assim conceitos bastante abstratos (como, por exemplo, o conceito de função de onda), a Mecânica Quântica é o modelo que viabiliza o contato mais próximo com a estrutura da matéria, objeto fundamental de estudos da ciência química (ANCONI, 2007).

A modelagem molecular vêm sendo aplicada no estudo do processo de formação de complexos de inclusão envolvendo CDs e uma série de outras moléculas. Diferentes tipos de abordagens teóricas, como o cálculo *ab initio*, teoria do funcional de densidade (DFT), Dinâmica Molecular e estudos de *Docking* (ancoragem) via mecânica molecular tem apresentado convergência com resultados experimentais, mesmo levando-se em conta o nível de aproximação existente. O êxito deste tipo de estudo depende da combinação de fatores utilizados para descrever o sistema químico, como o meio reacional em vácuo ou um modelo de solvente, além da escolha do método teórico, que contribui de forma importante para o cálculo de energia de interação e a conformação dos complexos de inclusão.

Esta tese contempla o estudo teórico da estabilidade e arranjo espacial de complexos de inclusão envolvendo o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e seu isômero dicamba (DIC) em β -ciclodextrina (β -CD). O objetivo da presente tese foi avaliar o emprego dos métodos teóricos no estudo destes sistemas, auxiliando assim na compreensão dos resultados experimentais que atestam a formação destes complexos (FLAHERTY et al., 2013).

No Artigo 1 (PEREIRA et al., 2015), foram estudados a estabilidade e o arranjo espacial do complexo de inclusão 2,4D@ β -CD no vácuo, fase gasosa e em solução aquosa através da teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*). Em um primeiro momento, dois modelos contínuos de solvatação (PCM – *Polarizable Continuum Model*; SMD – *Solvation Model Density*) foram avaliados para estimar a energia de solvatação de algumas moléculas modelo. O modelo SMD foi escolhido devido ao seu desempenho para estimar valores de energia de solvatação mais próximos aos valores de referência padrão.

No Artigo 2 (PEREIRA et al., 2016) foi feita uma análise utilizando o modelo de solvatação SMD e funcionais distintos de DFT (PBE0, B97-D e M06-

2X), além de simulações de Dinâmica Molecular, para investigar a melhor abordagem para o estudo de compostos de inclusão entre os herbicidas 2,4-D e DIC, ambos na forma desprotonada, com β -CD.

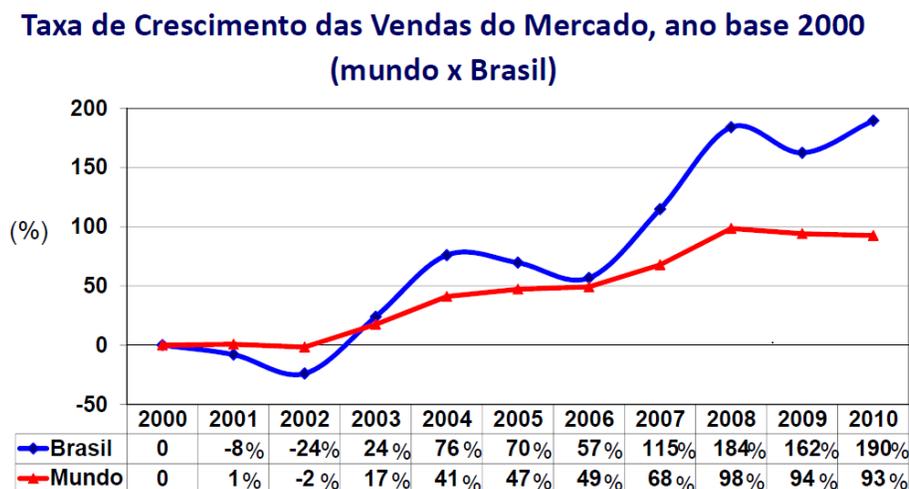
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são definidos, por lei, como “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 1989).

Desde 2002, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190% acima dos 93% de crescimento mundial, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da UFPR (Figura 1) (SILVA, 2012).

Figura 1 – Evolução da taxa de crescimento de vendas de agrotóxicos.



Fonte: Relatório Mercado de Agrotóxicos ANVISA- UFPR 2012

Considerado por muitos como o celeiro do mundo, atualmente o Brasil é o líder mundial no consumo de agrotóxicos. Em busca de melhores índices de produtividade e lucro, o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos na produção agrícola tem se tornado cada vez maior.

No ano de 2008, o Brasil assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos ao ultrapassar os Estados Unidos. Em 2010, o mercado nacional movimentou 19% do mercado global (US\$ 7,3 bilhões) e os Estados Unidos 17%, sendo o total em torno de US\$ 51,2 bilhões. O mercado brasileiro de agrotóxicos concentra-se em algumas categorias de produtos. 45% dos agrotóxicos comercializados são herbicidas, 14% representam os fungicidas, 12% inseticidas e 29% correspondem à soma das demais categorias de agrotóxicos (AUGUSTO et al., 2012).

Segundo Augusto e colaboradores (2012), os Ministérios da Saúde, da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e do Meio Ambiente possuem 434 ingredientes ativos registrados e mais de 2.400 formulações de agrotóxicos, permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos por meio de pesquisas vinculadas a esses órgãos. Ainda assim, 22 agrotóxicos dentre os 50 mais utilizados no Brasil, são proibidos na União Europeia.

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA constatou que, em 2011, um em cada 3 alimentos consumidos pelos brasileiros estava contaminado por agrotóxicos. O PARA contempla 235 ingredientes ativos pesquisados, deixando quase 200 compostos permitidos e regulamentados não contabilizados (SILVA, 2012).

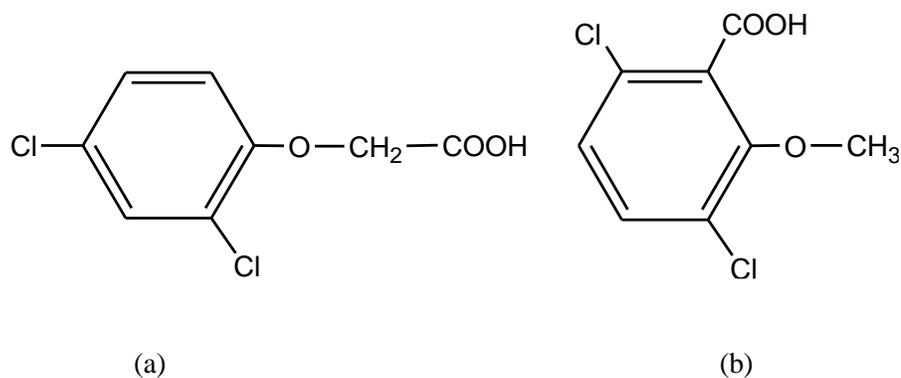
Mesmo desempenhando papel fundamental na proteção e produtividade do ramo agrícola, os agrotóxicos contribuem negativamente em ecossistemas, contaminando terra, lençóis freáticos e águas superficiais, provocando perda de biodiversidade (FAO, 2005).

No Brasil, entre os três agrotóxicos mais utilizados estão o herbicida glifosato ($C_3H_8NO_5P$), óleo mineral (mistura de hidrocarbonetos parafínicos, ciclo parafínicos e aromáticos saturados e insaturados provenientes da destilação do petróleo) e herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (AUGUSTO et al., 2015).

Embora a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) tenha recomendado a suspensão do uso de 2,4-D, em parecer técnico emitido em 2014 (FRIEDRICH, 2014), a Anvisa sugere a manutenção dos produtos à base do ingrediente ativo 2,4-D, mesmo sendo considerado extremamente tóxico (Classe I) (ANVISA, 2015).

Os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) ($C_8H_6Cl_2O_3 - 221,04 \text{ g mol}^{-1}$) (PUBCHEM, 2016) são isômeros e ingredientes ativos presentes em diversas formulações de herbicidas. Na agricultura são recomendados para o controle de ervas daninhas de folha larga. Na Figura 2 estão ilustradas as estruturas químicas destes isômeros.

Figura 2 – Estrutura química do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (a) e dicamba (DIC) (b).



Fonte: Do autor

Suas principais utilizações se referem a lavouras de cereais, tais como trigo, milho, aveia, centeio, cevada e as culturas de cana. Atuam no metabolismo da planta por meio do estímulo da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, provocando um crescimento anormal e descontrolado, principalmente por afetarem a atividade enzimática, a respiração e a divisão celular (EPA, 2013; WALTERS, 1999).

A Tabela 1 mostra algumas propriedades químicas dos herbicidas 2,4-D e dicamba.

Tabela 1 – Propriedades químicas dos herbicidas 2,4-D e dicamba.

Propriedades	2,4-D	Dicamba
Fórmula molecular		$C_8H_6Cl_2O_3$
Massa molar (g mol ⁻¹)		221,03744
Ka	$1,86 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-2}$
pKa	2,73	1,97
Solubilidade em acetona*	67	12,4
Solubilidade em octanol*	120	68
Solubilidade em tolueno*	0,058	13
Solubilidade em água*	0,07	0,6~0,8
Solubilidade em água**	23	36

*25 °C (g/100 mL) forma neutra

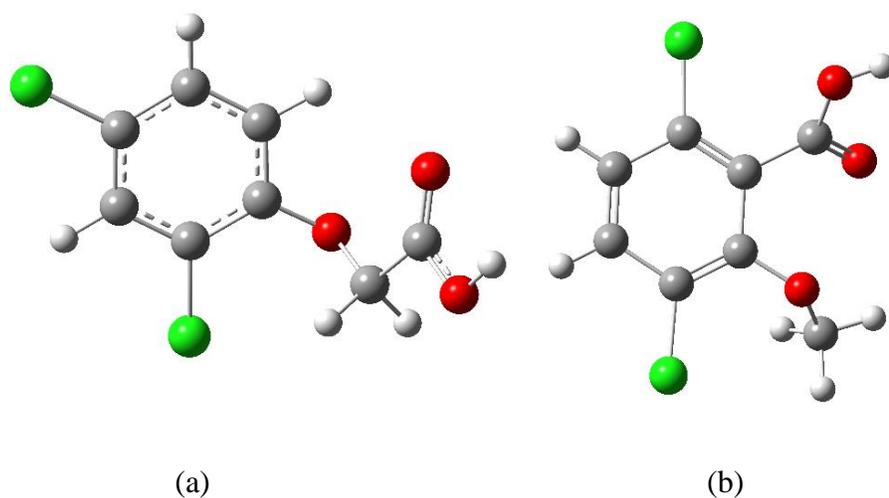
**25 °C (g/100 mL) forma desprotonada

Fonte: Flaherty e colaboradores (2013) e The PubChem Project (2016)

Em geral, o dicamba é menos solúvel que 2,4-D em solventes orgânicos. Em contraste com os dados da solubilidade dos compostos estão os valores de pKa. O dicamba é um ácido mais fraco ($pK_a = 1,97$) comparado ao 2,4-D ($pK_a = 2,73$), mesmo possuindo maior solubilidade em água.

Estes agrotóxicos têm sido alvo de estudos teóricos, como, por exemplo, na obtenção de geometrias moleculares (Figura 3) por cálculos teóricos e espectroscopia de raios-X (BADAWI, 2010; SIEROŃ; KOBYLECKA; TUREK, 2011) e análise conformacional (FREITAS; RAMALHO, 2013). O dicamba e outros 30 fármacos foram alvo de estudo sobre a energia livre de hidratação estimada por métodos teóricos (PALMER et al., 2010).

Figura 3 – Geometria do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (a) e dicamba (DIC) (b) obtidas em nível DFT (PBE0/6-31G(d,p) pelo software GAUSSIAN 09.



Fonte: Do Autor (FRISCH et al., 2009).

2.2 Ciclodextrinas

A primeira referência à substância que mais tarde seria conhecida como ciclodextrina (CD) foi feita em 1891 por Villiers, ao digerir amido com amilase proveniente de bactérias causadoras de intoxicação alimentar e obter um sólido cristalino ao qual chamou inicialmente de celulosina. As CDs foram isoladas pela primeira vez em 1903 e ficaram também são conhecidas como dextrinas de Schäringer, em referência aos primeiros fundamentos da química envolvendo as CDs relatados no início do século XX por esse pesquisador (CONNORS, 1997; CRINI, 2014; SZEJTLI, 1998).

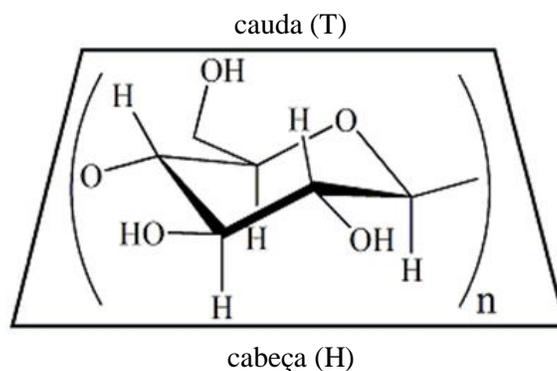
Pringsheim, sucessor de Schäringer no estudo das CDs, produziu diversos trabalhos sobre o uso de CDs no início do século XX. Seu maior mérito foi indicar a principal característica dessa classe de compostos: a formação de complexos de inclusão. Entre 1935 e até o final da década de 50, os esforços científicos foram direcionados na obtenção e purificação das CDs, bem como descobertas relacionadas as suas propriedades físico-químicas, suas estruturas químicas, a habilidade de formar complexos e a presença de uma cavidade (SZEJTLI, 1998).

Nas décadas de 60, 70 e 80 foram desenvolvidos métodos de produção em maior escala, bem como descobertas novas propriedades químicas e físicas das CDs e de complexos de inclusão e o início de testes para uso em medicamentos (SHARMA; BALDI, 2016).

No final da década de 90 e até os dias atuais há um crescimento considerável do número de publicações de artigos relacionados a CDs. Novos métodos, tecnologias e recursos de abordagem no estudo destes sistema, bem como o início da aprovação de medicamentos com β -ciclodextrinas modificadas impulsionaram o interesse de pesquisa dessa classe de compostos (SZEJTLI, 2004; SZENTE; SZEMÁN; SOHAJDA, 2016).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades de α -D glicose, unidas através de ligações glicosídicas α -(1,4) (Figura 4). A conformação cadeira da glicose e as ligações α -(1,4) organizam a estrutura molecular da CD em forma de um anel molecular. O tamanho deste anel varia de acordo com a quantidade de unidades de glicose, sendo as CDs com 6, 7 e 8 unidades de glicose chamadas de α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente (DEL VALLE, 2004).

Figura 4 – Esquema da estrutura de uma ciclodextrina.



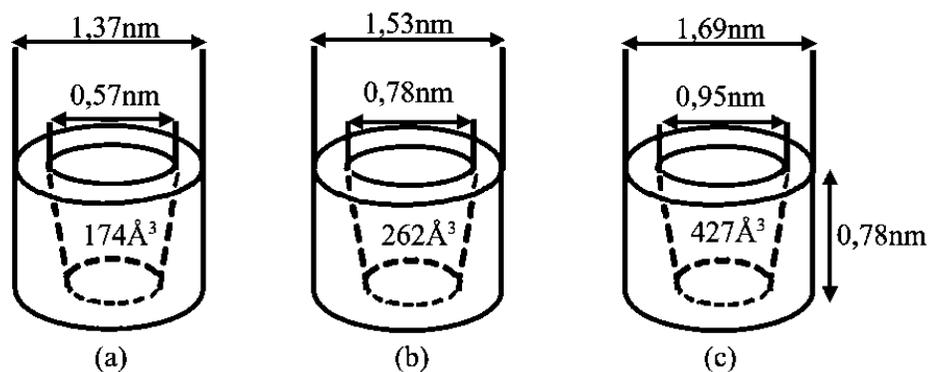
Fonte: Do Autor.

A diferença entre os diâmetros inferior e superior da geometria molecular das CDs permite que estas moléculas sejam descritas como um cone truncado raso. Neste aspecto é importante ressaltar a localização das hidroxilas da glicose na CD. Duas hidroxilas secundárias, em cada unidade de glicose, encontram-se situadas no lado do anel que apresenta maior diâmetro, comumente chamado de cabeça (H) (*head*, em inglês), enquanto uma hidroxilas primária, para cada unidade de glicose, encontram-se do lado de menor diâmetro denominado cauda (T) (*tail*, em inglês) (Figura 4) (SZEJTLI, 1998).

Embora as CDs naturais apresentem a mesma espessura, os diâmetros dos anéis superiores e inferiores, bem como o volume da cavidade de cada CD são

diferentes, os quais são determinados pelo número de unidades de glicose constituintes da CD (Figura 5) (RYZHAKOV et al., 2016).

Figura 5 – Dimensões de α -CD (a), β -CD (b) e γ -CD (c).



Fonte: Adaptado de Szejtli (1998)

Outro aspecto importante sobre as CDs está relacionado ao caráter apolar de suas cavidades. Na parte exterior das CDs são encontradas as hidroxilas livres que atribuem um caráter hidrofílico à superfície externa, ao passo que a cavidade é basicamente constituída de grupos CH e oxigênios envolvidos nas ligações glicosídicas, tendo, portanto um caráter hidrofóbico (SHARMA; BALDI, 2016). Algumas propriedades físico-químicas das CDs são descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas das CDs.

Propriedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Massa molar (g mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2

Fonte: Adaptado de Szejtli (1998)

Na Tabela 2 destaca-se a baixa solubilidade da β -CD em relação à γ -CD. Há uma tendência natural esperada de um valor intermediário de solubilidade, porém as hidroxilas da β -CD formam ligações de hidrogênio entre si, diminuindo a disponibilidade de interação com a água. Por esse motivo a modificação de β -CD, na qual os grupos hidroxila são trocados por substituintes como: metil, hidropropil, carboximetil e sulfurados, tem o intuito de aumentar a sua solubilidade e também a dos complexos de inclusão formados com β -CDs modificadas (LANDY et al., 2012).

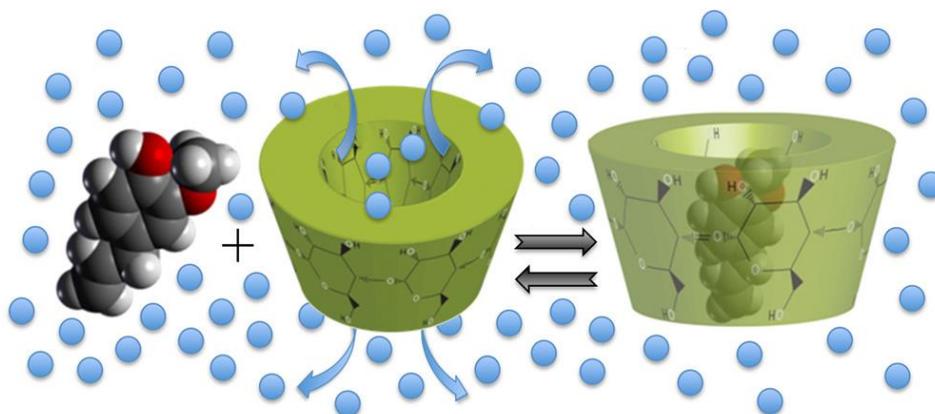
Aplicações de CDs têm sido amplamente reportadas na literatura. A aplicabilidade dessa classe de carboidratos está intimamente relacionada à sua habilidade de formar complexos do tipo hóspede-hospedeiro, em solução aquosa, com uma quantidade considerável de distintas moléculas hóspedes (CONNORS, 1997).

2.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas

O processo de inclusão em CDs pode ocorrer em fase sólida, líquida ou gasosa. Entretanto, a maioria dos estudos é desenvolvida em solução aquosa, especialmente pelo papel central da água neste processo, definido a partir do conjunto de fatores envolvendo a geometria, polaridade e interação entre as CDs e as moléculas hóspedes (LANDY et al., 2012).

Em uma CD isolada as extremidades da cavidade estão abertas, permitindo que a molécula hóspede seja incluída por ambos os lados. A cavidade ocupada por moléculas de água, devido ao caráter levemente apolar, representa um ambiente desfavorável devido à interação polar-apolar, favorecendo assim a substituição das moléculas de água por uma molécula que seja menos polar (Figura 6) (CONNORS, 1997).

Figura 6 – Representação da formação de um complexo de inclusão com ciclodextrina.



Fonte: Mura (2014)

As CDs formam complexos com uma grande variedade de substratos e a principal condição é que o substrato possa se adaptar à cavidade, ainda que parcialmente. Devido a esta habilidade, estas macromoléculas vêm sendo utilizadas como protótipos para a investigação de interações não covalentes envolvendo diferentes compostos (DEL VALLE, 2004).

A formação de complexos do tipo hóspede-hospedeiro ocorre em função de distintas interações de natureza predominantemente eletrostática, tais como, as forças de van der Waals, interações eletrostática como a formação de ligações de hidrogênio, rearranjo conformacional e exclusão de moléculas de água com alta energia de dentro da cavidade. A força diretora responsável pelo fenômeno da inclusão corresponde a um somatório das interações envolvidas (REKHARSKY; INOUE, 1998; RYZHAKOV et al., 2016).

Os complexos de inclusão formados podem modificar características físico-químicas das moléculas incluídas como a solubilidade, sem formação ou

rompimento de ligações covalentes, mantendo sua integridade estrutural e a capacidade de permear membranas biológicas (CONNORS, 1997).

As interações moleculares causam alterações físico-químicas na molécula inclusa, possibilitando assim o uso de técnicas experimentais para observar mudanças que indiquem a existência de um complexo de inclusão. A utilização de técnicas experimentais nesse tipo de estudo de formação de complexos de inclusão permite o conhecimento da estequiometria da reação, uma vez que essas reações podem envolver a presença de uma ou mais moléculas hóspedes ou CDs.

A proporção estequiométrica mais comum é de uma molécula hóspede para cada CD (1:1), uma vez que reações de formação de complexos de inclusão em diferentes proporções estequiométricas envolvem inicialmente a presença de um complexo 1:1 durante as etapas de reação até atingir o equilíbrio. Diferentes proporções estequiométricas podem ser obtidas devido às propriedades químicas e tamanho das moléculas inclusas, além do tamanho ou presença de substituintes nas CDs (LANDY et al., 2012).

Um complexo de inclusão pode ser isolado como um sólido cristalino estável, porém em solução aquosa o complexo está em equilíbrio com a CD e molécula hóspede na forma isolada. Connors (1997) e Szejtli (1998) relataram uma série de considerações para a compreensão da medida da “força” de um complexo. Para uma reação qualquer (Equação 1):



A energia de interação entre a molécula hóspede e a CD, chamada de *binding energy*, pode ser expressa a partir da constante de formação de um complexo (Equação 2) (SZEJTLI, 1998).

$$K = \frac{[\text{A}@\text{CD}]}{[\text{A}]^m[\text{CD}]^n} \quad (2)$$

A grande maioria dos trabalhos envolvendo complexos de inclusão utiliza valores de K (energia de interação ou ligação) para avaliar a formação de complexos. É importante notar que a constante de formação K tem unidade em M^{-1} , sendo assim independente da temperatura. A constante global de formação de reações com estequiometria diferente de 1:1 é definida pelo produto das constantes de cada passo da reação (CONNORS, 1997).

Embora K não seja uma constante termodinâmica, seu uso é muito comum para estimar a mudança na energia livre de Gibbs padrão (ΔG^0). Outras grandezas termodinâmicas, como a entalpia e entropia da reação, podem ser medidas em um calorímetro, por meio da dependência de K e a temperatura, considerando a molaridade padrão (1M) dos reagentes.

A magnitude da energia livre é dependente do estado escolhido para abordar cada reação. A prática usual é medir a concentração em unidades molares (M^{-1}), em temperatura constante, que podem ser relacionadas à energia livre de Gibbs pela Equação 3:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (3)$$

A combinação das Equações 2 e 3 pode ser aplicada para diferentes abordagens de estudo das reações de complexação. Considerando a Equação 2 ao atingir o equilíbrio, $[A]$, $[CD]$ e $[A@CD]$ são frações molares a partir da concentração inicial 1M. Na Equação 3, K corresponde a K_X , constante de equilíbrio em função da fração molar das espécies.

A Equação 4 demonstra como relacionar a K_X em função das concentrações (K_C). A constante em função das frações molares é ajustada para representar reações em solução pela multiplicação de um fator relacionado ao número de mols do solvente em um quilograma (1 kg) de solvente (M^*), da ρ_1 que

é a densidade do solvente e Δq é a mudança no número de reagentes que se convertem em produtos. Para reações 1:1, por exemplo, Δq é igual a -1:

$$K_C = K_X (M^* \rho_1)^{\Delta q} \quad (4)$$

$$K_p(T) = K_C(T) \cdot (c^0 RT/p^0)^{\Delta q} \quad (5)$$

A Equação 5 é análoga à 4, de forma que $K_p(T)$ é a constante de equilíbrio em função da pressão em uma temperatura (T) constante. $K_C(T)$ é a constante de equilíbrio em função da concentração a T constante, c^0 é a concentração padrão (1 mol L^{-1}), R a constante dos gases ideais, T é a temperatura padrão igual a 298,15 K e p^0 é a pressão padrão (bar). Então, resolvendo a Equação 5 para um complexo 1:1 em solução, temos:

$$K_p(T) = K_C \times 0,04034 \quad (6)$$

Ao determinar a relação entre $K_p(T)$ e K_C , a Equação 6 permite estimar ΔG^0 (Equação 7) a partir de dados experimentais:

$$\Delta G^0 / \text{kcal.mol}^{-1} = -0,5925 \times \ln(0,04034 \times K_C) \quad (7)$$

A Equação 7 demonstra que a energia livre de Gibbs padrão de uma reação de formação de complexo de inclusão 1:1, considerando as espécies como gás ideal em equilíbrio, está relacionada a K_C , permitindo assim estimar um valor para ΔG^0 a partir de resultados experimentais. Esta equação pode ser utilizada como uma ferramenta para avaliar e comparar resultados teóricos com resultados experimentais, principalmente em se tratando de sistemas em solução aquosa.

2.4 Abordagem experimental de complexos de inclusão

A abordagem experimental de complexos de inclusão consiste no estudo de alguma propriedade química ou biológica da molécula hóspede antes e após a formação do complexo. Após a reação de complexação, a molécula hóspede pode apresentar alguma característica mais acentuada, como o aumento de sua solubilidade ou função biológica, por exemplo, devido as interações moleculares na cavidade das CDs. Essas alterações nas propriedades físico-químicas, tanto da molécula inclusa, quanto da CD, permitem o uso de técnicas experimentais para confirmar a existência de um complexo de inclusão (REKHARSKY; INOUE, 1998).

Um complexo pode ser isolado em um sólido cristalino estável ou estar presente em uma solução aquosa em equilíbrio com a CD e a molécula hóspede na forma isolada. Para a confirmação da reação de complexação diferentes técnicas experimentais são aplicadas as moléculas hóspede e de CDs de forma isolada, a uma mistura física das duas e ao suposto complexo formado.

Mura (2014, 2015) apresenta algumas técnicas experimentais para a caracterização dos complexos em solução e na forma sólida, dentre as quais destacam-se a espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis) e de infravermelho (IV ou IR – *Infrared Spectroscopy*), difração de raios X (DRX ou XRD – *X-ray Diffraction*), ressonância magnética nuclear (RMN ou NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*) e suas variações como 2D-NOESY, além das análises térmicas como a termogravimetria (TG ou TGA – *Thermal Gravimetric Analysis*), calorimetria diferencial de varredura (CDV ou DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC – *Isothermal Titration Calorimetry*).

As primeiras técnicas analíticas a serem consideradas para a avaliação da formação de complexos de inclusão com CDs geralmente são UV-Vis, IV e análises térmicas. As técnicas de UV-Vis e IV são consideradas principalmente

pela sua aplicação relativamente simples e baixo custo de análise, enquanto as técnicas de análises térmicas, como a ITC por exemplo, apresentam grande eficiência na determinação dos parâmetros termodinâmicos da reação.

Nas análises de termogravimetria (TG), por exemplo, a formação do complexo de inclusão é indicada pelas diferenças entre as curvas de temperatura do início da degradação, da molécula hóspede isolada, quando comparadas com as curvas do suposto complexo. As CDs naturais analisadas por TG apresentam uma primeira perda de massa (~ 100 °C), correspondente à saída de água adsorvida e de cristalização da cavidade pela sua evaporação, e uma segunda correspondente à sua degradação (~ 300 °C) (MURA, 2015).

A influência da molécula hóspede nos parâmetros termogravimétricos das CDs pode indicar a complexação, além da observação se a degradação da molécula hóspede ocorrerá em temperaturas mais elevadas, indicando maior estabilidade térmica da molécula hóspede em virtude da inclusão na CD (TAKAHASHI, 2009). Monteiro et al. (2017) utilizaram a TG como uma das técnicas para caracterizar o complexo de inclusão de tetraciclina com β -CD. As curvas de TG e TG diferencial (DTG) demonstraram uma diferença significativa entre a mistura física e o complexo de inclusão, além de diferenças na temperatura de perda de massa da β -CD do complexo comparada a natural.

As análises de TG são frequentemente utilizadas para auxiliar no suporte e interpretação dos resultados das demais técnicas experimentais, em especial da calorimetria exploratória de varredura (DSC). Na DSC a curva da molécula hóspede ou CD, quando apresentadas na forma cristalina, é representada por um pico estreito, bem definido, que corresponde ao ponto de fusão (MURA, 2014).

Em uma mistura física, por exemplo, a curva DSC é a soma do evento de desidratação da CD com o pico de fusão da molécula hóspede. Quando ocorre a formação do complexo, espera-se que o pico da fusão apresente mudanças devido à perda da estrutura cristalina causada pela encapsulação. A indicação do processo

de inclusão pode ser avaliada pela análise do evento característico da desidratação da CD, na curva DSC do complexo. Um deslocamento deste pico pode ser observado devido à substituição de moléculas de água presentes naturalmente na cavidade por moléculas hóspedes, o que resulta em diferenças no estado energético da CD e do complexo (TAKAHASHI, 2009).

Pérez-Martínez et al. (1998) observaram a complexação do ácido 2,4-diclorofenóxiacético em α -CD, a partir da comparação das curvas de DSC. A curva DSC do complexo 2,4-D@ α -CD apresentou um perfil diferente, quando comparada as curvas das espécies isoladas e da mistura física. Além disso, a ausência do pico característico do ponto de fusão do ácido 2,4-D na curva DSC dos complexos indicou uma maior estabilidade térmica associada a inclusão da molécula na cavidade da CD.

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) pode ser considerada um dos métodos mais interessantes para a caracterização dos mecanismos de interação presentes em complexos de inclusão com CDs, sendo aplicada principalmente na determinação das constantes termodinâmicas, constantes de associação e estequiometria dos complexos de inclusão com CDs em soluções aquosas, com base na medida de mudanças em seus parâmetros termodinâmicos (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; MURA, 2014).

A avaliação das mudanças de entalpia e entropia dos sistemas químicos são medidas a partir do fluxo de calor gerado ou absorvido durante o processo de inclusão, proporcionando assim obter um perfil termodinâmico completo das interações moleculares. Os experimentos de ITC consistem na titulação de um ligante (molécula hóspede) em uma solução contendo a molécula receptora (CDs), dentro de uma célula química na qual as variações de temperatura são registradas em um termograma. As análises de ITC requerem apenas algumas horas e, adicionalmente, uma amostra menor em comparação com a maioria dos métodos

tradicionais, o que poderia ser uma vantagem nos estádios iniciais de desenvolvimento (MURA, 2014).

Smith et al. (2009) investigaram da inclusão do herbicida metobromuron em ciclodextrinas nativas por PXRD e ITC. Após a caracterização do complexo a partir das curvas de XRD, a determinação simultânea da constante de equilíbrio, entalpia e estequiometria do complexos foi feita a partir de uma única curva de titulação ITC, usando regressão não-linear de mínimos quadrados baseado na isoterma de Wiserman.

Entre as técnicas espectroscópicas, a espectroscopia UV-vis é um dos métodos mais simples, rápido e econômico para estudar a formação de complexos hóspede-hospedeiro em solução. Em função da posição do grupo cromóforo, a mudança do meio aquoso para a cavidade não polar da CD pode modificar o seu espectro de absorção original, devido à substituição parcial ou total das interações da molécula inclusa com o soluto pela interações com a cavidade da CD.

As mudanças no espectro UV, como deslocamentos batocrômicos ou hipsocrômicos, efeitos hipocrômicos ou hiperocrômicos, afetam o máximo de absorção do espectro UV e/ou resultam no aumento ou diminuição da sua intensidade, fatos que podem indicar a formação de um complexo de inclusão, mas não fornece uma evidência segura, haja visto sua baixa seletividade e eficácia na presença de substâncias interferentes (MURA, 2014).

A caracterização dos complexos de inclusão por infravermelho em solução possui as mesmas limitações do UV-Vis. A análise dos espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (IVTF ou FTIR – *Fourier-Transform Infra-Red*), para um complexo obtido no estado sólido por exemplo, por pode ser feita comparando-se as bandas presentes nos espectros da molécula hóspede, da CD, da mistura física e do complexo após a reação (TAKAHASHI, 2009).

O espectro referente a mistura física, a priori, corresponderá à uma sobreposição dos espectros da molécula hóspede e da CD e, no espectro

correspondente ao complexo, as bandas ou picos podem mudar de posição, diminuir sua intensidade, desaparecer ou surgirem em regiões diferentes (MONTEIRO et al., 2017).

A análise de espectros de FITR, de forma isolada, não é capaz de atestar a inclusão na cavidade da CD. Por esse motivo a FITR é comumente utilizada como uma técnica complementar as demais técnicas experimentais e pode ser utilizada para validar estudos teóricos, como no estudo de complexos de inclusão entre β -CD e chalconas (SANCHO et al., 2016).

As mudanças no espectro de FTIR e no termograma DSC foram observadas no estudo da complexação do pesticida capsaicina em β -CD e hidróxiopropil- β -CD (HP β -CD). Os espectros FTIR da β -CD e HP β -CD isoladas não possuem diferenças aparentes, no entanto há uma grande mudança quando comparamos os espectros dos respectivos complexos. Os termogramas DSC e os espectros XRD permitem visualizar melhor as diferenças entre as CDs e os complexos, confirmando a complexação da capsaicina com as duas formas de CDs (SHEN et al., 2012).

A difração de raios-X (XDR) é uma técnica comumente utilizada para a caracterização e identificação cristalina de sólidos. Pode ser aplicada de diferentes formas, como a difração de raios-X de pó (PXRD – Powder X-ray Diffraction), realizada em amostras finamente moídas e homogeneizadas, que permite identificar rapidamente substâncias cristalinas desconhecidas, bem como determinar o grau de cristalinidade ou amorfização das amostras examinadas (MURA, 2015).

A análise da formação do complexo de inclusão em espectros de XRD, assim como no UV-Vis e FTIR, também é realizada pela avaliação das mudanças dos espectros entre as moléculas envolvidas. A obtenção de um difratograma do complexo de inclusão com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser um indicativo da ocorrência de complexação

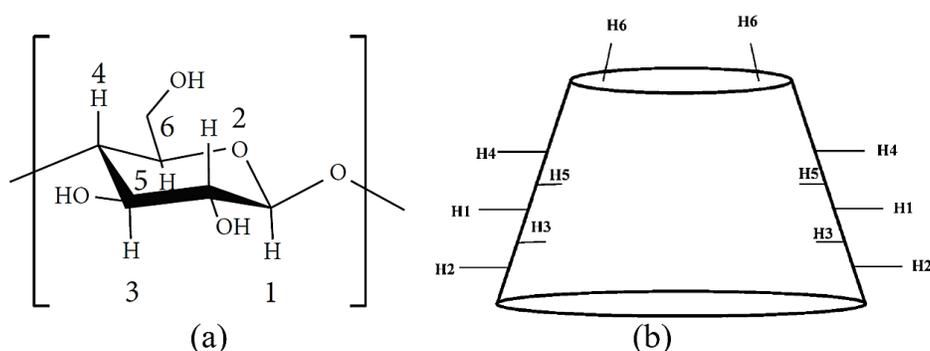
(DANG, et al., 2011). Este fato foi observado por Pérez-Martínez et al. (2000), na análise do complexo formado entre o herbicida 2,4-D e HP- β CD.

Uma das vantagens da técnica PXRD é não exigir qualquer pré-tratamento da amostra. Ademais, por não ser uma técnica destrutiva como os métodos térmicos, a amostra não sofre qualquer alteração físico-química durante as análises, permitindo a sua reutilização (MURA, 2015).

Assim com as demais técnicas espectroscópicas a ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se na observação da diferença entre os espectros das espécies envolvidas. A evidência direta da inclusão de um hóspede na cavidade de uma CD é observada pela diferença nos deslocamento químicos de hidrogênio (^1H) ou de carbono (^{13}C) entre o hóspede livre e a CD e o suposto complexo formado.

As CDs possuem seis prótons (Figura 7a), identificados conforme o número do carbono em cada uma das moléculas de glicose, que podem ser utilizados na análise dos espectros de RMN de hidrogênio. Os hidrogênios estão localizados nas CDs (Figura 7b) na superfície externa (H1, H2 e H4), na parte interna da cavidade (H3 e H5), e na cauda onde está localizado último próton (H6).

Figura 7 – Identificação dos hidrogênios na glicose (a) e ciclodextrinas (b).



Fonte: Adaptado de Ezawa (2016) e Alonso (2016).

A RMN é um dos métodos mais adequados para os estudos de complexos de inclusão em solução, uma vez que seus parâmetros como o deslocamento químico ou a constante de acoplamento de spin são sensíveis às interações intermoleculares de curta distância, presentes na cavidade ocupada da CD. Esta sensibilidade permite a obtenção de informações específicas sobre o complexo, como a geometria do complexo que, além de confirmar o processo de inclusão, também fornece informações úteis sobre a orientação da molécula hóspede no interior da cavidade (MURA, 2014).

Como consequência da inclusão de hóspedes na sua cavidade, os espectros de RMN de CDs exibem uma mudança no deslocamento químico dos seus prótons H3 e H5, direcionados para o interior da cavidade. A intensidade dos deslocamentos químicos está relacionada a forma de inclusão da molécula na cavidade. Normalmente, os deslocamentos químicos do hidrogênio H3 são maiores do que o H5, em virtude da proximidade do H3 com a face mais larga da cavidade, indicando a orientação da molécula hóspede incluída na cavidade.

Barman et al. (2016) realizaram o estudo de RMN da formação de complexos de inclusão de 3 compostos de cloreto de benziltrialquilamônio com β -CD. No espectro de RMN o maior deslocamento observado foi para a porção aromática do benzil e o hidrogênio H3 da CD, sugerindo a inclusão da porção aromática do grupo hidrofóbico presente no líquido iônico pela face mais larga da cavidade da CD. Cabe ressaltar que foram observados também alguns deslocamentos menores para o H1, H2 e H4 da CD e também sinais referentes aos grupos alquila da molécula hóspede fato que, considerando a geometria dos compostos de benziltrialquilamônio podem indicar diferentes formas de orientação espacial no processo de inclusão com a β -CD.

A magnitude do deslocamento observado pode ser usado como medida da estabilidade do complexo, porém muitas vezes os deslocamentos induzidos são pequenos e ou apresentam um alargamento do sinal, diminuindo a precisão dos

resultados experimentais. Além disso, a baixa solubilidade das amostras em água deuterada (^1H NMR) ou em água (^{13}C NMR) exigem o uso de outros solventes que modificam interações intermoleculares dos complexos (SCHNEIDER, et al., 1998).

Em um complexo de inclusão a proximidade entre dois núcleos atômicos, de um átomo da molécula hóspede e de um hidrogênio da cavidade, induz um efeito em espectroscopia RMN conhecido como NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), que consiste na transferência de polarização do spin de uma população nuclear para a outra próxima. As distâncias entre os átomos observadas por esse efeito fornecem informações estruturais dos complexos (MURA, 2014).

O efeito NOE pode ser utilizado na aplicação de técnicas bidimensionais (2D) de RMN como a NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) e ROESY (*Rotational Overhauser Effect Spectroscopy*). Em um espectro RMN 2D-NOESY é possível observar as correlações entre picos da molécula hóspede e a CD, tornando mais fácil a interpretação de dados e a identificação da porção do hóspede dentro da cavidade de CD e o modo de inclusão, isto é, a forma como está incluída a molécula hóspede na cavidade, seja pela face mais larga ou mais estreita, bem como a profundidade de inclusão (SZENTE; SZEMÁN; SOHAJDA, 2016).

A orientação de inclusão da molécula de piperina em β -CD foi elucidada por meio de análise de RMN de ^1H 2D-ROESY. A correlação dos picos referentes aos hidrogênios da porção aromática da piperina e os hidrogênios H3 e H5 indicaram a forma de inclusão, na qual a porção aromática foi incluída a partir da face mais larga da CD. Ademais, foram observadas correlações consideráveis entre os picos do hidrogênio H6 da CD e os hidrogênios presentes no grupo éter ligado ao anel aromático, confirmando assim a orientação de inclusão da piperina na cavidade da β -CD (EZAWA et al., 2016).

A presença de um anel aromático pouco substituído na molécula hóspede pode favorecer a inclusão desta porção na cavidade das CDs, como no caso do fármaco erlotinibe. Sua estrutura molecular apresenta uma porção aromática (etilfenil) de um lado e dois grupos éteres simétricos na outra extremidade. As análises de FTIR, TG, TGD, ITC e RMN ^1H 2D-NOESY indicaram a formação de um complexo 1:1 de erlotinibe:HP- β -CD. O espectro 2D-NOESY demonstrou uma grande correlação entre os picos H3 e H5 da HP- β -CD e os hidrogênios do anel aromático contendo o grupo etil. A ausência de correlações relevantes com os H da outra extremidade da molécula (grupos éteres) sugerem que a inclusão da porção aromática ocorre pela face mais larga da cavidade (GONTIJO et al., 2015).

Moléculas hóspedes com cadeias carbônicas menores ou que não contém um anel aromático dificultam a análise do processo de inclusão. Teixeira et al. (2006) estudaram o complexo valproato: α -CD por meio de análises térmicas (TG/DTG, DSC), difração de raios X em pó (PXRD), RMN de ^1H , ^{13}C e 2D-ROESY e ITC. Os espectros de RMN 2D-ROESY mostraram uma correlação mais forte dos picos da molécula de valproato com o hidrogênio H3 da CD indicando a inclusão na cavidade pela face mais larga da cavidade da CD. Apesar disso, áreas de correlação também foram observadas para H5, H2 e H4, estes dois últimos localizados na parte externa da cavidade, sugerindo a existência de diferentes geometrias para o complexo de inclusão ou mesmo a formação complexos de associação. O equilíbrio químico do complexo em solução aquosa e a tendência de formação de agregados moleculares de CDs são fatores que podem explicar a existência dessas correlações na parte externa da cavidade (VALENTE; CARVALHO; SÖDERMAN, 2015).

A presença de interações com a parte externa da cavidade também foi observada por Surez et al. (2014) para complexos de doxiciclina com β -CD. Embora os resultados de RMN 2D NOESY tenham indicado a inclusão da porção aromática na cavidade da β -CD, favorecida pela presença de grupos hidrofílicos

(amida e amina terciária) na porção alifática, áreas de correlação consideráveis para os hidrogênios H2 e H4 do exterior da cavidade sugerem diferentes possibilidades de arranjo estrutural do complexo ou mesmo a formação de complexos de associação.

Neste contexto, o uso da modelagem molecular surge como uma importante ferramenta para auxiliar na interpretação dos resultados experimentais, pois permite avaliar diferentes orientações de inclusão na cavidade das CDs, auxiliando na definição da estrutura molecular mais provável dos complexos.

2.5 Fundamentos de métodos teóricos

Na abordagem teórica molecular, os reagentes e equipamentos analíticos são substituídos por *inputs* e programas de computador. Nos *inputs*, a estrutura química das moléculas é descrita por coordenadas x, y e z de cada um dos átomos, precedidas de informações sobre o tipo de cálculo a ser realizado. Essas informações são fundamentais para desenvolver um estudo teórico utilizando programas de computador com sucesso.

Ao longo dos anos, diversos cientistas recorreram a estudos teóricos para prever ou medir propriedades químicas. Entre elas, destacamos a estrutura molecular, análise conformacional, espectros vibracional e eletrônico, interações intermoleculares, reatividade química e mecanismos de reações químicas (PLIEGO JR, 2006).

Um dos métodos de abordagem teórica da química moderna, a Mecânica Quântica Molecular tem seu formalismo baseado em matemática e física aplicada, constituindo uma poderosa ferramenta de trabalho para o estudo de sistemas químicos. Embora muitos conceitos sejam abstratos e de difícil compreensão, como a função de onda, a Mecânica Quântica é o modelo que possibilita, a partir

da análise estrutural da matéria, obter parâmetros fundamentais em estudos químicos (ANCONI, 2007).

Os primeiros estudos de aplicação da Mecânica Quântica moderna datam da década de 1930, nos trabalhos de Erwin Schrödinger e Paul Dirac.

A Equação de Schrödinger (Equação 8) descreve o comportamento de um estado particular para cada um dos átomos que compõem o sistema em estudo, considerando a natureza partícula-ondulatória dos elétrons e a descrição da energia mecânica como a soma da energia cinética e potencial.

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right] \Psi(\mathbf{r}, t) = i\hbar \frac{\delta \Psi}{\delta t}(\mathbf{r}, t) \quad (8)$$

A Equação 8 representa uma equação diferencial da função de onda (Ψ) dependente da posição e do tempo, onde \hbar ($\hbar = h/2\pi$) é a constante de Planck (h) dividida por duas vezes o valor de π , m é a massa do elétron, ∇ é o operador Laplaciano das posições x , y e z , V é a energia potencial e i o número imaginário. A Equação 8 também pode ser reescrita (Equação 9) para descrever um elétron no campo elétrico criado pelo átomo de hidrogênio, de forma independente do tempo.

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 - k \frac{e^2}{|\vec{r}|} \right] \Psi(\vec{r}) = E\Psi(\vec{r}) \quad (9)$$

Esta equação tem solução bastante precisa para o átomo de hidrogênio, que contém apenas um elétron. O aumento de componentes no sistema faz com que as equações se tornem mais complexas, uma vez que envolvem a interação de cada um dos componentes entre si. Neste sentido, para conhecer o comportamento de um estado particular ou de um determinado sistema, é importante utilizar aproximações que melhor descrevem a função de onda (Ψ).

A teoria do funcional de densidade (DFT – *Density Functional Theory*) surgiu na década de 1960, inicialmente proposta por Walter Kohn e Hohenberg para obter informações sobre um dado sistema a partir de sua densidade eletrônica (Equação 10).

$$\rho(\vec{r}) = |\Psi(\vec{r})|^2 \quad (10)$$

A entidade básica no DFT é a densidade eletrônica ($\rho(\vec{r})$), descreve a probabilidade de se encontrar um elétron no ponto \vec{r} e a nível molecular representa a distribuição de cargas. Deve ser adotada como o “observável” mecânico-quântico, o que possibilita uma formulação conceitual mais acessível em termos de química descritiva, comparado ao caráter abstrato da função de onda na resolução da equação de Schrödinger.

O conceito funcional da densidade para obtenção da energia foi a base de vários modelos aproximativos durante a década de 1920. Entretanto, apenas em 1964 com os trabalhos de Kohn, Hohenberg e Shan deu-se uma prova formal que a energia e todas as propriedades eletrônicas do estado fundamental podem ser determinadas pela densidade eletrônica (Equação 11).

$$E[\rho(r)] = E_{elec} \quad (11)$$

A Equação 11 representa o teorema de Hohenberg-Kohn, que demonstra a existência de um único funcional tal que E_{elec} é a energia eletrônica exata. Além disso, demonstra-se que a energia eletrônica obtida pelo funcional da densidade do elétron está de acordo com a equação 12:

$$E[\rho(r)] = T_e[\rho(r)] + V_{nc}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad (12)$$

Em que o termo da energia cinética é T_e , a energia potencial de atração núcleo-elétron V_{ne} , a energia potencial de repulsão elétron-elétron V_{ee} e E_{xc} , o funcional de correlação e troca, este último geralmente escrito como uma soma de dois componentes, um de troca e outro de correlação.

A energia de troca e correlação é definida como um funcional de densidade eletrônica. A correlação eletrônica introduz o termo referente à correlação entre elétrons de mesmo spin e a diferença entre a energia cinética exata e a do sistema de elétrons que não interagem (ROCHA, 2010).

Os métodos mais comuns para obtenção de funcionais de densidade podem ser classificados em métodos de densidade local, métodos dos Gradientes Corrigidos ou não locais e métodos híbridos. O funcional PBE1PBE, comumente encontrado na literatura como PBE0 (PERDEW, 1986; PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1996) utiliza o método de aproximação generalizada do gradiente (GGA) para a descrição de átomos, moléculas e sólidos. Este funcional contém um peso de 25% para troca e 75% para correlação (ADAMO; BARONE, 1999).

Devido ao número elevado de átomos em sistemas supramoleculares, metodologias tradicionais, em especial as fundamentadas em mecânica clássica, são aplicadas de maneira eficiente com um custo computacional inferior ao requerido pelas metodologias quânticas. O efeito a ser investigado também é utilizado como parâmetro na escolha da metodologia a ser empregada.

Os métodos teóricos fundamentados em mecânica clássica são definidos pela Mecânica Molecular. Neste método os átomos são representados por esferas e os elétrons são generalizados em forma da carga de cada átomo. As ligações químicas e a composição molecular são definidos por campos de força que atuam sobre a molécula. Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros e interações entre átomos não ligados. Existem campos de força universais (UFF – *Universal Force Field*), generalizados ou específicos para classe de

compostos, nos quais estão inclusos parâmetros que melhor descrevem a forma de ligação dos átomos e composição molecular.

Por meio da mecânica molecular são realizados cálculos, por exemplo, de Dinâmica Molecular (MD, *Molecular Dynamics*), na qual o movimento do átomo é descrito pelas leis de Newton (Equação 13).

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i(t) \quad (13)$$

Onde $F_i(t)$, m_i e $a_i(t)$, são a força, a massa e aceleração do átomo i no tempo t . A partir da Equação 13, o movimento molecular é determinado pelas equações de movimento definidas pela aceleração e vetores posição.

As velocidades dos átomos em função da temperatura são avaliadas para formar uma "trajetória", que é simplesmente uma história do movimento do sistema ao longo do período de tempo de interesse. Por esse motivo a MD tem resultado em muitos valores de energias cinéticas e potenciais, em contraste com os métodos quanto-mecânicos (QM). A vantagem deste tipo de cálculo é o baixo custo computacional, permitindo o uso de simulações ao longo de intervalos de tempo suficientes para se deslocar sobre a superfície de energia potencial de uma molécula, e consequente amostragem de muitos estados conformacionais ao longo do caminho (LIPKOWITZ, 1998).

Geralmente, um pequeno aumento na complexidade do foco de estudos é acompanhado por um considerável aumento no custo computacional. A modelagem quanto-mecânica de sistemas supramoleculares, em função do número de átomos, usualmente implica no emprego de metodologias híbridas. Para abordar sistemas do tipo hóspede-hospedeiro, contendo CDs, o método ONION constitui uma alternativa viável (SVENSSON et al., 1996).

Além do emprego desses métodos híbridos, metodologias distintas de investigação podem ser combinadas (NASCIMENTO et al., 2005;

NASCIMENTO et al., 2007). Nesse tipo de abordagem, métodos semi-empíricos e fundamentados em DFT são utilizados na obtenção de geometrias e energias de interação, respectivamente.

O uso de métodos semi-empíricos, tais como PM3, pode resultar em geometrias de complexos de inclusão contendo CDs que apresentam distâncias menores que os raios de Van der Waals entre átomos de hidrogênio pertencentes à molécula hóspede e à molécula hospedeira. Essas interações, classificadas com interações “não físicas”, também foram observadas em geometrias obtidas através do método híbrido ONION (CASADESÚS et al., 2004).

O efeito do solvente pode ser avaliado por meio de métodos teóricos. Os solventes são definidos por meio de cálculos com dielétricos, nos quais a molécula é imersa. O resultado da influência do solvente pode ser medido pela diferença de energia do trabalho ao “mover” a molécula do vácuo para o dielétrico. Neste procedimento, esferas são consideradas ao redor dos átomos para simular a interação da superfície molecular e o meio do solvente. A energia de cavitação, necessária para inserir a molécula no dielétrico também é contabilizada (PLIEGO JR, 2006).

A energia livre de Gibbs de solvatação pode ser definida de acordo com a Equação 14. Nesta equação, ΔG_{solv} é a energia livre de Gibbs para transferir uma molécula do vácuo para o solvente. ΔG_{elec} é o componente eletrostático relacionado a energia eletrônica da molécula, ΔG_{vdw} é a componente da energia de interação entre o soluto e o solvente, ΔG_{cav} é a energia necessária para forma a cavidade da molécula no soluto relacionada a reorganização das moléculas de solvente ao redor do soluto e ΔG_{hb} é o termo que contempla a formação de ligações de hidrogênio entre o soluto e solvente.

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{hb}} \quad (14)$$

Os modelos contínuos diferenciam-se entre si pela forma como calculam os termos da Equação 14. No modelo contínuo PCM (*Polarizable Continuum Model*) a cavidade molecular é representada por esferas sobrepostas, uma para cada átomo, cujo raio depende da natureza do átomo. Para obtenção do potencial eletrostático gerado pelo dielétrico, é utilizado o método das cargas aparentes de superfície (TOMASI; MENNUCCI; CAMMI, 2005). A densidade eletrônica é determinada por cálculos de estrutura eletrônica *ab initio*, de forma que a polarização do soluto, é incluída. Além de todas essas características, a distribuição de cargas do soluto é contínua, sendo altamente realista, tornando o PCM um dos modelos contínuos mais utilizados em estudos teóricos (PLIEGO JR, 2006).

O modelo SMD (*Solvation Model of Density*) é uma variação do PCM, baseado na densidade de eletrônica do soluto e em um modelo contínuo de solvente definido pela constante dielétrica e tensões superficiais atômicas. Baseados no tratamento da densidade eletrônica de cargas para a interação entre soluto e solvente, os modelos PCM e SMD diferem basicamente na definição de raio atômico e dos termos não eletrostáticos. No entanto, de acordo com Marenich, Cramer e Truhlar a diferença fundamental entre SMD e modelos baseados em PCM, está no fato do modelo SMD conter funções paramétricas (em oposição às constantes) que utilizam como entrada propriedades físicas associadas a um determinado solvente. Além disso, de acordo com os autores, o SMD tem demonstrado uma boa precisão para o cálculo de energias livres de solvatação (MARENICH; CRAMER; TRUHLAR, 2009a, 2009b).

A modelagem molecular do solvente pode ser feita por meio de moléculas explícitas. Nessa abordagem, moléculas de água estão dispostas ao redor da molécula central e, as posições são definidas a partir de dados cristalográficos ou com o uso de caixas (*box*) com dimensões e quantidade de moléculas ajustadas por softwares. Devido à natureza dos cálculos teóricos e o custo computacional

de cada tipo de abordagem, mesmo no uso de moléculas explícitas em métodos fundamentados em mecânica clássica, os modelos contínuos são utilizados para determinar o efeito solvente em sistemas químicos.

A eficácia desse conjunto de ferramentas, para estimar a energia de interação de novos complexos, pode ser medida pela convergência entre os resultados da modelagem molecular de moléculas modelos e seus respectivos estudos experimentais.

2.6 Abordagem teórica de complexos de inclusão

A modelagem molecular do processo de formação de complexos de inclusão envolvendo CDs tem sido realizada por meio de diferentes abordagens teóricas, como a Dinâmica Molecular (FERNANDES et al., 2013) e estudos de *Docking* (ancoragem) via mecânica molecular (CERÓN-CARRASCO et al., 2016), cálculos *ab initio* (CASTRO et al., 2006) e fundamentados na teoria do funcional de densidade (DFT) (LOPES et al., 2015; XAVIER, 2009).

A convergência com resultados experimentais, mesmo levando-se em conta o nível de aproximação existente, depende da combinação de fatores utilizados para descrever o sistema químico, como o meio reacional em vácuo ou um modelo de solvente, além da escolha do método teórico, que contribui de forma importante para o cálculo de energia de interação e a conformação dos complexos de inclusão.

Nos últimos anos, a DFT tem sido aplicada com maior frequência no estudo de sistemas químicos supramoleculares. Neste estudos diferentes tipos de funcionais de densidade tem sido aplicados com sucesso, dentre os quais destacam-se BLYP (SOUSA et al., 2008), B3LYP (ZABOUB, et al., 2016), PBE1PBE (PBE0) (PEREIRA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2013), M06-2X

(CERÓN-CARRASCO et al., 2016; LOPES et al., 2015) e B-97D (PEREIRA et al., 2016).

Além do emprego desses métodos, diferentes metodologias de investigação podem ser combinadas, nas quais métodos semi-empíricos e fundamentados em DFT são utilizados na obtenção de geometrias e energias de interação, respectivamente.

Sousa et al. (2008) realizaram o estudo de complexos de inclusão entre β -CD e imipramina. (IMI) As geometrias iniciais foram totalmente otimizadas no nível PM3, o qual fornece parâmetros geométricos muito razoáveis para CDs. Também foram realizados cálculos de frequência (PM3) para as estruturas de equilíbrio e, posteriormente, a contribuição de energia eletrônica e repulsiva nuclear ($\Delta E_{\text{ele-nuc}}$) foi avaliada com cálculos BLYP/6-31G(d,p)/PM3. O modelo contínuo PCM (IEFPCM) foi aplicado para simular o meio aquoso.

Enquanto as técnicas experimentais indicaram a existência em equilíbrio entre as fórmulas 1:2, 1:1, e 2:1 do complexos IMI@ β -CD, a abordagem teórica apontou tanto em fase gasosa como em fase aquosa o complexo 2:1 IMI@ β -CD. Os cálculos indicaram que, as ligações intermoleculares de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxil da CD, desempenham um papel importante na estabilização da estrutura supramolecular 2:1, corroborando os resultados experimentais.

O uso em conjunto da abordagem teórica e técnicas experimentais foi proposto para complexos de inclusão formados entre prolina e β -CD. Os resultados teóricos (B3LYP/3-21G+ / PCM) e os espectros experimentais FTIR e UV-visíveis mostraram que o complexo estudado é estável e a prolina está totalmente incluída na cavidade da β -CD (ZABOUB, et al., 2016).

Um estudo estritamente teórico foi realizado por Cerón-Carrasco et al. (2016). Complexos formados entre os antioxidantes carnosol e ácido carnóico com as três CDs naturais disponíveis (α -CD, β -CD e γ -CD) foram obtidos a partir

de cálculos de DFT, com funcional M06-2X e conjunto de base 6-311G (d, p). O uso desse funcional se mostrou muito eficaz para sistemas onde existem interações não covalentes (CERÓN-CARRASCO et al., 2016).

O uso de Docking permitiu classificar as moléculas mais adequadas para formar complexos de inclusão estáveis, uma vez que ele rapidamente descarta as moléculas que não se encaixam na cavidade dos CDs. Os resultados mostraram que o tamanho da cavidade da α -CD não é suficientemente grande para encapsular qualquer uma das moléculas antioxidantes estudadas. Para a β -CD e γ -CD, tanto o carnosol como o ácido carnóico, podem formar complexos de inclusão. Contudo, de acordo com energias de interação mais precisas, ambos os antioxidantes se encaixam melhor em γ -CD, enquanto estão parcialmente encapsulados em β -CD, definindo assim uma preferência para a γ -CD (CERÓN-CARRASCO et al., 2016).

Algumas propriedades termodinâmicas para o processo de inclusão também podem ser determinadas a partir de métodos teóricos. Lopes et al. (2015) avaliaram a obtenção do complexo sertralina@ β -CD, utilizando o funcional PBE0 e 6-31G(d,p), 6-31++G(d,p) e 6-311++G(2df,p) como conjuntos de base. De acordo com os resultados obtidos, não há diferenças significativas entre os conjuntos de base avaliados e, em virtude do tamanho do sistema o conjunto 6-31G(d,p) foi utilizado. A inclusão de moléculas de água de hidratação, para descrever os reagentes e produtos no modelo de reação de formação do complexo, foi crucial para convergência com os dados experimentais mesmo com o uso do modelo contínuo PCM (LOPES et al., 2015).

Teixeira et al. (2013) avaliaram as propriedades físico-químicas dos complexos de inclusão de metil- β -ciclodextrina (Me- β -CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) com isoniazida. O arranjo espacial dos complexos foi inicialmente proposto de acordo com dados de ^1H RMN experimental. Cálculos teóricos (DFT) de espectros de ^1H RMN usando o funcional PBE1PBE/6-

31G(d,p) e o modelo contínuo polarizável (PCM), para vários modos de inclusão, foram propostos para auxiliar a interpretação dos resultados experimentais. Uma análise dos valores de deslocamento químico teórico e experimental confirmou prontamente a conformação mais estável do complexo de inclusão, na qual a porção hidrazida está incluída na cavidade.

O uso desse conjunto de ferramentas pode permitir uma análise teórica de complexos de inclusão sem a necessidade do emprego de técnicas experimentais. Para tanto é necessário conhecer a eficácia dos métodos teóricos, aplicando-os no estudo de sistemas modelos como referência. Ademais é importante conhecer a molécula hospedeira a ser estudada, como por exemplo o 2,4-D.

A estrutura molecular, análise conformacional e a obtenção de espectros vibracionais envolvendo agrotóxicos, como o herbicida 2,4-D, tem sido reportadas na literatura e servem como ponto de partida para estudos de reações de complexação (ANDÍNO et al., 2012; BADAWI, 2010; FREITAS; RAMALHO, 2013).

No Artigo 1 (PEREIRA et al., 2015), foram estudados a estabilidade e o arranjo espacial do complexo de inclusão 2,4D@ β -CD no vácuo, fase gasosa e em solução aquosa através da teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*). Em um primeiro momento, dois modelos contínuos de solvatação (PCM – *Polarizable Continuum Model*; SMD – *Solvation Model Density*) foram avaliados para estimar a energia de solvatação de algumas moléculas modelo. O modelo SMD foi escolhido devido ao seu desempenho para estimar valores de energia de solvatação mais próximos aos valores de referência padrão.

A geometria do complexo obtida pelo método teórico, com a inclusão da porção aromática da molécula hospedeira pela face mais larga da cavidade da CD, apresenta a mesma tendência de orientação espacial encontrada por trabalhos experimentais de complexos utilizando β -CD modificada, ou seja, o método

teórico empregado foi capaz de distinguir a orientação da molécula hóspede dentro da cavidade da β -CD.

No Artigo 2 (PEREIRA et al., 2016) foi feita uma análise utilizando o modelo de solvatação SMD e funcionais distintos de DFT (PBE0, B97-D e M06-2X), além de simulações de Dinâmica Molecular, para investigar a melhor abordagem para o estudo de compostos de inclusão entre os herbicidas 2,4-D e DIC, ambos na forma desprotonada, com β -CD.

A energia livre de Gibbs na fase condensada, obtida pelo funcional B97-D, apresentou resultado em melhor concordância com os dados experimentais, sendo recomendado o uso deste funcional para novos estudos. A Dinâmica Molecular não produziu nenhuma informação confiável para os compostos de inclusão sob investigação, em função das grandes flutuações identificadas durante as simulações.

3 CONCLUSÃO

Complexos de inclusão envolvendo ciclodextrinas e agrotóxicos podem ser estudados, tanto por meio de técnicas experimentais, quanto por abordagens teóricas. O estudo teórico deste sistemas químicos possibilita a obtenção de diferentes tipos de propriedades como o arranjo espacial e a estabilidade dos complexos formados, além da compreensão dos resultados experimentais a partir de uma análise em nível molecular.

No Artigo 1 deste trabalho, a geometria do complexo 2,4-D@ β -CD obtida pelo método teórico, apresentou uma tendência de inclusão da porção aromática da molécula hóspede na cavidade da CD via “head”, mesma orientação espacial encontrada por trabalhos experimentais de complexos utilizando β -CD modificada, ou seja, o método teórico empregado foi capaz de distinguir a orientação esperada da molécula hóspede dentro da cavidade da β -CD.

Dois modelos contínuos de solvatação (PCM – *Polarizable Continuum Model*; SMD – *Solvation Model Density*) foram empregados para avaliar a energia de solvatação de algumas moléculas modelo. O desempenho do modelo SMD, ao comparar a energia de solvatação teórica e experimental, foi crucial para sua escolha como modelo contínuo no estudo de complexos de inclusão.

No artigo 2, a energia livre de Gibbs na fase condensada obtida pelos funcionais B97-D e M06-2X apresentaram resultados em melhor concordância com os dados experimentais. A Dinâmica Molecular não produziu nenhuma informação confiável para os compostos de inclusão sob investigação, em função das grandes flutuações identificadas durante as simulações.

A eficácia dos métodos aplicados na obtenção de parâmetros teóricos, coerentes com os dados experimentais, sugere é possível a sua aplicação em novos sistemas, para os quais ainda não existem dados experimentais de formação de complexos.

Neste cenário novos estudos envolvendo complexos de inclusão com diferentes moléculas hóspedes ou hospedeiras, como a cucurbiturila por exemplo, permitem a expansão da aplicabilidade destes métodos em uma nova área da química supramolecular.

REFERÊNCIAS

ADAMO, C.; BARONE, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 110, n. 13, p. 6158-70, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Parecer Técnico de Reavaliação nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA**. 2015. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2719308/Parecer+T%C3%A9cnico+de+Reavalia%C3%A7%C3%A3o+n%C2%BA+7-2015+-+GGTOX.pdf/055bdca1-a19d-4ee0-a50c-975e8ef43577?version=1.0&download=true>>. Acesso em: 23/06/2016.

ALONSO, M. L. et al. Structure of the β -cyclodextrin: acetamiprid insecticide inclusion complex in solution and solid state. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 86, n. 1-2, p. 103-110, 2016.

ANCONI, C. P. A. **Pseudo-polirotaxanos e tubos moleculares de a ciclodextrinas no âmbito das metodologias teóricas**. 2007. 174 p. Tese (Doutorado em Química)–Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ANDINO, M. G. et al. Theoretical Studies on the Structure and Spectroscopic Properties of 2, 4-D (2, 4-Diclorofenoxiacetic Acid). **International Journal of Chemoinformatics and Chemical Engineering**, Hershey, v. 2 n. 1, p. 1-11, 2012.

AUGUSTO, L. G. S. et al. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Associação Brasileira de Saúde Coletiva – ABRASCO, Rio de Janeiro, 2012. 135p.

BADAWI, H. M. Molecular structure and vibrational assignments of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 24-27. 2010.

BARMAN, S. et al. NMR, surface tension and conductance study to investigate host–guest inclusion complexes of three sequential ionic liquids with β -cyclodextrin in aqueous media. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 658, p. 43-50, 2016.

BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin–guest interactions. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 17, n. 11, p. 623-629, 2012.

BRASIL. Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 12 de jul. 1989. Seção 1, p. 11459.

CASADESÚS, R. et al. Testing electronic structure methods for describing intermolecular H···H interactions in supramolecular chemistry. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 25, n. 1, p. 99-105. 2004.

CASTRO, E. A. et al. Quantum mechanical study of the inclusion process of adamantanol isomers by l-tryptophan-modified- β -cyclodextrin. **Molecular Simulation**, New York, v. 32, n. 8, p. 623-631, 2006.

CERÓN-CARRASCO, J. P. et al. Exploiting the cyclodextrins ability for antioxidants encapsulation: A computational approach to carnosol and carnosic acid embedding. **Computational and Theoretical Chemistry**, Amsterdam, v. 1077, p. 65-73, 2016.

CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 5, p. 1325-57. 1997.

CRINI, G. Review: a history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 21, p. 10940-75. 2014.

DANG, Z. et al. Applications of powder X-ray diffraction to inclusion complexes of cyclodextrins. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 15, n. 6, p. 848-861, 2011.

DE CARVALHO, L. B.; PINTO, L. D. M. A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 74, n. 1-4, p. 375-81. 2012.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 9, p. 1033-46. 2004.

EPA - US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ingredients Used in Pesticide Products: 2,4-D**. 2013. Disponível em:

<<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

EZAWA, T. et al. Changes in the Physicochemical Properties of Piperine/ β -Cyclodextrin due to the Formation of Inclusion Complexes. **International Journal of Medicinal Chemistry**, New York, v. 2016, 2016.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides**. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/a0220e/a0220e00.pdf>>. Acesso em: 20/06/2016.

FERNANDES, S. A. et al. Inclusion complexes of Schiff bases as phyto-growth inhibitors. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 75, n. 1-2, p. 197-204, 2013.

FREITAS, M. P.; RAMALHO, T. D. C. Employing conformational analysis in the molecular modeling of agrochemicals: insights on QSAR parameters of 2,4-D. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 6, p. 485-94. 2013.

FRIEDRICH, K. Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D. **Fundação Oswaldo Cruz**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2014. 45 p.

FRISCH, M. et al. Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian. Inc., Wallingford, CT, 2009.

GARRIDO, E. M. et al. Host-guest complexes of phenoxy alkyl acid herbicides and cyclodextrins. MCPA and β -cyclodextrin. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 47, n. 9, p. 869-75. 2012.

LANDY, D. et al. Remediation technologies using cyclodextrins: an overview. **Environmental Chemistry Letters**, New York, v. 10, n. 3, p. 225-37. 2012.

LIPKOWITZ, K. B. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1829-74. 1998.

LOPES, J. F. et al. Inclusion complex thermodynamics: The β -cyclodextrin and sertraline complex example. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, New York, v. 62, n., p. 11-17. 2015.

MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 113, n. 18, p. 6378-96. 2009a.

_____. Performance of SM6, SM8, and SMD on the SAMPL1 test set for the prediction of small-molecule solvation free energies[†]. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 113, n. 14, p. 4538-43. 2009b.

MONTEIRO, A. P. F. et al. Nanofibers containing tetracycline/ β -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 156, p. 417-426, 2017.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 101, p. 238-250, 2014.

_____. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 113, p. 226-238, 2015.

NASCIMENTO, C. S. et al. Theoretical study of the alpha-cyclodextrin dimer. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 109, n. 14, p. 3209-19. 2005.

_____. An efficient methodology to study cyclodextrin clusters: application to alpha-CD hydrated monomer, dimer, trimer and tetramer. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 59, n. 3-4, p. 265-77. 2007.

PALMER, D. S. et al. Accurate calculations of the hydration free energies of druglike molecules using the reference interaction site model. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 133, n. 4, p. 044104. 2010.

PASSOS, J. J. et al. Multi-equilibrium system based on sertraline and β -cyclodextrin supramolecular complex in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 421, n. 1, p. 24-33, 2011.

PERDEW, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, New York, v. 33, n. 12, p. 8822. 1986.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Review Letters**, New York, v. 77, n. 18, p. 3865. 1996.

PEREIRA, R. A. et al. Stability and spatial arrangement of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and β -cyclodextrin inclusion compound: A theoretical study. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 633, n., p. 158-62. 2015.

_____. Theoretical inclusion of deprotonated 2, 4-D and dicamba pesticides in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocylic Chemistry**, Dordrecht, v. 86, n. 3-4, p. 343-49. 2016.

PÉREZ-MARTÍNEZ, J. I. et al. 2, 4-D- α -Cyclodextrin Complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 965-972, 1998.

_____. Improvement of the desorption of the pesticide 2, 4-D via complexation with HP- β -cyclodextrin. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 5, p. 425-430, 2000.

PLIEGO JR, J. R. Modelos contínuos do solvente: fundamentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 535-42. 2006.

PUBCHEM. **Dicamba**. 2016. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dicamba>>. Acesso em: 20 de mar. 2016.

REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1875-918. 1998.

ROCHA, M. V. J. **Análise do modo de ação biocida de compostos organoestânicos: ensaios a partir de modelos teóricos e experimentais**. 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)–Universidade Federal de Lavras, 2010.

RYZHAKOV, A. et al. Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 105, n., p. 13. 2016.

SANCHO, M. I. et al. Theoretical and Experimental Study of Inclusion Complexes of β -Cyclodextrins with Chalcone and 2',4'-Dihydroxychalcone. **The**

Journal of Physical Chemistry B, Washington, v. 120, n. 12, p. 3000-3011, 2016.

SCHNEIDER, H. et al. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1755-1786, 1998.

SHARMA, N.; BALDI, A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. **Drug Delivery**, London, v. 23, n. 3, p. 729-47. 2016.

SHEN, C. et al. Complexation of capsaicin with β -cyclodextrins to improve pesticide formulations: effect on aqueous solubility, dissolution rate, stability and soil adsorption. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 72, n. 3-4, p. 263-274, 2012.

SIEROŃ, L.; KOBYLECKA, J.; TUREK, A. Crystal packing and supramolecular motifs in four phenoxyalkanoic acid herbicides—low-temperature redeterminations. **Organic Chemistry International**, New York, v. 2011, n., p. 2011.

SMITH, V. J. et al. Investigation of the inclusion of the herbicide metobromuron in native cyclodextrins by powder X-ray diffraction and isothermal titration calorimetry. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, n. 17, p. 2388-2393, 2009.

_____. Cyclodextrin inclusion of four phenylurea herbicides: determination of complex stoichiometries and stability constants using solution ^1H NMR spectroscopy. **Supramolecular Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 172-177, 2010.

SILVA, J. A. A. A Regulação e o Mercado de Agrotóxicos no Brasil. In: I SEMANA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO CONGRESSO NACIONAL: a Anvisa e o Desenvolvimento Social e Econômico do Brasil, 1. 2012, Brasília. **Anais eletrônicos**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

SOUSA, F. B. De et al. Supramolecular self-assembly of cyclodextrin and higher water soluble guest: Thermodynamics and topological studies. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 130, n. 26, p. 8426-8436, 2008.

SVENSSON, M. et al. ONIOM: A multilayered integrated MO+ MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-

Alder reactions and Pt (P (t-Bu) 3) 2+ H2 oxidative addition. **The Journal of Physical Chemistry**, New York, v. 100, n. 50, p. 19357-63. 1996.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1743-53. 1998.

_____. Past, present and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 76, n. 10, p. 1825-45. 2004.

SZENTE, L.; SZEMÁN, J.; SOHAJDA, T. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v., n., p. 2016.

TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas**. 2009. 99 p. Dissertação (Mestre em Produção e Controle Farmacêuticos)—Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TEIXEIRA, M. G. et al. Theoretical and experimental study of inclusion complexes formed by isoniazid and modified β -cyclodextrins: ^1H NMR structural determination and antibacterial activity evaluation. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 118, n. 1, p. 81-93. 2013.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, n. 8, p. 2999-3094. 2005.

TSORTEKI, F.; BETHANIS, K.; MENTZAFOS, D. Structure of the inclusion complexes of heptakis (2, 3, 6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin with indole-3-butiric acid and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Carbohydrate research**, Amsterdam, v. 339, n. 2, p. 233-240, 2004.

VALENTE, A. J. M.; CARVALHO, R. A.; SÖDERMAN, O. Do cyclodextrins aggregate in water? Insights from NMR experiments. **Langmuir**, Washington, v. 31, n. 23, p. 6314-6320, 2015.

WALTERS, J. Environmental fate of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Department of Pesticide Regulations, Sacramento, CA, 1999. 18p.

YATSU, Francini KJ et al. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 98, n. 1, p. 726-735, 2013.

XAVIER, M. J. **Estudo sistemático com complexos de inclusão a base de ciclodextrinas no controle de interferentes químico-ambientais: uma metodologia teórica**. 2009. 111 p. Dissertação (Mestrado em Química)– Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2009.

ZABOUB, A. et al. A combined DFT and experimental study of proline/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 216, p. 716-723, 2016.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1**

(Publicado em *Chemical Physics Letters*)

Stability and spatial arrangement of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and β -cyclodextrin inclusion compound: A theoretical study

Robson A. Pereira^a, Cleber P. A. Anconi^{a,*}, Clebio S. Nascimento Jr.^b, Wagner B. De Almeida^c, Hélio F. Dos Santos^d

a Laboratório de Química Fundamental
Departamento de Química – Bloco C2
Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário
37200-000 – Lavras – MG – Brasil

b LQTC: Laboratório de Química Teórica e Computacional
Departamento de Ciências Naturais (DCNAT),
Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), Campus Dom Bosco
36301-160 – São João Del Rei – MG – Brazil

c Departamento de Química Inorgânica
Instituto de Química,
Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho
24020-141 – Niterói – RJ – Brazil

d NEQC: Núcleo de Estudos em Química Computacional

Departamento de Química, ICE
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Campus Universitário Martelos
36036-330 – Juiz de Fora – MG – Brazil

* Corresponding author at:

Laboratório de Química Fundamental, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), P O Box 3037, Lavras, MG 37200-000, Brazil. E-mail address: cleberanconi@dqi.ufla.br (C.P.A. Anconi).

Recebido 24 de abril de 2015

Disponível online 1 Junho 2015 (

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.05.044>

ABSTRACT

The present letter reports results from a comprehensive theoretical analysis of the inclusion process involving 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and β -cyclodextrin (β -CD) for which the experimental data of formation is available. Spatial arrangement and stabilization energies were evaluated in gas phase and aqueous solution through density functional theory (DFT) and through the use of SMD implicit solvation approach. The discussed methodology was applied to predict the stability and identify the most favorable form (deprotonated or neutral) as well as the most probable spatial arrangement of the studied inclusion compound.

1. Introduction

Cyclodextrins (CDs) are cyclic α -1,4 linked oligosaccharides of d-glucopyranose units. The most common CDs possess two distinct rims, a wider (named head, H) containing all secondary hydroxyl groups and a narrower (named tail, T) containing all primary hydroxyl groups (Figure 1a). The CD symmetry is similar to a truncated cone exhibiting a hydrophobic cavity and a hydrophilic outer surface [1]. The applicability of CDs in Chemistry is closely related to its ability to form inclusion compounds with a wide range of guest molecules fundamentally in aqueous solutions [2,3]. The molecular encapsulation into CDs has been extensively studied with a wide variety of guests, such as pharmaceuticals and biological compounds and agricultural chemicals including herbicides, insecticides, fungicides, repellents, pheromones and growth regulators. This specific property makes CDs suitable for application in environmental protection by pollutant trapping [3,4].

Pesticides have been one of the main tools to improve the agricultural production through the combat of many kinds of pests that could destroy crops. However, the existence of these compounds in the environment and ecosystems causes adverse impacts by contaminating soil, surface and groundwater, thus contributing to a loss in biodiversity [5]. In this sense, CDs can be employed in remediation [5–9] or in the formulation of new herbicides [10,11].

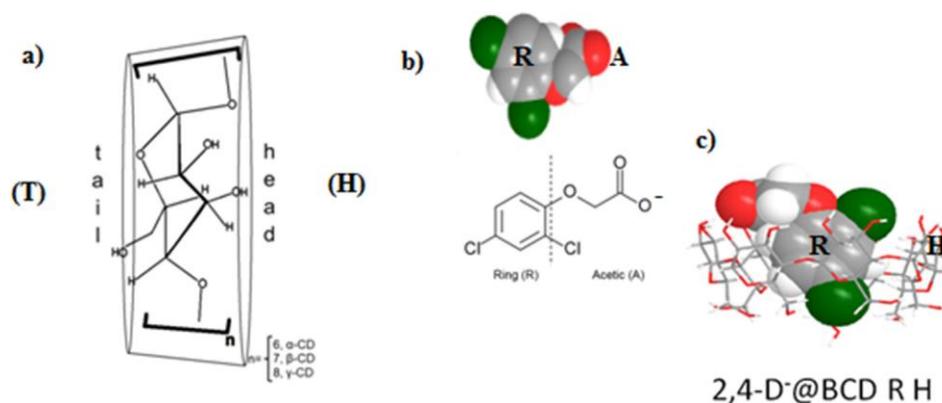


Figure 1. (a) General structure of common cyclodextrins (CDs) and the schematic representation used in the present work. (b) Structure of 2,4-dichlorophenoxyacetate for which dotted lines limit the encapsulated portion of the guest molecule (also with 3D structure). (c) Identification used in the present work.

Among herbicides, the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, Figure 1b) is broadly used, a compound found as different salt derivatives or ester forms that has been applied mainly against broad-leaved weeds in crops. According to experimental findings, the interaction between 2,4-D and β -CD in solution and in the solid state enhances its solubility and dissolution rate. In addition, their inclusion effect has been investigated in soil adsorption–desorption [12,13] as well as the use of CDs for 2,4-D soil remediation [14].

The inclusion process comprises several host-guest interactions, most of them of solvophobic nature. In general, each weak interaction such as van der Waals, hydrophobic or hydrogen-bonding is not enough to lead to the inclusion complex formation individually. Therefore, it can be stated that the overall driving force responsible for the inclusion phenomenon is the sum of several types of interaction.

Modern computer processors allow theoretical studies concerning the formation of inclusion compounds. Nonetheless, quantifying appropriately the interaction energy of such systems by means of first principles calculations is still a challenging task. The size of CDs and their derivatives makes applications of quantum mechanics difficult. Moreover, these macrocycles have many rotatable bonds, which imply in a certain number of conformational states that usually are not completely investigated in a quantum mechanical study. Regarding them only some representative arrangements are explicitly treated.

A more accurate study of inclusion processes must also consider the use of aqueous media models, what represents another challenge. Classical methods such as molecular dynamics (MD) should be considered more appropriated to model explicit solvent molecules. However in order to discuss the relative stability of a set of configurations in solution, representative snapshots are collected along trajectories and then treated, for example, employing the Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann surface area (MM-PBSA) methodology. Thus, in a typical MD study performed through the AMBER package [15], explicit solvent molecules are employed along a trajectory but implicit models are applied to evaluate interaction energies in aqueous media. Then, the evaluation of solvation free energies of neutral and ionic species by quantum mechanical continuum methods is an essential tool for modeling chemical processes in the liquid phase.

In the present work DFT has been applied in an attempt to identify the most probable conformation of the inclusion compound formed by 2,4-D and β -CD after choosing the appropriate implicit solvation model. It is important to mention that no theoretical investigations concerning such kind of supramolecular complex have been performed so far. We started assessing the performance of implicit approaches in the evaluation of the solvation Gibbs free energy of some small guests commonly used in CD chemistry, in hydrophobic media and water. Afterwards, with an appropriate judgment, the implicit solvation data has been

applied to theoretically identify the more favorable arrangement of the 2,4-D and β -CD inclusion compound. The theoretical results strongly suggest a specific orientation for 2,4-D⁻@ β -CD that resembles a similar inclusion compound formed by such guest molecule and modified β -CD [16].

2 Theoretical details

All calculations were performed in GAUSSIAN 09 quantum mechanical package, revision A.02 [17]. In a first step phenol (PhOH), benzoic acid (PhCOOH), aniline (PhNH₂) and pyridine in their neutral, deprotonated or protonated forms were submitted to geometry optimization by PBE1PBE exchange correlation functional [18,19] with 6-31G(d,p) and 6-311++G(2d,2p) split valence basis set [20,21]. In order to evaluate the solvation free energy (ΔG^*_s) in hydrophobic (solvent = benzene, $\epsilon = 2.2706$) and hydrophilic (solvent = water, $\epsilon = 78.3553$) media, the PCM [22] and SMD [23] continuum models were employed with defaults parameters of GAUSSIAN 09 (A.02). These imply in a cavity built with the UFF (universal force-field) atomic radii and scaled van der Waals surface factor 1.1 (α) for PCM and an intrinsic atomic SMD-Coulomb radii for the cavity and van der Waals surface with $\alpha = 1.0$ for the SMD. In both methods explicit hydrogen atoms were used (all atom mode).

The SMD model is based on a self-consistent reaction field treatment of bulk electrostatics that involves an integration of the nonhomogeneous-dielectric Poisson equation and on a cavity dispersion-solvent-structure protocol for the non-bulk-electrostatic contribution to the free energy of solvation. The keyword PCM in GAUSSIAN 09 allows performing a reaction field calculation using the integral equation formalism model named IEFPCM, a name for the bulk-electrostatic algorithm used in the current version of PCM.

Some details of the formalism and the implementation have changed with respect to other versions of the package, such as GAUSSIAN 03. In addition, according to GAUSSIAN 09 reference manual the IEFPCM and SMD models differ basically on the atomic radii definition and non-electrostatic terms. However, according to Marenich, Cramer and Truhlar the fundamental difference between SMD and PCM based models, corresponds to the universality of the former in its construction. The other models are universal in their philosophy: that is, were sufficient data to be available, accurate parameters could presumably be determined for any solvent. SMD relies on parametric functions (as opposed to constants) that take as input physical properties associated with a given solvent (or more generalized condensed phase). In addition, according to the authors SMD is by far the most accurate parameterization employing IEF-PCM for solvation free energies [23].

The benzene molecule was also included in such preliminary study. According to the literature [3], such molecules form inclusion compounds with β -CD and reference values concerning solvation experimental data have been previously reported [24].

Full unconstrained geometry optimizations were performed for isolated molecules and inclusion complexes. In such calculations, PBE1PBE exchange correlation functional was applied with 6-31G(d,p) basis set as previously reported for inclusion compounds [25].

The β -CD coordinates were obtained from crystallographic data [26]. Water molecules have been removed prior to the optimization. Through the aid of appropriate molecular software, the 2,4-D starting geometry was constructed as well as the distinguishable conformations of the 2,4-D@ β -CD. The host-guest systems matching two different portions of the 2,4-D molecule were included in two distinct orientations as depicted Figure 2. The gas phase interaction energy of each supramolecular system ($\Delta E_{\text{ele-nuc}}$) was evaluated through the difference in

electronic plus nuclear repulsion energies assuming the chemical process: $2,4\text{-D} + \beta\text{-CD} \rightarrow 2,4\text{-D@}\beta\text{-CD}$. Deprotonated and neutral 2,4-D molecules were employed in the calculations.

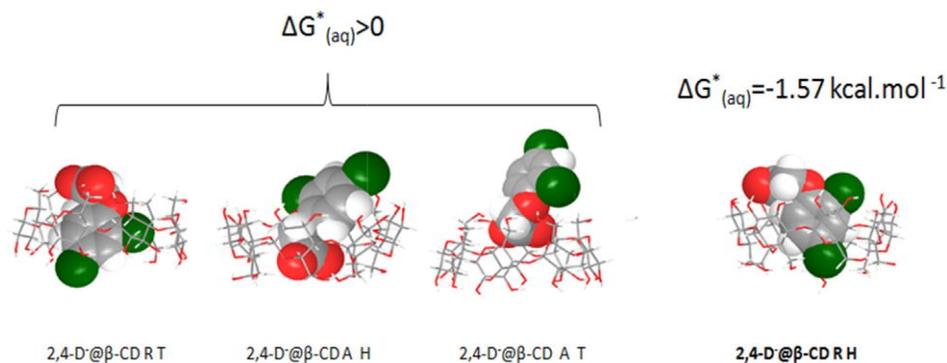


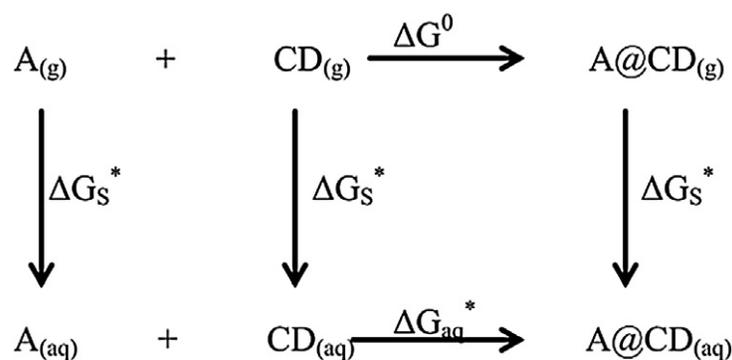
Figure 2. PBE1PBE/6-31G9(d,p) fully optimized host-guest structures of distinct spatial arrangements between $\beta\text{-CD}$ and the charged guest $2,4\text{-D}^-$ according to the identification scheme depicted in Figure 1. The compound $2,4\text{-D}^-@\beta\text{-CDRH}$ (as indicated in this figure) is the most stable spatial arrangement in solution. Gibbs free energies of reaction in condensed phase (ΔG^*_{aq}) are also indicated.

Harmonic frequency calculations were carried out for all single structures and inclusion systems characterizing them as true minima on the potential energy surface (all vibrational frequencies are real). The harmonic frequencies and fully optimized geometrical parameters were then used for the evaluation of the thermodynamic quantities with the aid of the well-known formulas of statistical thermodynamics at $T = 298.15 \text{ K}$ and $p = 1 \text{ atm}$, as implemented in the GAUSSIAN 09 quantum mechanical package, revision A.02 [17]. Fully optimized gas phase structures and harmonic frequency calculations were used to estimate relative Gibbs free energies (ΔG^0) according to Eq. (1), for which ΔG^0_T stands for the thermal correction to the Gibbs free energy. In the study of the inclusion formation, the solvent effect (ΔG^*_s contribution) was taken into account using the SMD continuum model in single point calculations in water. The

reaction Gibbs free energy in condensed phase (ΔG^*_{aq}) (2), in the basis of the thermo chemical cycle depicted in Scheme 1 [27], was evaluated by PBE1PBE/6-31G(d,p) for all distinct spatial arrangement of the CD inclusion compounds with deprotonated or neutral 2,4-D guest molecules.

$$\Delta G^0 = \Delta E_{\text{elec-nuc}} + \Delta G^0_{\text{T}} \quad (1)$$

$$\Delta G^*_{\text{(aq)}} = \Delta G^0 + \delta \Delta G^*_s \quad (2)$$



Scheme 1 Thermodynamic cycle used to calculate the inclusion free energy in solution

3 Results and discussion

Basically, the formation of an inclusion compound can be understood in terms of the stabilization of parts or the entire guest in a hydrophobic environment (inside CD cavity) instead of being solvated by water molecules. Theoretically, continuum solvation models can be applied in a quantum mechanical study of the inclusion formation. In this sense, a simple test of methodology consists on investigating the Gibbs solvation energy of some representative guests in distinct environments. In such preliminary study we focused on the overall tendency of the PCM and SMD continuum methods. In addition, the role of the basis set was also investigated. The data for neutral, deprotonated and protonated molecules

have been evaluated. Reference values reported by Pliego and Riveros [24] have been included along the tabulated outcomes for sake of comparison.

From the analysis of ΔG_s^* s data for neutral species (Table 1), no significant differences were identified when 6-31G(d,p) and 6-311++G(2d,2p) basis set data were compared using PBE1PBE exchange correlation functional (see data in brackets). For charged species such differences were more pronounced in which PCM values seem to be less sensible to the basis set.

Table 1

Solvation free energy (ΔG_s^*), in kcal mol⁻¹, of some neutral molecules in water and benzene evaluated through PCM and SMD continuum approaches by PBE1PBE/6-311++G(2d,2p)^a.

Compound	ΔG_s^*	ΔG_s^* (Water)		$\Delta \Delta G_s^*$		ΔG_s^* (Benzene)	
	(Water)			(Water) ^c			
	Reference Values ^b	PCM	SMD	PCM	SMD	PCM	SMD
Benzene	-	-1.9 [-1.9]	-1.2 [-1.3]	-	-	-0.8 [-0.8]	-5.2 [-5.2]
PhOH	-6.6	-4.2 [-4.3]	-5.6 [-5.9]	2.4	1.0	-1.8 [-1.8]	-6.2 [-6.2]
PhCOOH	-7.9	-4.7 [-4.6]	-5.8 [-5.9]	3.2	2.1	-2.1 [-2.1]	-6.9 [-6.8]
PhNH ₂	-5.5	-4.4 [-4.7]	-5.3 [-5.7]	1.1	0.2	-1.8 [-1.9]	-6.0 [-6.1]
Pyridine	-4.7	-3.4 [-3.1]	-4.6 [-4.2]	1.3	0.1	-1.5 [-1.3]	-5.0 [-4.8]

^a In brackets values at PBE1PBE/6-31G(d,p).

^b Reference values from Pliego and Riveros (PLIEGO JR; RIVEROS, 2002)

^c Absolute difference between reference and theoretical data for water solvent.

Focusing on neutral species (Table 1), it is noticeable that PCM and SMD solvation energies (ΔG_s^*) are very distinct, being SMD values in general more

negative. The ΔG_s^* data for benzene molecule strongly indicates a limitation in PCM formalism. PCM predicted a more negative ΔG_s^* for benzene in water than in benzene (Table 1, first line). The underestimated ΔG_s^* in hydrophobic medium evaluated at PCM level of theory indicated an artificial stabilization of benzene molecules in aqueous media, what is incorrect. SMD data correctly predicted a stabilization of benzene molecules in a hydrophobic media. For the other molecules (PhOH, PhCOOH, PnNH₂ and pyridine), the same trend was identified what was not expected considering the low solubility of such molecules in water. The comparison between continuum and reference data for water given in Table 1 also indicates that SMD responses were more reliable. The difference between reference and theoretical data are tabulated as ΔG_s^* in Table 1.

In general PCM outcomes deviates approximately 1 kcal mol⁻¹ from SMD with the latter being closer to the reference data. In the context of inclusion chemistry, the expected distinction between the stability of some molecule in the hydrophobic CD cavity or in the aqueous media can play a role even assuming that other interactions such as van der Waals also contribute to the inclusion complexation. Therefore, at least for neutral species PCM solvation model should be carefully used.

Gibbs solvation energies of deprotonated or protonated guests are given in Table 2. A similar tendency can be promptly identified for PCM and SMD continuum model values for such charged molecules even though the differences between both continuum approaches are larger than those for neutral species. Surprisingly, for charged species the smallest difference between PCM and SMD approaches corresponds to 3.9 kcal mol⁻¹ (see data for PhO⁻, Table 2). According to ΔG_s^* in Table 2, the deviations from reference data (water solvent) are also larger for both continuum methods, being SMD values closer to the reference data. In fact SMD ΔG_s^* are more negative.

There is no reference data concerning neutral or deprotonated 2,4-D molecule. For aqueous medium, PCM and SMD predicts a ΔG_s^* equal to -5.6 kcal mol $^{-1}$ and -7.4 kcal mol $^{-1}$, respectively, by PBE1PBE/6-311++G(2d,2p) for neutral molecule. The values are very similar for 6-31G(d,p) basis set being -5.6 kcal mol $^{-1}$ and -7.4 kcal mol $^{-1}$ for PCM and SMD, respectively. In addition, as identified for all neutral molecules in Table 1, except benzene, SMD solvation energies are more negative. For 2,4-D $^-$, the deprotonated molecule, PCM and SMD ΔG_s^* corresponds to -54.8 kcal mol $^{-1}$ and -59.2 kcal mol $^{-1}$, respectively by PBE1PBE/6-311++G(2d,2p).

Table 2

Solvation free energy (ΔG_s^*), in kcal mol $^{-1}$, of some deprotonated or protonated molecules in water and benzene evaluated through PCM and SMD continuum approaches by PBE1PBE/6-311++G(2d,2p)^a.

Compound	ΔG_s^*	ΔG_s^* (Water)		$\Delta \Delta G_s^*$		ΔG_s^* (Benzene)	
	(Water)			(Water) ^c			
	Referen	PCM	SMD	PCM	SMD	PCM	SMD
	ce						
	Values ^b						
PhO $^-$	-71.3	-57.4[-57.6]	-61.3[-63.0]	13.9	10.0	-31.1[-31.4]	-33.6[-34.5]
PhCOO $^-$	-71.2	-60.0[-59.7]	-64.6[-66.5]	11.2	6.6	-32.1[-32.2]	-33.9[-34.0]
PhNH $_3^+$	-72.8	-58.9[-58.9]	-68.3[-69.0]	13.9	4.5	-32.2[-32.2]	-42.0[-41.9]
pyridineH $^+$	-61.1	-53.1[-53.9]	-59.5[-59.2]	8.0	1.6	-30.0[-29.9]	-38.1[-37.9]

^a In brackets values at PBE1PBE/6-31G(d,p).

^b Reference values from Pliego and Riveros (PLIEGO JR; RIVEROS, 2002)

^c Absolute difference between reference and theoretical data for water solvent.

For 6-31G(d,p) basis set the corresponding values were $-52.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $-57.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ for PCM and SMD continuum models, respectively. As identified for the probe charged molecules (Table 2), SMD solvation energies are more negative. For 2,4-D⁻ molecules, PCM and SMD sensitivity to the basis set was similar. Clearly, the ΔG^*_s values for 2,4-D and 2,4-D⁻ are aligned to the data in Tables 1 and 2 for the other molecules. Therefore, on the basis of tabulated ΔG^*_s for the probe molecules, SMD continuum solvation model has been applied to evaluate the Gibbs free energies of formation in condensed phase (ΔG^*_{aq}) for 2,4-D@ β -CD and 2,4-D⁻@ β -CD inclusion compounds.

The complexation of 2,4-D and β -CD have been attested experimentally with [14] or without a buffer [28] solution. The pKa of the 2,4-dichlorophenoxyacetic is 2.73 and in a phosphate buffer (pH = 7.0) one expects the complexation between deprotonated acid (2,4-D⁻) and β -CD [14]. In the present work neutral and charged guests were investigated and data concerning the formation of neutral and charged inclusion compounds were evaluated.

The interaction energies in vacuum ($\Delta E_{\text{ele-nuc}}$) are given in Table 3. The values are considerable negative, being 2,4-D@ β -CD RH the complex with the ring (aromatic) portion inside CD cavity the most favorable one with $\Delta E_{\text{ele-nuc}} = -18.3 \text{ kcal mol}^{-1}$. For all spatial arrangements, the thermal corrections at gas phase (ΔG^0_T) are positive contributions. Such quantities are slightly dependent of the host-guest spatial arrangement. In fact the entropic contributions were all negative (data not shown), what implies in the positive correction to Gibbs free energy. According to the data in Table 3, ΔG^0 was negative (gas phase) only for 2,4-D@ β -CD R H because of its smaller (more negative) $\Delta E_{\text{ele-nuc}}$. It is noticeable that the Gibbs free energies of formation in condensed phase (ΔG^*_{aq}) were positive for all neutral species. In light of the approximations of applied quantum mechanical approach, the experimentally reported inclusion compounds were not formed with neutral guests.

Table 3

Interaction energies, thermodynamic quantities and Gibbs free energies of reaction in condensed phase (ΔG_{aq}^*) in kcal mol⁻¹, evaluated at PBE1PBE/6-31G(d,p) for distinct spatial arrangements of 2,4D@ β system.

Neutral inclusion compound orientation	$\Delta E_{\text{ele-nuc}}$	ΔG_{T}^0	ΔG^0	SMD	
				$\delta\Delta G_{\text{S}}^*$	ΔG_{aq}^*
2,4-D@ β CD A H	-12.0	14.3	2.3	1.0	3.3
2,4-D@ β CD A T	-10.9	15.6	4.8	3.4	8.2
2,4-D@ β CD R H	-18.3	16.5	-1.9	4.0	2.2
2,4-D@ β CD R T	-11.6	17.0	5.4	4.9	10.3

However, we must be very careful to fix definitive conclusion because DFT interaction energies may not be so accurate since it can be strongly dependent on the used specific functional and basis set. It has been recently shown that M06-2x DFT functional yield inclusion complex formation energy for the cisplatin–nanohorn system[29] was significantly more negative (leading to a larger stabilization of the complex) than the commonly used B3LYP functional. Therefore, if $\Delta E_{\text{ele-nuc}}$ is calculated with the M06-2x functional the resulting ΔG^0 value could be negative for all complexes. Nonetheless, such functional and basis set dependence study implies on a considerable computational cost and is beyond the scope of the present work. Focusing on the relative interaction energies, both neutral and charged guests possess analogous spatial arrangements for the most relative stable inclusion compound.

Table 4

Interaction energies, thermodynamic quantities and Gibbs free energies of reaction in condensed phase (ΔG_{aq}^*) in kcal mol⁻¹, evaluated at PBE1PBE/6-31G(d,p) for distinct spatial arrangements of 2,4D⁻@ β system.

Charged inclusion compound orientation	$\Delta E_{\text{ele-nuc}}$	ΔG_{T}^0	ΔG^0	SMD	
				$\delta\Delta G_{\text{S}}^*$	ΔG_{aq}^*
2,4-D ⁻ @ β CD A H	-49.9	18.5	-31.5	32.5	1.0
2,4-D ⁻ @ β CD A T	-51.1	17.9	-33.3	33.5	0.3
2,4-D ⁻ @ β CD R H	-40.5	16.9	-23.6	22.0	-1.6
2,4-D ⁻ @ β CD R T	-44.2	21.8	-22.4	36.4	14.0

The interaction energies in vacuum ($\Delta E_{\text{ele-nuc}}$) are given in Table 4. The values for deprotonated guests were considerably more negative than the values for neutral species (Table 3). The thermal corrections to Gibbs free energy in gas phase were also positive contributions (ΔG_{T}^0). Because of the very negative values of the $\Delta E_{\text{ele-nuc}}$, all tabulated ΔG^0 were enormous negative quantities.

However, the influence of the solvent was drastic and distinct for some spatial charged host-guest arrangements. The $\Delta\Delta G_{\text{S}}^*$ quantities for deprotonated guests were positive (higher than values reported for neutral species in Table 3), which are well understood due to the high solvation energy of the free ion compared to the inclusion complex. Despite the considerable negative ΔG^0 , only one spatial arrangement identified as 2,4-D⁻@ β -CD R H was predicted to be favorable in aqueous solution.

For that complex, the Gibbs free energy of formation in condensed phase (ΔG_{aq}^*) was -1.6 kcal mol⁻¹, indicating that in solution the aromatic ring portion should be inside the CD cavity with an exposure charge moiety (the deprotonated

acid portion) as also indicated in Figure 2. This result seems to be reasonable, once in such arrangement the inclusion of the aromatic portion in the hydrophobic cavity allows the interaction between the charged guest moiety and the hydrophilic environment. The resulting theoretical spatial arrangement resembles a similar inclusion compound formed by the same guest molecule and modified β -CD [16], what supports the adopted theoretical strategy.

4 Conclusions

In the present Letter, the most probably spatial arrangement of the inclusion compound formed by 2,4-D and β -CD was theoretically identified by PBE1PBE/6-31G(d,p) level of theory and SMD continuum model. Our results strongly indicated only one favorable spatial arrangement identified as 2,4-D@ β -CD R H for which the aromatic portion relies inside CD cavity with an exposure acetate portion. The spatial arrangement theoretically predicted in the present work is analogous to that experimentally identified for the inclusion compound formed by the same guest and a modified β -CD, thus supporting the adopted theoretical procedure.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support. This study is also part of the project involving the Rede Mineira de Química (RQ-MG) supported by FAPEMIG.

References

- [1] J. Szejtli, *Chem. Rev.* 98 (5) (1998) 1743.
- [2] K.A. Connors, *Chem. Rev.* 97 (5) (1997) 1325.
- [3] M.V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* 98 (5) (1998) 1875.
- [4] E.M. Del Valle, *Process Biochem.* 39 (9) (2004) 1033.
- [5] E.M. Garrido, et al., *J. Environ. Sci. Health B* 47 (9) (2012) 869.
- [6] J. Garrido, et al., *J. Mol. Struct.* 1061 (2014) 76.
- [7] S. Benfeito, et al., *Sci. World J.* 2013 (2013), 6 pages.
- [8] D. Landy, et al., *Environ. Chem. Lett.* 10 (3) (2012) 225.
- [9] V.J. Smith, et al., *Carbohydr. Res.* 344 (17) (2009) 2388.
- [10] C. Shen, et al., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 72 (3-4) (2012) 263.
- [11] L.B. de Carvalho, L.d.M.A. Pinto, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 74 (1-4) (2012) 375.
- [12] E. Morillo, J.I. Pérez-Martínez, J.M. Ginés, *Chemosphere* 44 (5) (2001) 1065.
- [13] J.I. Pérez-Martínez, et al., *Pest Manag. Sci.* 56 (5) (2000) 425.
- [14] R.J. Flaherty, et al., *Chemosphere* 91 (7) (2013) 912.
- [15] D.A. Case, et al., *AMBER 10*, University of California, San Francisco, 2008.
- [16] F. Tsorteki, K. Bethanis, D. Mentzafos, *Carbohydr. Res.* 339 (2) (2004) 233.
- [17] M. Frisch, et al., *Gaussian 09*, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009, pp. 200.
- [18] J.P. Perdew, *Phys. Rev. B* 33 (12) (1986) 8822.
- [19] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* 77 (18) (1996) 3865.
- [20] P.C. Hariharan, J.A. Pople, *Theor. Chim. Acta* 28 (3) (1973) 213.
- [21] W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, *J. Chem. Phys.* 56 (5) (1972) 2257.
- [22] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* 105 (8) (2005) 2999.

- [23] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* 113 (18) (2009) 6378.
- [24] J.R. Pliego Jr., J.M. Riveros, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (9) (2002) 1622.
- [25] M.G. Teixeira, et al., *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 81.
- [26] K. Lindner, W. Saenger, *Carbohydr. Res.* 99 (2) (1982) 103.
- [27] C.P. Kelly, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* 110 (32) (2006) 16066.
- [28] J.M. Ginés, et al., *Chemosphere* 33 (2) (1996) 321.
- [29] L.A. De Souza, et al., *J. Inorg. Biochem.* 129 (2013) 71.

ARTIGO 2

(Publicado em *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*)

Theoretical inclusion of deprotonated 2,4-D and dicamba pesticides in β -cyclodextrin

Robson A. Pereira¹, Willian Miguel da Silva Borges¹, Cristian Rossi Peraro¹
and Cleber P. A. Anconi^{1*}

Received: 31 May 2016 / Accepted: 21 September 2016

@ Springer Science + Business Media Dordrecht 2016

Abstract In the present work the SMD solvation model and distinct functionals (PBE0, B97-D and M06-2X) were applied to investigate the best approach to study CD inclusion compounds. Within this work 2,4D and dicamba inclusion compounds were used as reference to test the theoretical methodology. Molecular Dynamics simulations were also performed. The Gibbs free energy in condensed phase accounted for the experimental findings for B97-D and M06-2X being the former outcomes in best agreement to experimental data. Molecular dynamics simulations did not produce any reliable information for the inclusion compounds under investigation in function of the huge fluctuations identified.

Keywords Cyclodextrin · Dicamba ·

2,4-Dichlorophenixyacetic acid · 2,4-D · DFT ·
Molecular dynamics

*Cleber P. A. Anconi
cleberanconi@dqi.ufla.br

1 LQF: Laboratório de Química Fundamental, Departamento de Química,
Universidade Federal de Lavras (UFLA),
Lavras, MG, 37200-000, P.O. Box 3037, Brazil.

Published on line: 05 October 2016

<http://dx.doi.org/10.1007/s10847-016-0665-5>

Introduction

Pesticides have been one of the main tools for agricultural production helping to improve crop yield, however their use causes adverse impacts and the effects of many pesticides for humans are not completely understood. Such compounds usually remain in the environment and ecosystems and contaminate the soil and groundwater, also contributing to a loss in biodiversity [1].

Some pesticides are highly hydrophobic, thus their removal from soil may be conducted through the formation of an inclusion compound. Cyclodextrins (CDs) have been used to form inclusion compounds with a wide range of guest molecules fundamentally in aqueous solutions [2–4]. This specific property makes the CD application suitable for environmental remediation [4]. The CD geometry is similar to a truncated cone exhibiting a hydrophobic cavity and a hydrophilic outer surface [1, 3, 5–10]. The most common CDs possess two distinct rims, one

narrower (named tail, T) containing all primary hydroxyl groups and other wider (named head, H) containing all secondary hydroxyl groups (Fig. 1a).

The molecular encapsulation into CDs has been extensively studied with wide variety of guests, such as pharmaceuticals, biological compounds and agricultural chemicals including herbicides, insecticides, fungicides, repellents, pheromones and growth regulators. Recently the use of CD for soil remediation was investigated by Flaherty et al. [11]. The binding constants of seven commonly used pesticides with native and derivatized CD were measured. All CDs showed significant binding interactions with each of the seven pesticides. Therefore, they assessed the ability of CDs to effectively extract these pesticides from contaminated soils. Moreover, the inclusion effect was investigated in soil adsorption–desorption for their use in remediation [11–13], and according to their structure and experimental conditions, only two of the seven pesticides were in charged form: the deprotonated 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D⁻) and dicamba (DIC⁻) (Fig. 1b).

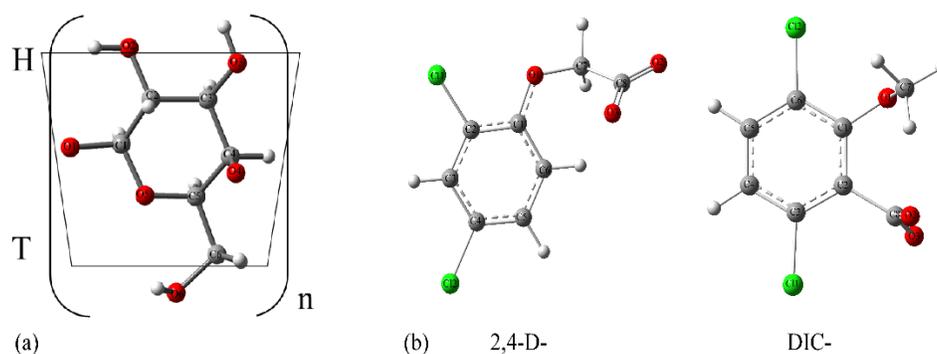


Fig. 1 (a) General structure of α , β and γ cyclodextrins for $n = 6, 7$ or 8 glucose units, respectively. (b) Structure of dissociated 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D⁻) and dicamba (DIC⁻)

The inclusion process are led by several host–guest interactions and studies of these forces allow a comprehensive analysis of the stabilization of the guest inside the CD cavity [2]. A recent theoretical study involving 2,4-D and β -CD complexes evaluated the spatial arrangement and stability energies in gas phase and aqueous solution based on the density functional theory (DFT) and the SMD implicit solvation approach [14]. Such methodology was applied to study the stability and the spatial arrangement for which PBE0 [15] functional was employed for comparison between theoretical and experimental finds. The experimental data were evaluated for compounds formed between 2,4-D and β -CD modified [16].

The combination of theoretical methods was also used in the study of inclusion compounds. Semi-empirical (PM3) and DFT methods (BLYP, B3LYP, PBE0, M06-2x) were applied to calculate thermodynamic properties of the inclusion process of the complex involving a tetracycline in β and γ -CD using IEFPCM polarized continuum model [17]. In another study, the inclusion of hydration water was applied to properly describe the reactants and products of sertraline and β -CD inclusion compounds, with different DFT functionals [18].

In the present work we investigated the use of different DFT functionals and the use of a continuum solvation model in an attempt to identify the best theoretical approach to model deprotonated 2,4-D and dicamba inclusion compounds for which experimental data were reported [11]. Theoretical details The starting geometries of inclusion complexes, both with 1:1 ratio, were constructed assuming two guest orientations as represented in Fig. 2. The orientation of the charged portion of each guest molecule determines their identification in the present work. Thus, 2,4-D⁻(h)@ β -CD and DIC⁻(h)@ β -CD correspond to inclusion compounds with negative guest portion pointing toward the head of CD rim.

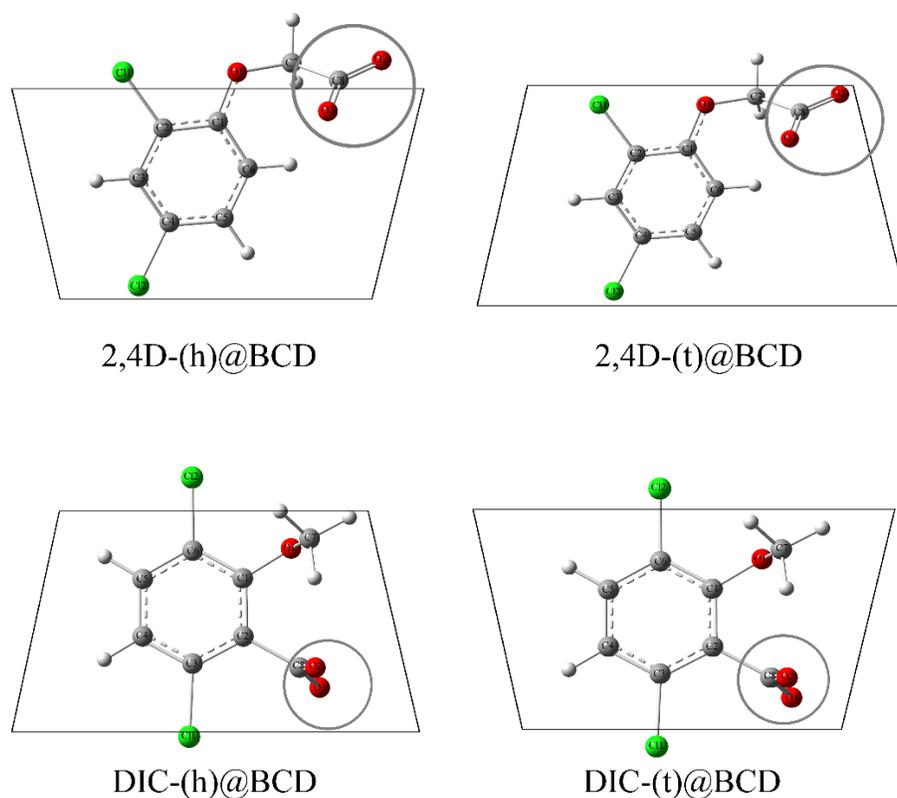


Fig. 2 Starting guest orientation in inclusion complexes (charged portion in circles)

The other complexes were named 2,4-D⁻(t)@β-CD and DIC⁻(t)@β-CD. The inclusion compound formed by 1-adamantanecarboxylate (AD-COO⁻) and β-CD was also studied to be a reference data due the known higher binding energy of the complex.

The inclusion process was modelled in gas phase (1) and under the influence of continuum solvation approach (2).



Quantum calculations were carried out employing the PBE1PBE [15, 19, 20], M06-2X [21] and B97-D [22] functionals with the valence double-zeta polarized 6-31G(d,p) [23] basis set for geometry optimization and harmonic frequency calculations, previously success applied by our research group. The PBE1PBE functional uses weighting 25 % for exchange and 75 % for correlation, commonly called in the literature as PBE0 [24]. The electronic plus nuclear repulsion energy contribution ($\Delta E_{\text{elec-nuc}}$) was evaluated by unconstrained fully optimized geometries. In each calculation, frequencies were used to evaluate the thermal correction to the Gibbs free energy (ΔG^0_{T}) with the aid of statistical thermodynamics formulas [17] at $T = 298.15$ K and $p = 1$ atm, as implemented in the GAUSSIAN 09 quantum mechanical package, revision A.02 [25].

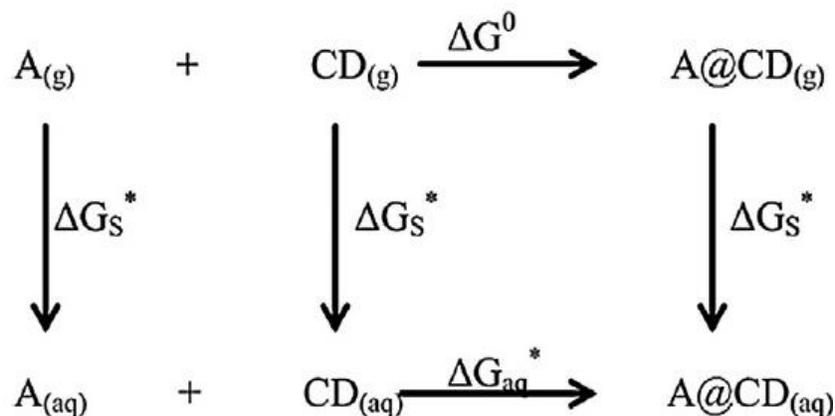
The gas phase Gibbs free energy of the inclusion was calculated according to (3), on the basis of the Scheme 1 [26], for which A corresponds to guest molecule. The reaction Gibbs free energy in condensed phase ($\Delta G^*_{\text{(aq)}}$) was evaluated, as indicated by (4).

$$\Delta G^0 = \Delta E_{\text{elec-nuc}} + \Delta G^0_{\text{T}} \quad (3)$$

$$\Delta G^*_{\text{(aq)}} = \Delta G^0 + \delta\Delta G_{\text{S}}^* \quad (4)$$

Considering the formation of inclusion compounds in aqueous media, the ability to identify theoretically the most favorable compound among a set of possible combinations is desirable. Thus an appropriated continuum model must be chosen. The SMD solvation model had already been satisfactorily applied to identify the most favorable guest orientation for deprotonated 2,4-D@ β -CD inclusion compound [14]. In the present work the same strategy was adopted. Therefore, SMD [27] continuum model was employed with the three functionals and default GAUSSIAN 09 (A.02) parameters in order to evaluate ΔG_{S}^* , the

solvation free energy in water ($e = 78.39$) of each specie was illustrated in Scheme 1.



Scheme 1 Thermodynamic cycle used to calculate the inclusion free energy in solution

Molecular dynamics (MD) simulations were conducted in vacuum and condensed phase using AMBER 10 package [28] and a protocol previously studied for CD [29]. The MD runs started with initial temperature of 5 K and warmed up to 50 K during 10 ps and were then equilibrated for 100 ps followed by five similar consecutive steps for which the structures were also warmed up to 50 K along 10 ps and equilibrated during 100 ps. All MD simulations were conducted at 300 K with length of 500 ps and time step of 1.5 fs with GAFF (Generalized AMBER force field). The atomic charges were obtained from the BCC approach. The TIP3P water model was chosen for condensed phase simulations assuming an octahedral box with periodical conditions. The relative stabilities in aqueous media were evaluated through the MM-GBSA approach as implemented in AMBER 10 package.

For the sake of comparison it is important to highlight that experimental findings discussed within this work were reported in terms of binding constant

with M^{-1} as unit [11]. In a process similar to those described by Eq. (1), $K_p(T) = K_C(T) \times (c^0 RT/p^0)^{-1}$ and then $K_p(T) = K_C \times 0.04034$ (for inclusion process). In gas phase calculations, ΔG^0 was obtained according to (3) and $K_p(T)$ was evaluated assuming that ΔG^0 corresponds to $-RT \ln K_p(T)$. At 298.15 K, assuming K_C as the binding constant, experimental ΔG^0 could be promptly evaluated according to (5).

$$\Delta G^0/\text{kcal.mol}^{-1} = -0.5925 \times \ln(0.04034 \times K_C) \quad (5)$$

Experimentally, the binding constants reported for 2,4-D and dicamba inclusion compounds with β -CD correspond to 185 ± 47 and $324 \pm 25 M^{-1}$, respectively [11]. According to (5), in terms of Gibbs free energy, the average values corresponds to $-1.19 \text{ kcal mol}^{-1}$ for the 2,4-D@ β -CD and $-1.52 \text{ kcal mol}^{-1}$ for DIC@ β -CD. The difference in the evaluated experimental ΔG^0 for 2,4-D@ β -CD and DIC@ β -CD, $0.33 \text{ kcal mol}^{-1}$, is small but not negligible. For a set of conformers in equilibrium such differences implies in a population corresponding to 63.6 % for the most stable molecule. At this point a fundamental question arises. Should the chosen theoretical methodology able to accounts for such small difference?

To improve the discussion we decide to analyze the thermodynamic quantities reported by Rekharsky and Inoue for several CD host guest systems [30]. Among β -CD 1:1 inclusion compounds, one of the highest binding constant has been reported for 1-adamantanecarboxylate. According to (5) such binding energy corresponds to a Gibbs free energy equal to $-4.36 \text{ kcal mol}^{-1}$. To provide the theoretical analysis two guest orientations of 1-adamantanecarboxylate were studied (AD-COO⁻(h))@ β -CD and AD-COO⁻(t))@ β -CD).

Results and discussion

The data concerning quantum mechanical calculation in vacuum, gas phase and under the influence of the continuum solvation approach, for the PBE0, B97-D and M062-X are presented in Tables 1, 2 and 3. The interaction energies in vacuum (ΔE) are very negative suggesting a strong interaction between host and guest molecules for all functionals. In the basis of the analysis of the optimized compounds, the negative portion of the guest molecules interacts with hydroxyl groups. The maintenance of the general starting geometries (Fig. 2) was observed along the optimization procedure as depicted in Fig. 3. The study in gas phase implies in the evaluation of thermal corrections to Gibbs free energy (ΔG^0_T) for the reaction. According to the Tables 1, 2 and 3, such contributions are positive.

Table 1 Interaction energies (ΔE) and Gibbs free energies in kcal.mol⁻¹ evaluated at PBE1PBE/6-31G(d,p) level of theory for the reaction Guest+ β CD \leftrightarrow Guest@ β -CD

	Vacuum	Gas phase		SMD Continuum model		
	ΔE	ΔG_T^0	ΔG^0	ΔG_S^*	$\delta\Delta G_S^*$	ΔG_{aq}^*
2,4D ⁻ (h)@ β -CD	-40.48	16.88	-23.60	-111.43	22.03	-1.57
2,4D ⁻ (t)@ β -CD	-44.23	21.83	-22.40	-97.09	36.38	+13.98
DIC ⁻ (h)@ β -CD	-49.13	16,20	-32.93	-101,14	33.61	+0.68
DIC ⁻ (t)@ β -CD	-47.49	17.02	-29.05	-104.76	29.99	+0.95
AD-COO ⁻ (h)@ β -CD	-60.01	17.63	-42.39	-99.10	42.75	+0.37
AD-COO ⁻ (t)@ β -CD	-62.22	20.85	-41.37	-100.09	41.76	+0.39

Solvation free energy (ΔG_S^*) for DIC⁻, 2,4D⁻, AD-COO⁻ and β -CD corresponds to -57.66, -58.95, -66.05 and -75.80 kcal.mol⁻¹, respectively. $\delta\Delta G_S^* = \Delta G_S^*(\text{complex}) - [\Delta G_S^*(\text{host}) + \Delta G_S^*(\text{guest})]$

Because of the very negative values of the interaction energies (ΔE), all tabulated ΔG^0 are negative (see Tables 1, 2 and 3), suggesting at least theoretically, the formation of all studied inclusion compounds, in gas phase.

Table 2 Interaction energies (ΔE) and Gibbs free energies in kcal.mol⁻¹ evaluated at B97D/6-31G(d,p) level of theory for the reaction Guest+ β CD \leftrightarrow Guest@ β -CD

	Vacuum	Gas phase		SMD Continuum model		
	ΔE	ΔG_T^0	ΔG^0	ΔG_S^*	$\delta\Delta G_S^*$	ΔG_{aq}^*
2,4D ⁻ (h)@ β -CD	-57.63	22.28	-35.35	-109.12	20.33	-15.02
2,4D ⁻ (t)@ β -CD	-73.02	24.69	-48.33	-96.50	32.95	-15.38
DIC ⁻ (h)@ β -CD	-58.86	26.72	-32.15	-104.98	24.43	-7.72
DIC ⁻ (t)@ β -CD	-67.54	24.71	-42.82	-102.19	27.21	-15.61
AD-COO ⁻ (h)@ β -CD	-84.47	23.98	-60.49	-99.14	37.71	-22.77
AD-COO ⁻ (t)@ β -CD	-84.11	23.77	-60.34	-98.19	38.67	-21.67

Solvation free energy (ΔG_S^*) for DIC⁻, 2,4D⁻, AD-COO⁻ and β CD corresponds to -56.60, -56.65, -64.05 and -72.80 kcal.mol⁻¹, respectively. $\delta\Delta G_S^* = \Delta G_S^*(\text{complex}) - [\Delta G_S^*(\text{host}) + \Delta G_S^*(\text{guest})]$

In addition, AD-COO⁻@ β -CD is more favorable than DIC⁻@ β -CD and 2,4-D⁻@ β -CD for any guest orientation in vacuum and in gas phase. This for all functional employed within this work (see Tables 1, 2 and 3). The solvation free energy (ΔG_S^*) and $\delta\Delta G_S^*$ evaluated for each inclusion compound and the corresponding isolated Scheme 1 Thermodynamic cycle used to calculate the inclusion free energy in solution molecules were used to obtain the Gibbs free energy of inclusion in solution ΔG_{aq}^* , data tabulated in the last column of the Tables 1, 2 and 3. According to (5), such thermodynamic quantity is obtained by the sum of ΔG^0 and $\delta\Delta G_S^*$.

For PBE0 (data in Table 1) only the formation of 2,4D⁻(h)@β-CD was estimated in condensed phase. For such complex, the Gibbs free energy of formation in condensed phase corresponds to -1.57 kcal mol⁻¹. According to the data in Table 1, it can be stated that the theoretical outcomes evaluated for the PBE1PBE functional failed to predict the experimental binding energy trend for 2,4-D, dicamba and also 1-adamantanecarboxylate with β-CD in condensed phase.

Table 3 Interaction energies (ΔE) and Gibbs free energies in kcal.mol⁻¹ evaluated at M06-2x/6-31G(d,p) level of theory for the reaction Guest+βCD↔Guest@β-CD

	Vacuum	Gas phase		SMD Continuum model		
	ΔE	ΔG_T^0	ΔG^0	ΔG_s^*	$\delta\Delta G_s^*$	ΔG_{aq}^*
2,4D ⁻ (h)@β-CD	-49.97	23.21	-26.76	-113.92	23.62	-3.14
2,4D ⁻ (t)@β-CD	-69.42	24.07	-45.35	-100.72	36.82	-8.52
DIC ⁻ (h)@β-CD	-51.90	24.35	-27.55	-111.48	26.27	-1.29
DIC ⁻ (t)@β-CD	-64.42	24.74	-39.68	-106.76	30.99	-8.69
AD-COO ⁻ (h)@β-CD	-72.24	23.28	-48.96	-104.15	39.91	-9.05
AD-COO ⁻ (t)@β-CD	-78.40	26.91	-51.49	-100.86	43.21	-8.28

Solvation free energy (ΔG_s^*) for DIC⁻, 2,4D⁻, AD-COO⁻ and β-CD corresponds to -60.15, -59.95, -66.47 and -77.59 kcal.mol⁻¹, respectively. $\delta\Delta G_s^* = \Delta G_s^*(\text{complex}) - [\Delta G_s^*(\text{host}) + \Delta G_s^*(\text{guest})]$

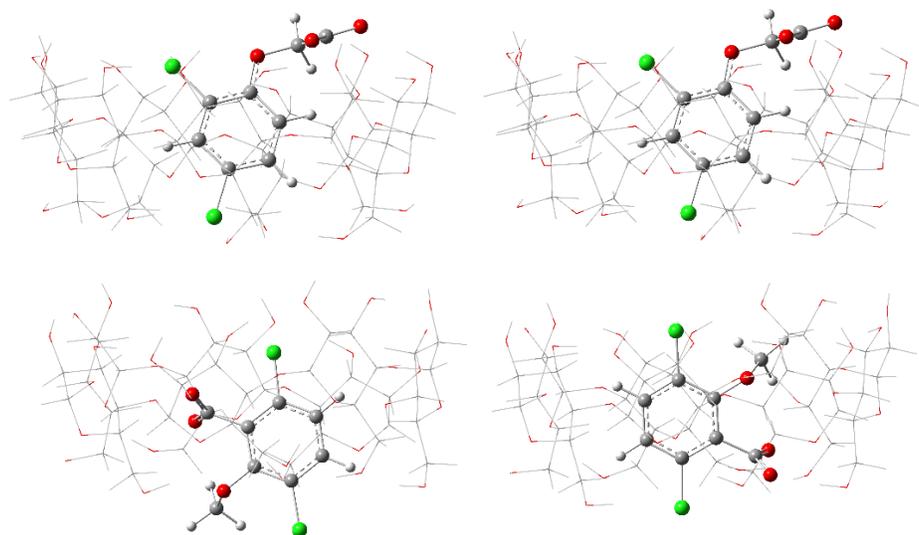


Fig. 3 B97D/6-31G(d,p) optimized inclusion compounds named according to the starting orientation previously depicted. From left to right: 2,4D⁻(h)@ β -CD, 2,4D⁻(t)@ β -CD, DIC⁻(h)@ β -CD and DIC⁻(t)@ β -CD

In the other hand when SMD continuum solvation approach is taken into account the B97-D functional reproduces satisfactorily the experimental finds. According to Table 2 ΔG_{aq}^* corresponds to -22.77, -15.61 and -15.38 kcal.mol⁻¹ for AD-COO⁻(h)@ β -CD, DIC⁻(t)@ β -CD and 2,4-D⁻(t)@ β -CD inclusion compounds, respectively. A similar trend can be identified for the M06-2X functional (Table 3) for which ΔG_{aq}^* corresponds to -9.05, -8.69 and -8.52 kcal.mol⁻¹ for AD-COO⁻(h)@ β -CD, DIC⁻(t)@ β -CD and 2,4D⁻(t)@ β -CD inclusion compounds, respectively. In what concerns B97-D and M06-2X performances, the data in Tables 2 and 3 can be employed to choose the appropriated functional. The experimental finding attests a large difference in ΔG_{aq}^* between AD-COO⁻@ β -CD and the other two inclusion compounds. According to the analysis of the Tables 2 and 3 such difference are better described by B97-D data. Thus we recommend the use of B97-D functional and the SMD continuum approach to

study CD inclusion compounds. Furthermore, explicit hydration water molecules did not provide any change in the actual theoretical scenario for β -CD (data not shown).

Alternatively we decided to perform some Molecular Dynamics (MD) simulation with explicit water molecules. The four host–guest orientations depicted in Fig. 2 have been submitted to simulation at 300 K. The MD data are presented in Table 4. Along the simulations the guest molecules stayed included inside CD cavity.

Table 4 Molecular dynamics data for the inclusion formation at 300 K, in kcal mol⁻¹

	Guest	Host	Inclusion compound	Average Binding Energy
	2,4D ⁻	β -CD	2,4D ⁻ (h)@ β -CD	
Vacuum	42 \pm 2	461 \pm 34	439 \pm 32	-64
MM-GBSA	-31 \pm 3	381 \pm 8	341 \pm 9	-9
	2,4D ⁻	β -CD	2,4D ⁻ (t)@ β -CD	
Vacuum	42 \pm 2	464 \pm 35	442 \pm 36	-64
MM-GBSA	-30 \pm 3	383 \pm 9	339 \pm 9	-14
	DIC ⁻	β -CD	DIC ⁻ (h)@ β -CD	
Vacuum	35 \pm 2	462 \pm 34	438 \pm 35	-59
MM-GBSA	-40 \pm 3	380 \pm 8	334 \pm 9	-6
	DIC ⁻	β -CD	DIC ⁻ (t)@ β -CD	
Vacuum	36 \pm 2	465 \pm 34	450 \pm 38	-51
MM-GBSA	-40 \pm 1	378 \pm 8	334 \pm 10	-4

The average binding energy is not coherent with the experimental findings (Table 4). The solvation along such MD simulations was conducted in two steps. At first simulations were carried out with explicit water molecules and then a

continuum solvation model was applied to all solute molecules geometries collected along the production simulation. Table 4 comprises MM-GBSA outcomes as implemented in AMBER 10 package.

Due to the small relative values evaluated for the average binding energies in vacuum and condensed phase (MM-GBSA approach), the fluctuations in the individual energies for the CD host molecules preclude the identification of any particular trend. Therefore, it is not possible to address some preferable guest orientation for 2,4-D⁻ and DIC⁻ neither identifying the most stable inclusion compounds among. Both the fluctuations and average binding energies were smaller for MM-GBSA outcomes. The CD flexibility and theoretical investigation had already been discussed by Helena Dodziuk [31–35]. In fact the desirable situation for MD simulations implies in huge interactions energies or binding constants and a considerable host molecular rigidity as can be promptly identified for cucurbituril inclusion compounds [36]. Therefore the use of MD simulations to CD inclusion compounds can be debatable.

Conclusions

According to the theoretical data obtained the Gibbs free energy in condensed phase accounted for the experimental findings for B97-D and M06-2X being the former outcomes in best agreement to experimental data. Therefore, we recommend the used of the B97-D/6-31G(d,p) level of theory in conjunction to SMD continuum solvation model to investigate the relative stability of CD inclusion compounds. According to our work, Molecular Dynamics simulations did not produce any reliable information for the inclusion compounds under investigation in function of the huge fluctuations identified. It is noticeable that such fluctuations are expected for systems comprising CD molecules.

Acknowledgments The authors would like to thank the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for financial support. The authors also thank Professor Helio Ferreira dos Santos for the access to the NEQC (Núcleo de Estudos em Química Computacional, UFJF, Brazil) computer facility.

References

1. Landy, D., Mallard, I., Ponchel, A., Monflier, E., Fourmentin, S.: Remediation technologies using cyclodextrins: an overview. *Environ. Chem. Lett.* **10**(3), 225–237 (2012)
2. Connors, K.A.: The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.* **97**(5), 1325–1357 (1997)
3. Szejtli, J.: Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **98**(5), 1743–1753 (1998)
4. Del Valle, E.M.: Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* **39**(9), 1033–1046 (2004)
5. Mahedero, M.C., De La Peña, A.M., Bautista, A., Aaron, J.J.: An investigation of inclusion complexes of cyclodextrins with phenylurea herbicides by photochemically-induced fluorescence. *Analytical applications. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **42**(1–2), 61–70 (2002)
6. Smith, V.J., Rougier, N.M., de Rossi, R.H., Caira, M.R., Buján, E.I., Fernández, M.A., Bourne, S.A.: Investigation of the inclusion of the herbicide metobromuron in native cyclodextrins by powder X-ray diffraction and isothermal titration calorimetry. *Carbohydr. Res.* **344**(17), 2388–2393 (2009)

7. Shen, C., Yang, X., Wang, Y., Zhou, J., Chen, C.: Complexation of capsaicin with β -cyclodextrins to improve pesticide formulations: effect on aqueous solubility, dissolution rate, stability and soil adsorption. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **72**(3–4), 263–274 (2012)
8. Benfeito, S., Rodrigues, T., Garrido, J., Borges, F., Garrido, E.M.: Host-guest interaction between herbicide oxadiargyl and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Sci. World J.* 1–6 (2013)
9. Fernandes, S.A., do Couto Tavares, E., Teixeira, R.R., da Silva, C.M., Montanari, R.M., de Fátima, A., Anconi, C.P.A., de Almeida, W.B., dos Santos, H.F., da Silva, A.A.: Inclusion complexes of Schiff bases as phyto-growth inhibitors. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **75**(1–2), 197–204 (2013)
10. Garrido, J., Cagide, F., Melle-Franco, M., Borges, F., Garrido, E.M.: Microencapsulation of herbicide MCPA with native β -cyclodextrin and its methyl and hydroxypropyl derivatives: an experimental and theoretical investigation. *J. Mol. Struct.* **1061**, 76–81 (2014)
11. Flaherty, R.J., Nshime, B., DeLaMarre, M., DeJong, S., Scott, P., Lantz, A.W.: Cyclodextrins as complexation and extraction agents for pesticides from contaminated soil. *Chemosphere* **91**(7), 912–920 (2013)
12. Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M., Morillo, E., González-Rodríguez, M.L., Moyano Méndez, J.R.: Improvement of the desorption of the pesticide 2,4-D via complexation with HP- β -cyclodextrin. *Pest Manag. Sci.* **56**(5), 425–430 (2000)
13. Morillo, E., Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M.: Leaching of 2,4-D from a soil in the presence of β -cyclodextrin: laboratory columns experiments. *Chemosphere* **44**(5), 1065–1069 (2001)
14. Pereira, R.A., Anconi, C.P., Nascimento, C.S., De Almeida, W.B., Dos Santos, H.F.: Stability and spatial arrangement of the 2,4-

- dichlorophenoxyacetic acid and β -cyclodextrin inclusion compound: a theoretical study. *Chem. Phys. Lett.* **633**, 158–162 (2015)
15. Adamo, C., Barone, V.: Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model. *J. Chem. Phys.* **110**(13), 6158–6170 (1999)
 16. Tsorteki, F., Bethanis, K., Mentzafos, D.: Structure of the inclusion complexes of heptakis (2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin with indole-3-butyric acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Carbohydr. Res.* **339**(2), 233–240 (2004)
 17. Costa, M.A., Anconi, C.P., Dos Santos, H.F., De Almeida, W.B., Nascimento, C.S.: Inclusion process of tetracycline in β and γ cyclodextrins: a theoretical investigation. *Chem. Phys. Lett.* **626**, 80–84 (2015)
 18. Lopes, J.F., Nascimento, C.S., Anconi, C.P., Dos Santos, H.F., De Almeida, W.B.: Inclusion complex thermodynamics: the β -cyclodextrin and sertraline complex example. *J. Mol. Gr. Model.* **62**, 11–17 (2015)
 19. Perdew, J.P.: Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B* **33**(12), 8822 (1986)
 20. Perdew, J.P., Burke, K., Ernzerhof, M.: Generalized gradient approximation made simple. *Phys. Rev. Lett.* **77**(18), 3865 (1996)
 21. Zhao, Y., Truhlar, D.G.: The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **120**(1–3), 215–241 (2008)
 22. Grimme, S.: Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *J. Comput. Chem.* **27**(15), 1787–1799 (2006)

23. Hariharan, P.C., Pople, J.A.: The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta* **28**(3), 213–222 (1973)
24. Teixeira, M.G., De Assis, J.V., Soares, C.G.P., Venâncio, M.F., Lopes, J.F., Nascimento Jr, C.S., Anconi, C.P.A., Carvalho, G.S.L., Lourenco, C.S., De Almeida, M.V.: Theoretical and experimental study of inclusion complexes formed by Isoniazid and modified β -cyclodextrins: ^1H NMR structural determination and antibacterial activity evaluation. *J. Phys. Chem. B.* (2013)
25. Frisch, M., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A.: Gaussian 09, Revision A. 02, p. 200. Gaussian, Inc., Wallingford (2009)
26. Kelly, C.P., Cramer, C.J., Truhlar, D.G.: Aqueous solvation free energies of ions and ion-water clusters based on an accurate value for the absolute aqueous solvation free energy of the proton. *J. Phys. Chem. B* **110**(32), 16066–16081 (2006)
27. Marenich, A.V., Cramer, C.J., Truhlar, D.G.: Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B* **113**(18), 6378–6396 (2009)
28. Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.A., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Crowley, M., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolosváry, I., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Wu, X., Bronzell, S.R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Mathews, D.H., Seetin, M.G., Sagui, C., Babin, V., Kollman, P.A.: AMBER 10. University of California, San Francisco (2008)
29. Anconi, C.P., Nascimento Jr., C.S., De Almeida, W.B., Dos Santos, H.F.: Structure and stability of (a-CD) $_3$ aggregate and OEG@(a-CD) $_3$

- pseudorotaxane in aqueous solution: a molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B* **113**(29), 9762–9769 (2009)
30. Rekharsky, M.V., Inoue, Y.: Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **98**(5), 1875–1918 (1998)
 31. Dodziuk, H., Kozminski, W., Lukin, O., Sybilska, D.: NMR manifestations and molecular dynamics modeling of chiral recognition of alpha-pinenes by alpha-cyclodextrin. *J. Mol. Struct.* **523**, 205–212 (2000)
 32. Dodziuk, H., Lukin, O.: Dependence of the average energy between the 1: 2 complexes of enantiomeric alpha-pinenes with alpha-cyclodextrin on the length of dynamic simulation. *Chem. Phys. Lett.* **327**(1–2), 18–22 (2000)
 33. Dodziuk, H., Lukin, O.: Modelling of molecular and chiral recognition by cyclodextrins. Is it reliable? Part 2. Molecular dynamics calculations in vacuum pertaining to the selective complexation of decalins by beta-cyclodextrin. *Pol. J. Chem.* **74**(7), 997–1001 (2000)
 34. Dodziuk, H., Lukin, O., Nowinski, K.S.: Molecular mechanics calculations of molecular and chiral recognition by cyclodextrins. Is it reliable? The selective complexation of decalins by betacyclodextrin. *J. Mol. Struct. Theochem* **503**(3), 221–230 (2000)
 35. Dodziuk, H.: Rigidity versus flexibility. A review of experimental and theoretical studies pertaining to the cyclodextrin nonrigidity. *J. Mol. Struct.* **614**(1–3), 33–45 (2002)
 36. Fenley, A.T., Henriksen, N.M., Muddana, H.S., Gilson, M.K.: Bridging calorimetry and simulation through precise calculations of cucurbiturila guest binding enthalpies. *J. Chem. Theory Comput.* **10**(9), 4069–4078 (2014)