

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

COMPORTAMENTO DA SÉRIE HOMÓLOGA DOS p-HIDROXI-  
BENZOATOS DE ALQUILA EM SOLUÇÃO E SUA INTERAÇÃO  
COM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS.

WATSON LOH, 1965-

Tese de Doutorado

Orientador : Pedro L. O. Volpe †

9223477/20

1992

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
BIBLIOTECA CENTRAL

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR WATSON LOH E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA NO DIA 28 DE  
AGOSTO DE 1992.



COMPOSIÇÃO DA COMISSÃO JULGADORA :

PROF. DR. PEDRO L. O. VOLPE (PRESIDENTE) - IQ - UNICAMP

PROFA. DRA. MARIA ELISABETE D. ZANIQUELLI - DEPTO DE QUÍMICA  
- FFCL - USP - RIBEIRÃO PRETO

PROF. DR. FRANK H. QUINA - IQ - USP - SÃO PAULO

PROFA. DRA. NILCE C. MEIRELLES - DEPTO. BIOQUÍMICA - IB -  
UNICAMP

PROF. DR. FRED Y. FUJIWARA - IQ - UNICAMP

Aos meus pais  
William (*in memoriam*) e Hilária

Aos meus irmãos  
Stanley, Patrick e Marjorie

À Regina

com amor...

*A degree is a first step down a ruinous highway. You don't want to waste it, so you go on to graduate work and doctoral research. You end up a thoroughgoing ignoramus on everything in the world, except for one subdivisional sliver of nothing.*

Issac Asimov, "The Dead Past", 1956

*"... tortured data confess to anything ..."*

F.M. Menger e M.J. Sherrod *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* 1988, 1509

## AGRADECIMENTOS

Ao Pedro Volpe, pela liberdade e confiança no trabalho, que permitiram que esta tese trilhasse vários caminhos, e pelo interesse em prover as condições necessárias para isto.

À profa. Yeda P. Dick, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo incentivo e empurrão iniciais.

Ao CNPq e à FAPESP (Proc. 89/3845-0), pelas bolsas concedidas

Ao Claudio Tonegutti, pelo interesse, sugestões e inúmeras discussões sobre o trabalho.

Ao Paolo Livotto, pelos cálculos de AM1, HAM/3 e volumes de van der Waals e pelas explicações e discussões.

À professora Nilce C. Meirelles, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela cessão do laboratório e materiais usados nos ensaios hemolíticos, e à Lígia pela incansável ajuda e pelas discussões sobre estes experimentos.

Aos colegas do laboratório de Biotermodinâmica, Carmelita, Carmen, Elói, Lígia, Márcio e Tonegutti, e aos vizinhos do laboratório de Organometálicos, pela ajuda no dia-a-dia.

Aos revisores desta tese, Tonegutti, Lígia e Lolly, pelas sugestões e ajuda na tentativa de minimizar os meus erros...

Aos amigos do Instituto de Química, colegas, professores e funcionários, sem os quais teria sido bem mais difícil.

## CURRICULUM VITAE

Nome : Watson Loh

Nascimento : 6 de março de 1965, em Porto Alegre, RS

### ESTUDOS DE NÍVEL SUPERIOR

Graduação : Químico Industrial, Instituto de Química da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1982 - 1986

Pós-Graduação : Doutor em Ciências, Instituto de Química da  
Universidade Estadual de Campinas, 1987 - 1992

### EXPERIÊNCIA ACADEMICA

Monitoria II, Instituto de Química - Universidade Estadual de  
Campinas, 6 meses, 1989

Curso : Físico-Química Experimental

### BOLSAS RECEBIDAS

Bolsa de Mestrado , CNPq, 1987 - 1989

Bolsa de Monitoria II, Univ. Estadual de Campinas, 1989

Bolsa de Doutorado, FAPESP, 1990 - 1992

### SOCIEDADES CIENTIFICAS

Membro da Sociedade Brasileira de Química, desde 1986

### ATIVIDADES DE REPRESENTAÇÃO

Representante discente dos alunos de pós-graduação no

Departamento de Físico-Química, Inst. de Química, UNICAMP,  
1991-1992

COMUNICAÇÕES APRESENTADAS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

13 comunicações apresentadas em Congressos Nacionais

4 comunicações apresentadas em Congressos Internacionais

PUBLICAÇÕES

"Study of the Micellar Effects on the Alkyl p-Hydroxybenzoates Acid-Base Dissociation. II. On the Surface Potential Role", Watson Loh e Pedro L.O. Volpe, *Atual. Fis. Quim. Org.* 1989

"Partitioning of Substituted Phenols in CTAB Micelles. A Group Contribution Approach", Claudio A. Tonegutti, Watson Loh e Pedro L.O. Volpe, *Atual. Fis. Quim. Org.* 1991, no prelo

"Interaction of Alkyl p-Hydroxybenzoates with Micelles. Evaluation of Their Partition Coefficients and Ionization Constants", Watson Loh e Pedro L.O. Volpe, *J. Colloid Interface Sci.* 1992, no prelo

"Diffusion Coefficients of Aqueous Phenols Measured by the Taylor Dispersion Technique. Evidence for Solute Adsorption on the Walls of the Teflon Tubing", Watson Loh, Claudio A. Tonegutti e Pedro L.O. Volpe, submetido ao *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*

## INDICE GERAL

1. Introdução .....	1
1.1 Relações Quantitativas Estrutura/Atividade .....	2
1.2 Sistemas Biomiméticos .....	3
1.3. Micelas .....	7
1.4. Objetivos .....	11
1.5. Os p-Hidroxibenzoatos de Alquila .....	12
2. Experimental .....	17
2.1. Reagentes Químicos .....	17
2.2. Equipamentos .....	19
3. Procedimentos, Resultados e Discussão .....	22
3.1. Estudo do Comportamento do Parabens em .....	
Solução através da Determinação dos seus Coeficientes de .....	
Difusão .....	22
3.1.1 O Método de Taylor .....	23
3.1.2. Determinação dos Coeficientes de .....	
Difusão .....	25
3.1.2.1. Estudo da Adsorção dos Parabens .....	
sobre Teflon .....	31
3.1.2.2. Correção dos Coeficientes de Difusão ...	
para Adsorção .....	38
3.1.3. Estimativas do Volume Molecular dos .....	
Parabens .....	40
3.1.3.1. Cálculo dos Raios de van der Waals ..	40
3.1.3.2. Estimativa dos Raios Hidrodinâmicos .	42
3.2. Interação dos Parabens com Micelas .....	54
3.2.1. Incorporação de Solutos em Micelas ....	54
3.2.2 Determinação dos Coeficientes de .....	
Partição .....	57
3.2.3. Análise das Variações de Energia Livre....	
de Transferência através das Contribuições de Grupo .....	64
3.2.4. Efeito dos Parabens sobre a c.m.c. do.....	
CTAB .....	77

3.3. Ionização dos Parabens em Presença de Micelas .	80
3.3.1. Determinação do Efeito de Micelas .....	
sobre o pKa Aparente dos Parabens .....	85
3.3.2. Efeito de Aditivos sobre a Ionização .....	
dos Parabens com Micelas de CTAB .....	98
3.4. Interação dos Parabens com Polieletrólitos, .....	
Eritrócitos e Lipossomas .....	112
3.4.1. Efeito de Polieletrólitos sobre o .....	
Equilíbrio de Ionização dos Parabens .....	112
3.4.2. Interação dos Parabens com Eritrócitos ...	
.....	116
3.4.2.1. Ensaio Hemolítico .....	119
3.4.2.2. Determinação do Coeficiente de .....	
Partição dos Parabens entre Água e Membrana de Eritrócitos ..	121
3.4.3 Efeito dos Parabens sobre a Transição .....	
de Fase de Lipossomas .....	122
4. Conclusão .....	128
5. Bibliografia .....	131
Apêndice .....	145

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Modelo mosaico-fluido da membrana biológica .....	5
1.2. Representação do comportamento de surfatantes em ..... solução aquosa .....	6
1.3. Modelo de Gruen para micela de SDS .....	9
1.4. Seção transversal de uma micela em água .....	10
1.5. Estrutura química dos parabens .....	12
2.1. Equipamento usado para os estudos de difusão .....	20
3.1.1. Dispersão do soluto no método de Taylor .....	23
3.1.2. Coeficientes de difusão aparentes e corrigidos ..... dos parabens .....	26
3.1.3. Perfil de concentração teórico em função do tempo .... nos experimentos de Taylor .....	29
3.1.4. Curvas de dispersão experimentais .....	30
3.1.5. Espectro de infravermelho do tubo de Teflon .....	32
3.1.6. Cinética de sorção de pentilperaben no tubo .....	34
3.1.7. Isotermas de adsorção dos parabens no tubo .....	36
3.1.8. Equação de Stokes-Einstein para difusão em água ..... e em solventes orgânicos apróticos .....	47
3.1.9. Equação de Stokes-Einsteins para difusão em álcoois... .....	48
3.1.10. Intervalos de 95% de confiança para representação ... dos dados de difusão .....	49
3.1.11. Intervalos de 85% de confiança .....	50
3.2.1. Espectro de absorção das formas neutra e aniônica..... de propilparaben em água e com micelas de CTAB .....	58
3.2.2 Absorbância dos parabens com adição de CTAB .....	59
3.2.3. Linearização dos resultados da figura 3.2.1 .....	60
3.2.4. Relação entre $\Delta t_{GB}$ e $\Delta t_{GH}$ .....	74
3.2.5. c.m.c. de CTAB com adição dos parabens .....	78
3.2.6. $\ln k$ (fig. 3.2.5) em função do número de átomos ..... de carbono na cadeia alifática dos parabens .....	79

3.3.1.	Ionização dos parabens com CTAB, em água .....	90
3.3.2.	pKa aparente dos parabens com tampão, a 25°C .....	92
3.3.3.	pKa aparente dos parabens com tampão, a 35°C .....	93
3.3.4.	Efeito de KBr sobre o pKa aparente .....	99
3.3.5.	Efeito de KF sobre o pKa aparente .....	100
3.3.6.	Efeito de p-toluenossulfonato sobre o pKa aparente....	
.....	.....	101
3.3.7.	Efeito da adição de C <sub>12</sub> EO <sub>9</sub> sobre o pKa aparente ..	102
3.3.8.	Efeito de propanol sobre o pKa aparente .....	103
3.3.9.	pKa aparente de metilparaben com aditivos .....	104
3.3.10.	pKa aparente de propilparaben com aditivos .....	105
3.3.11.	Efeito de álcoois sobre o pKa aparente de .....	
propilparaben (concentração total) .....		109
3.3.12.	Efeito de álcoois sobre o pKa aparente de .....	
propilparaben (fração de álcool na micela) .....		110
3.4.1.	Ionização dos parabens com PEI .....	115
3.4.2.	Ensaio hemolítico com os parabens .....	120
3.4.3.	Termograma de DSC de lipossomas de DODAC em água .	125
3.4.4.	Termograma de DSC de lipossomas de DODAC em .....	
solução de pentilparaben .....		126
3.4.5.	Termograma de DSC de solução de DODAC e excesso .....	
de pentilparaben .....		126

## INDICE DE TABELAS

1.1. Surfatantes mais utilizados e propriedades das suas micelas .....	8
3.1.1. Coeficientes de difusão aparentes e tempos de retenção dos parabens .....	27
3.1.2. Coeficientes de difusão corrigidos, fatores de capacidade e raios hidrodinâmicos dos parabens .....	39
3.1.3. Estimativas dos raios de van der Waals dos parabens .....	41
3.1.4. Parametros de assimetria para duas conformações dos parabens .....	44
3.2.1. Coeficientes de partição das formas neutra e aniônica dos parabens em micelas de CTAB .....	61
3.2.2. Contribuições de grupo para $\Delta G$ de compostos aromáticos para micelas .....	66
3.2.3. Parâmetros teóricos para séries de aromáticos .....	70
3.3.1. pKa e pKa aparentes dos parabens com micelas .....	87
3.3.2. Comparação de pKa aparente em meio tamponado e medido usando eletrodo de vidro .....	88
3.3.3. Coeficientes de partição calculados e constantes de troca iônica .....	95
3.3.4. Interação de ânions com micelas de CTAB .....	106
A.1. Coeficientes de difusão em água e volumes de van der Waals dos solutos .....	145
A.2. Coeficientes de difusão em solventes orgânicos apróticos e volumes de van der Waals dos solutos .....	148
A.3. Coeficientes de difusão em álcoois e volumes de van der Waals dos solutos .....	150

## RESUMO

### Comportamento da Série Homóloga dos p-Hidroxibenzoatos de Alquila em Solução e sua Interação com Sistemas Biomiméticos

Foram determinados os coeficientes de partição das formas neutra e aniônica de metil a pentilparaben em micelas de CTAB, a 15, 25 e 35°C. Os valores de  $\Delta G$  para esta interação foram decompostos em contribuições hidrofóbica, da estrutura base e eletrostática. Foram medidos os pKa aparentes dos parabens com micelas de CTAB, SDS e Genapol. Verificou-se que micelas catiônicas, CTAB, aumentam a ionização, enquanto micelas aniônicas, SDS, e não iônicas, Genapol, têm um efeito oposto. Os valores de pKa experimentais concordam bem com os calculados através do modelo de troca iônica de pseudofase e usando os coeficientes de partição determinados. O estudo do efeito de aditivos sobre o  $\Delta pK_a$  causado pelas micelas de CTAB levou à seguinte ordem de efetividade para ânions: p-toluenossulfonato >  $SO_4^{2-}$  >  $Br^- \cong NO_3^-$  >  $Cl^-$  >  $F^-$ . O Genapol causou uma inibição do efeito do CTAB sobre a ionização maior do que os ânions. A influência de álcoois, etanol a butanol, pode ser atribuído a seu efeito sobre a estrutura do solvente. A adição de um polieletrólito, polietilenoimina, também aumenta a ionização dos parabens, mas este efeito não tem caráter hidrofóbico.

Os coeficientes de difusão foram medidos pelo método de Taylor, em água, solução 5 mM de NaOH e misturas água/etanol. Foi observado um aumento anômalo destes valores ao longo da série homóloga, que diminuía com a adição de NaOH e etanol. Este desvio foi atribuído à adsorção dos parabens sobre o tubo de Teflon, o que foi confirmado por experimentos de adsorção. Os resultados foram corrigidos usando a equação de Golay para cromatografia capilar.

A interação com uma membrana biológica foi estudada através do efeito dos parabens sobre a hemólise hipotônica de eritrócitos de rato. Observou-se um efeito protetor, que aumenta com a hidrofobicidade dos parabens, do mesmo modo que os coeficientes de partição em membranas de eritrócitos.

## ABSTRACT

### Solution Behavior of the Homologous Series of Alkyl p-Hydroxybenzoates and their Interaction with Biomimetic Systems

The partition coefficients of the neutral and anionic species of methyl to pentylparaben into CTAB micelles were determined at 15, 25 and 35° C. The  $\Delta G$  values for the transfer to micelles were analysed according to hydrophobic, parent structure and electrostatic contributions. The apparent pKa values with CTAB, SDS and Genapol micelles were also determined. These results confirm that cationic, CTAB, micelles increase the paraben ionization, while anionic, SDS, and nonionic, Genapol, micelles have an opposite effect. The experimental pKa values agree well with those calculated using the partition coefficients and the pseudophase ion-exchange model. The determination of the additives effect on the micelle-promoted parabens ionization increase lead to the following order of anion effectivity: p-toluenesulfonate >  $\text{SO}_4^-$  >  $\text{Br}^- \cong \text{NO}_3^-$  >  $\text{Cl}^-$  >  $\text{F}^-$ . Genapol inhibition of the CTAB effects are larger than the one observed for anions. The alcohols influence, from ethanol to butanol, can be mainly attributed to their effects on the solvent structure. The addition of a polyelectrolyte, polyethyleneimine, also increases the parabens ionization, but its effect does not have a hydrophobic nature.

The parabens diffusion coefficients were measured using the Taylor technique in water, NaOH 5 mM aqueous solution and water - ethanol mixtures. The anomalous increase observed for these values along the series was ascribed to the paraben adsorption on the Teflon tubing walls, and decreases with the ethanol and NaOH addition. This hydrophobic adsorption was confirmed by batch experiments. The diffusion coefficients were corrected using the Golay's expression for capillary chromatography.

The parabens interaction with a biological membrane was studied by determining their influence on the hypotonic hemolysis of rat erythrocytes. It was observed that these compounds decrease the hemolysis, this effect increasing with the paraben hydrophobicity as well as the parabens partition coefficients into the membranes.

## 1. INTRODUÇÃO

Processos complexos como os que ocorrem nos organismos vivos são geralmente estudados sob diferentes enfoques e níveis de profundidade, levando, conseqüentemente, a diferentes tipos de respostas. Por exemplo, a ação de um determinado medicamento em seres humanos pode ser estudada por um pesquisador da área médica em termos da resposta causada por uma dose aplicada na melhora ou piora do quadro clínico do paciente. É também possível estudar-se este medicamento incubando-o com um determinado tipo de célula ou tecido vivo de modo a que sejam acompanhadas as modificações causadas em alguma propriedade de interesse naquele sistema vivo. Em outro nível, pode-se estudar a interação desta droga com alguma estrutura sintética que possua certas propriedades básicas em comum com o sistema biológico em estudo, de modo a que se possa, separadamente, observar um determinado tipo de interação. Existem, ainda, estudos teóricos a partir das estruturas químicas da droga e do receptor biológico, ou análogos mais simples de ambos, com o objetivo de simular esta interação com detalhes em nível molecular.

Como podemos observar pelo exemplo acima, à medida em que o sistema mais complexo é simplificado, o estudo pode ser conduzido de maneira mais controlada e com maior profundidade em algum ponto específico do processo de interação. Neste caso, entretanto, aumenta a distância em relação ao sistema vivo que motivou o estudo. Por estes motivos, atualmente, um determinado processo biológico é estudado, sob aspectos diferentes, mas complementares, por profissionais de áreas tão distintas como medicina, farmacologia, química orgânica, físico-química e química teórica, por exemplo.

## 1.1. Relações Quantitativas Estrutura/Atividade - QSAR

A partir dos resultados obtidos nos estudos com sistemas mais simples, a transposição das propriedades dos compostos em estudo para seu comportamento em sistemas mais complexos é feita com o auxílio das chamadas relações quantitativas entre estrutura e atividade, mais conhecidas pela sigla em inglês QSAR - "Quantitative Structure-Activity Relationships".

O estudo destas relações teve início com o modelo proposto por Hansch e colaboradores <sup>1</sup> que, a partir de análises probabilísticas para transporte de drogas através de membranas biológicas, chegaram à seguinte relação :

$$\log (1/C) = -k (\log P)^2 + k' (\log P) + \rho \sigma + k'' \quad [1.1]$$

onde C é a concentração de droga capaz de causar uma determinada resposta biológica, por exemplo, LD<sub>50</sub> (dose letal para 50 % dos indivíduos) ou MIC (concentração inibitória mínima). Por este motivo, quanto menor C, mais ativa a droga. A grandeza log (1/C) é comumente chamada de resposta biológica. Ainda na equação 1.1, P representa o coeficiente de partição no sistema água/octanol,  $\sigma$  é a constante de Hammet para efeitos eletrônicos de substituintes e  $k$ ,  $k'$ ,  $k''$  e  $\rho$  são os coeficientes de regressão para o ajuste da equação.

Partindo do mesmo tipo de análise, Kubinyi <sup>2</sup> propôs o modelo bilinear, de expressão geral :

$$\log (1/C) = a \log P - b \log (\beta P + 1) + c \quad [1.2]$$

onde  $a$ ,  $b$ ,  $\beta$  e  $c$  são coeficientes derivados do ajuste não linear da equação. Outro tipo de análise é a do modelo matemático de Free-Wilson <sup>3</sup>, que considera as contribuições individuais dos grupos substituintes de uma estrutura-base.

Outras propriedades das drogas têm sido usadas neste tipo de modelos, além de  $\log P$ ,  $\sigma$  de Hammett ou contribuições de grupo, citados acima. Um destes modelos é o desenvolvido por Taft e colaboradores <sup>4</sup>. Sua forma geral é

$$\log SP = c + r \cdot R_2 + s \pi_2^H + a \sum \alpha_2^H + b \sum \beta_2^H + l \log L^{16} \quad [1.3]$$

onde  $R_2$  representa a refração molar de excesso,  $\pi_2^H$  é uma nova escala de polarizabilidade/dipolaridade do soluto,  $\alpha_2^H$  e  $\beta_2^H$  são, respectivamente, parâmetros relacionados com a acidez e basicidade do soluto na formação de pontes de hidrogênio e  $L^{16}$  é o coeficiente de partição do soluto da fase gasosa para a fase do hexadecano e  $c$ ,  $r$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$  e  $l$  são as constantes resultantes do ajuste da equação. A propriedade medida é SP, e este modelo já foi aplicado a estudos de solubilidade em água ou solventes apolares <sup>5</sup>, retenção cromatográfica <sup>6</sup>, de solubilidade em sangue e tecidos biológicos <sup>7</sup> etc.

## 1.2. Sistemas Biomiméticos

Devido à possibilidade de utilizar relações do tipo QSAR para extrapolar comportamentos para sistemas mais complexos, o estudo de sistemas-modelo vem sendo bastante difundido. Estes sistemas, bem mais simples, reproduzíveis e de propriedades mais controladas e melhor determinadas, são genericamente denominados sistemas biomiméticos. Entre alguns exemplos de estudos envolvendo estes sistemas, citamos os estudos :

- de transferência de carga em sistemas biológicos utilizando complexos metálicos ligados por cadeias de peptídeos <sup>8</sup>;

de interação de complexos metálicos com oxigênio molecular e sua relação com o transporte de oxigênio pela hemoglobina no processo de respiração <sup>9</sup>;

-sobre sistemas auto-replicantes e sua relação com os

processos de origem da vida <sup>10</sup>;

- com a utilização de sistemas-modelo para processos envolvendo as membranas biológicas <sup>11</sup>.

As membranas biológicas têm o papel de compartimentalizar os constituintes das células permitindo a passagem seletiva de metabólitos e nutrientes para dentro ou para fora. As membranas são compostas majoritariamente por lipídios e proteínas e, em menor parte, por glicídios. Os lipídios são compostos de duas cadeias longas de hidrocarbonetos, podendo apresentar insaturações. Eles diferem quanto ao grupo hidrofílico e os mais comuns são : fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, entre outros. Os dois primeiros grupos têm características anfipróticas apresentando um grupo fosfato e um grupo amina, e o último, além destes dois grupos, possui um grupo carboxilato. A presença de insaturações na cadeia carbônica impede a formação de regiões com arranjos cristalinos na estrutura da membrana. Desta maneira, ela permanece fluida e deformável, não sendo observada nenhuma transição de fase nas condições fisiológicas <sup>12</sup>.

Enquanto os lipídios têm um papel predominantemente estrutural, as proteínas são responsáveis pelas funções especializadas da membrana. De acordo com a sua localização, podem ser divididas em intrínsecas (ou integrais) e extrínsecas (ou periféricas). A distribuição dos lipídios e proteínas entre as camadas interna e externa da membrana é assimétrica. Além disto, a interação de uma parte dos lipídios com as proteínas intrínsecas faz com que estes apresentem propriedades diferenciadas como menor mobilidade, suscetibilidade a ataque por enzimas etc <sup>13</sup>.

Estas características das membranas biológicas foram resumidas no modelo de mosaico fluido, proposto por Singer e Nicholson <sup>14</sup>. Segundo este modelo, que é representado na figura 1.1, as membranas podem ser consideradas soluções bidimensionais de proteínas em um solvente composto pelos lipídios, organizados segundo um arranjo em dupla camada.

Entre os sistemas membranomiméticos mais utilizados, os mais simples são os sistemas bifásicos água/solvente apolar. Entre os solventes orgânicos, são utilizados hexano <sup>15</sup>, hexadecano <sup>5</sup>, octanol <sup>16, 17</sup> entre outros. Destes, o mais utilizado é o octanol. Este solvente, apesar de sua natureza menos apolar, tem capacidade de solubilizar uma certa quantidade de água - a fração molar de água de saturação a 25°C está entre 0,275 e 0,253 (aproximadamente 2 mol.dm<sup>-3</sup>) <sup>18</sup>. Estas moléculas de água reproduzem, de certo modo, as moléculas de água que hidratam os grupos polares e iônicos dos constituintes da membrana.

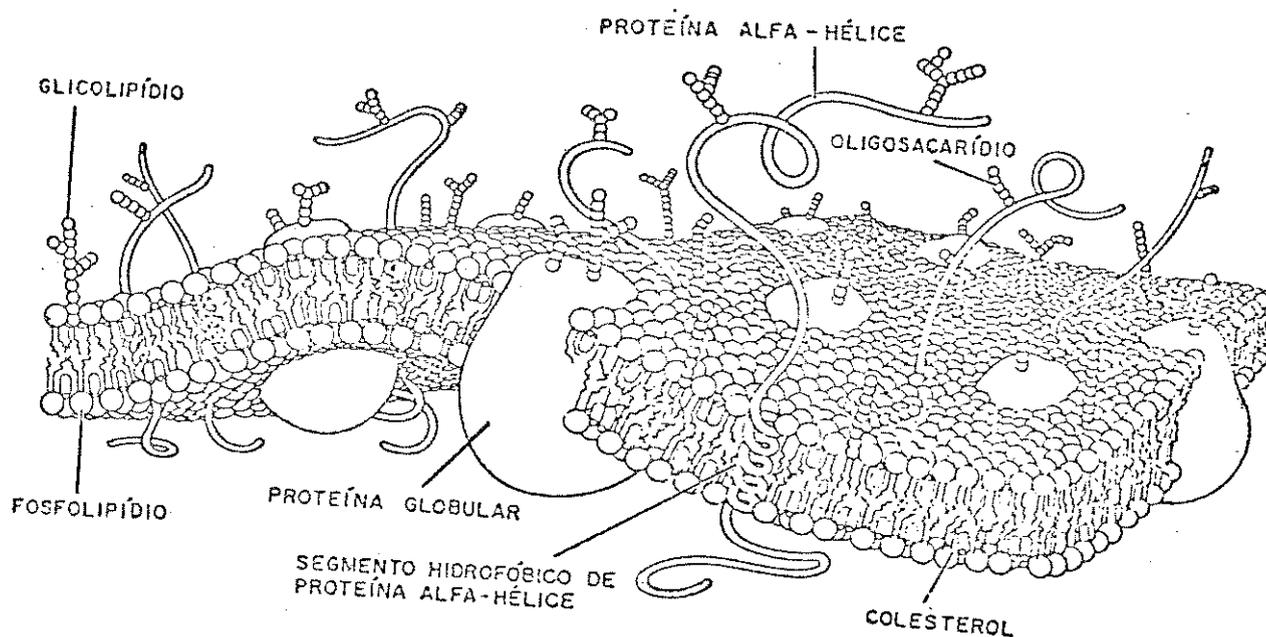


Figura 1.1. Modelo mosaico-fluido, proposto por Singer e Nicholson para representar a membrana biológica. Adaptado da ref. 14

Entretanto, estes sistemas bifásicos são isotrópicos, e não possuem uma estrutura organizada como a das membranas, representada na figura 1.1. Assim, o sistema água/octanol pode ser considerado um modelo adequado para reproduzir interações não específicas, como por exemplo a hidrofóbica, mas um modelo pobre

quando ocorrem interações específicas <sup>19</sup>. Devido a estas características, o sistema água/octanol vem sendo utilizado como padrão para determinações de hidrofobicidade de compostos com atividade biológica, existindo atualmente um banco de dados que armazena valores de coeficientes de partição de vários compostos neste sistema, sediado no Pomona College, California, EUA.

Devido a estas limitações dos solventes orgânicos, sistemas um pouco mais complexos vêm sendo utilizados. Um dos mais simples, é o formado por monocamadas de surfatantes formadas em interfaces solução/ar ou solução/sólido <sup>20</sup>. O primeiro caso é representado esquematicamente na figura 1.2a. A concentrações maiores de surfatante, estas moléculas começam a se organizar em agregados estáveis, de tamanho definido, chamados micelas. Estes agregados são representados genericamente na figura 1.2b e, em maiores detalhes, descritos na seção 1.3.

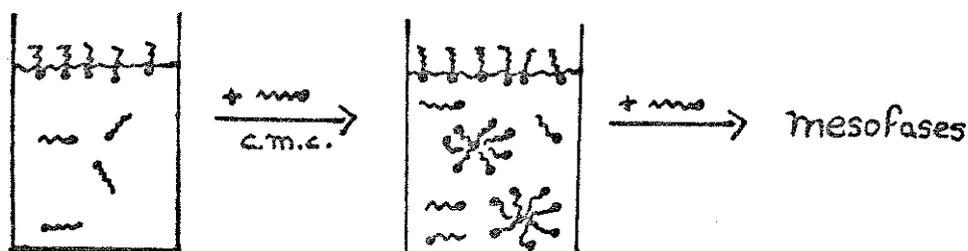


Figura 1.2. Representação esquemática do comportamento de surfatantes em solução aquosa, com o aumento da concentração

Outros sistemas, com características ainda mais próximas das membranas biológicas, são os formados pela organização de surfatantes, geralmente com dupla cadeia hidrofóbica, em bicamadas <sup>21</sup>. Estes sistemas apresentam a vantagem de apresentar uma mais estrutura semelhante à da membrana biológica separando duas

regiões de solução, permitindo realizar estudos de transferência através da bicamada. Entre estes sistemas, citamos as BLM, "Black Lipid Membranes", e os lipossomas uni e multilamelares. O livro de J. H. Fendler, "Membrane Mimetic Chemistry"<sup>11</sup>, descreve ainda outros sistemas utilizados com este propósito.

Mais recentemente, Abe e colaboradores<sup>22,23</sup> observaram uma correlação entre a atividade bloqueadora de impulsos nervosos causada por anestésicos locais com a adsorção destes compostos sobre carvão ativo. Eles propõem que este sistema seja utilizado principalmente para o caso de compostos iônicos, caso em que a utilização do sistema água/octanol pode não levar a bons resultados .

Neste sentido, um estudo realizado em nosso grupo<sup>24</sup>, mostrou que existe uma boa correlação entre a atividade bactericida dos m-alcoxifenóis com a sua adsorbabilidade sobre carvão ativo, assim como com a incorporação destes compostos em micelas. Esta correlação foi atribuída ao papel fundamental desempenhado pelo efeito hidrofóbico nestes processos, mais do que devido a semelhanças entre os sistemas-modelo e o sistema biológico.

### 1.3. Micelas

De acordo com o tipo de surfatante que as compõe, as micelas podem ser divididas em catiônicas, aniônicas, não iônicas ou "zwitteriônicas". Em solvente apolar os surfatantes se organizam de modo a minimizar os contatos entre os grupos apolares e o solvente, formando as micelas normais. Em soluções com solventes apolares, a organização se dá de modo oposto, formando as chamadas micelas inversas ou reversas. Alguns exemplos de surfatantes e algumas propriedades das micelas normais por eles formadas são fornecidos na Tabela 1.1.

A concentração a partir da qual as micelas começam a se

formar é uma característica de cada sistema surfatante/solvente, dos aditivos presentes e da temperatura e pressão. Esta concentração é denominada concentração micelar crítica, c.m.c., e está diretamente relacionada com a estabilidade da micela, através de <sup>25</sup>

$$\Delta G_{f_{mic}} = 2 R T \ln c.m.c. \quad [1.4]$$

Tabela 1.1. Surfatantes mais utilizados e propriedades das micelas formadas, em água e a 25°C, com dados retirados da ref 26, exceto quando outras condições são especificadas.

tipo	surfatante	c.m.c. CM	N <sup>a</sup>	$\alpha^b$
catiônico	brometo de hexa- ciltrimetilamônio - CTAB	$9,2 \times 10^{-4}$	61	0,20 <sup>c</sup>
	cloreto de hexa- decilpiridínio CPCI	$9,0 \times 10^{-4}$	95	0,31
aniônico	dodecilsulfato de sódio - SDS	$8,1 \times 10^{-3}$	62	0,21
	dodecanoato de sódio	$2,4 \times 10^{-2}$	56	0,36
não iônicos	Triton X-100 <sup>d</sup>	$3,0 \times 10^{-4}$	143 <sup>f</sup>	0
	Brij 35 <sup>e</sup>	$5,5 \times 10^{-5}$	40	0
"zwitter- iônicos"	dodecil- N,N - dimetilamônio-3- propano-1-sulfo- nato	$3,0 \times 10^{-3}$	55	0

a) número de agregação médio, b) grau de dissociação, c) ref. 27, d) octilfenil-(9,5)polioxietileno, e) dodecil-(23)polioxietileno, f) ref. 28.

As micelas são agregados dinâmicos, caracterizados por dois

tempos de relaxação distintos: um, associado à entrada e saída de monômeros da micela, que ocorre na escala de microssegundos; e outro, atribuído ao processo de formação e ruptura das micelas, na escala de milissegundos <sup>29</sup>.

A estrutura das micelas ainda é motivo de discussão <sup>30</sup>. Vários modelos foram propostos para explicar as propriedades observadas <sup>31-33</sup> ou como consequências de estudos teóricos <sup>34,35</sup>. O modelo mais utilizado está representado na figura 1.4. De maneira geral, as micelas podem ser divididas em três regiões distintas. Esta é uma divisão um tanto arbitrária, uma vez que existe uma certa rugosidade nas superfícies de contato entre estas regiões. Assim, esta divisão só será utilizada com o objetivo de introduzir algumas das propriedades destes sistemas. O interior da micela é uma região mais fluida, na qual os átomos ou fragmentos da cadeia hidrofóbica do surfatante apresentam mais mobilidade <sup>36</sup>, com pouca ou nenhuma presença de água <sup>37</sup> e polaridade próxima à de hidrocarbonetos líquidos.

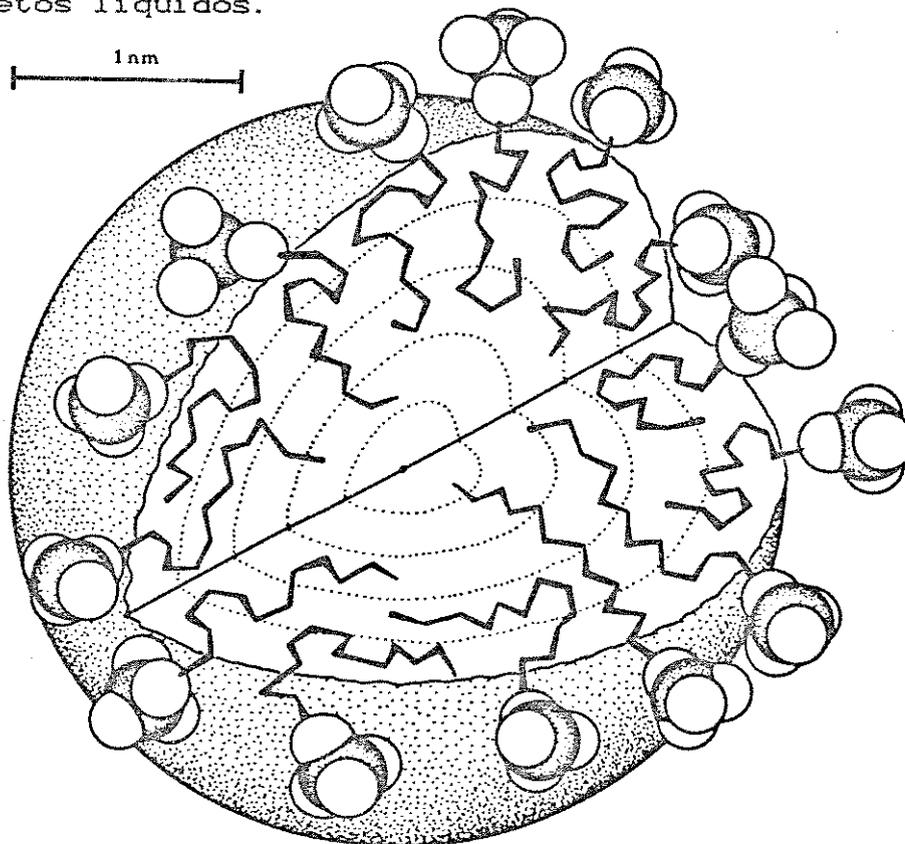


Figura 1.3. Modelo proposto por Gruen para uma micela de SDS em água. Adaptado da ref. 34

A região interfacial, composta pelos átomos de carbono mais próximos do grupo polar, compreende a maior fração volumétrica da micela. Esta é uma região mais ordenada <sup>36</sup>, com maior presença de água <sup>37</sup> e de maior polaridade, apresentando uma constante dielétrica efetiva ao redor de 30 <sup>38</sup>. Este valor de constante dielétrica é bem próximo do reportado para moléculas de água fortemente orientadas sobre uma superfície carregada <sup>39</sup>. É nesta região que encontra-se solubilizada a maioria dos solutos.

A superfície micelar é composta pelos grupos polares solvatados e seus contra-íons, no caso de micelas iônicas. Neste último caso, a dissociação destes grupos, caracterizada por um grau de dissociação,  $\alpha$ , entre 0,1 e 0,4 <sup>40</sup>, faz com que esta região esteja sujeita a um potencial eletrostático,  $\psi$ , com valores usualmente entre 100 e 150 mV <sup>41</sup>. Os contra-íons livres distribuem-se, radialmente, a partir da superfície micelar conforme descrito pela teoria de Gouy-Chapman <sup>40</sup>. Estes detalhes podem ser melhor visualizados na figura 1.4.

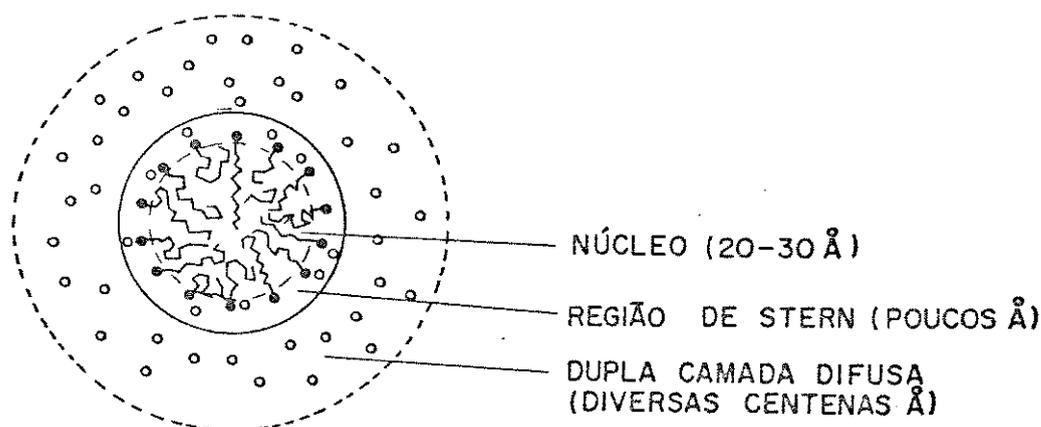


Figura 1.4. Representação da seção transversal de uma micela em água

Devido a suas propriedades peculiares, além de sua utilização como modelo de membranas biológicas, as micelas vêm apresentando

outras aplicações em diversos ramos da Química e áreas correlatas. Entre estas, citamos:

- aplicação em química analítica com o objetivo de aumentar sensibilidade, redução de interferência em detecção por espectrofotometria de absorção ou emissão <sup>42-44</sup>;
- uso em cromatografia líquida para aumentar a resolução na separação de compostos bastante semelhantes <sup>45</sup>;
- utilização como agente solubilizante para compostos pouco solúveis, especialmente fármacos <sup>46</sup>;
- utilização em estudos fotofísicos para estabilizar espécies instáveis ou diminuir a formação de agregados, devido a suas propriedades de compartimentalização <sup>47, 48</sup>;
- aplicação em síntese orgânica, de modo a criar centros assimétricos utilizando micelas formadas por surfatante quirais <sup>49</sup>.

#### 1.4. Objetivos

O objetivo central desta tese é o de investigar algumas das etapas envolvidas no processo de interação de compostos com atividade biológica com sistemas biomiméticos. A família de compostos escolhidos para este estudo foi a série homóloga dos p-hidroxibenzoatos de alquila, comumente chamados parabens. Estes compostos, mostrados na figura 1.5, são largamente utilizados como agentes preservativos. Além disto, possuem em sua estrutura química características que possibilitam obter informações sobre processos específicos de interação :

- através do grupo hidroxila fenólico, que lhes confere características de ácido fraco, estudar o efeito dos sistemas biomiméticos sobre o equilíbrio ácido-base dos parabens;
- a interação, através do anel aromático, com grupos específicos do receptor, por exemplo cátions amônio;
- a possibilidade, devido à disponibilidade de uma série homóloga, de avaliar separadamente a contribuição hidrofóbica para

os processos de interação.

Os processos biológicos que envolvem este tipo de compostos incluem a solubilização da droga, sua transferência através da membrana biológica e sua interação com o receptor. Por este motivo, estudaremos o comportamento destes compostos em solução e sua interação com sistemas organizados, desde sistemas biomiméticos mais simples, como micelas e polieletrólitos, até sistemas biológicos como eritrócitos. Estes processos serão analisados de acordo com as contribuições de cada uma das interações específicas descritas acima.

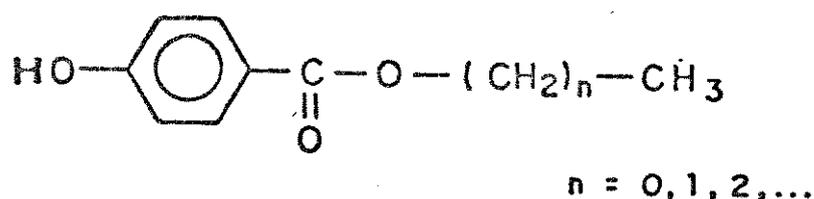


Figura 1.5. Estrutura química dos parabens

### 1.5. Os p-Hidroxibenzoatos de Alquila

Os parabens estão entre os aditivos mais utilizados como agentes preservativos, fungicidas e/ou bactericidas, em formulações de cosméticos e alimentos <sup>50</sup>. Nos Estados Unidos, eles são os únicos compostos fenólicos liberados para utilização em alimentos, podendo ser adicionados até um limite de 0,1% <sup>51,52</sup>. Eles são utilizados nos mais variados tipos de alimentos, como margarinas, queijos, bebidas, pães <sup>53</sup>, e cosméticos, como cremes, xampus etc.

Além de sua baixa toxicidade, o seu espectro de ação é bastante amplo. Quanto à sua aplicação, já foi descrita atividade destes compostos contra microorganismos de fácil incidência, como

por exemplo os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, e bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Clostridium botulinum*.<sup>51, 52, 54, 55</sup>

Entre alguns dos produtos normalmente comercializados e que contêm os parabens como agentes preservativos, citamos : xampus, condicionadores de cabelo, cremes hidratantes, produtos de maquiagem, cremes desodorantes, creme dental, géis fixadores para cabelo, protetores solares etc.

Baseados em estudos microbiológicos com sais de potássio dos parabens, Mizuba e Sheikh<sup>56</sup> propuseram que a forma ionizada apresenta um espectro de atividade mais amplo contra *A. niger* e 5 tipos de bactérias do que a forma neutra. Por outro lado, Joy e Cutler<sup>57</sup> realizaram um estudo de permeação dos ácidos benzóico e salicílico através da membrana de eritrócitos humano em função do pH mostrando que somente a forma não ionizada penetra na membrana.

Entretanto, estes estudos podem não estar em contradição, uma vez que o mecanismo proposto para ação de bactericidas fenólicos<sup>58</sup> assume que a interação principal ocorre na membrana citoplasmática. Eklund<sup>59</sup> observou que os parabens diminuíam a diferença de pH ao através da membrana de *E. coli*. Isto concorda com os resultados obtidos por Furr e Russel<sup>60</sup> que indicam que os parabens aumentavam a permeabilidade das membranas observada a partir da liberação de material intracelular. Eklund<sup>61</sup> também verificou que, paralelamente à inibição do crescimento de *E. coli* pelos parabens, estes compostos diminuíam o consumo de aminoácidos e glicose. Além disto, Nes e Eklund<sup>62</sup> relataram que estes compostos inibiam a síntese de DNA e RNA por bactérias. A ação dos parabens sobre o mecanismo de transporte celular através das membranas também foi proposta a partir de um estudo dos seus orbitais moleculares de fronteira<sup>63</sup>.

Foi observado<sup>51, 54, 55</sup> que a atividade biocida destes compostos aumenta com o tamanho da cadeia de hidrocarboneto destes ésteres, tendo sido detectado, em alguns casos, um máximo de

atividade para homólogos intermediários. A atividade destes compostos contra *C. botulinum*, por exemplo<sup>54</sup>, é máxima para os compostos com cadeia entre 11 e 12 átomos de carbono. Também foram observadas tendências semelhantes para outras propriedades dos parabens. O ponto de fusão e a solubilidade em hexano apresentam, respectivamente, um máximo e um mínimo para os homólogos heptil e hexilparaben<sup>64</sup>. Entretanto, este mesmo comportamento não foi observado para a solubilidade em água e ângulo de contato destes compostos com água<sup>64</sup>. O fato de não ser observada correlação entre as solubilidades dos parabens e seus pontos de fusão indica que o fator determinante para este comportamento das curvas de solubilidade destes compostos é o seu estado em solução.

Beezer e colaboradores<sup>65</sup>, baseados em medidas de solubilidade dos parabens em água, etanol, octanol e hexano, observaram que  $\Delta\text{solG}$  apresenta um maior incremento por grupo metileno até o hexilparaben, com uma variação menor para os homólogos maiores. Este comportamento foi atribuído à possibilidade de mudanças conformacionais nos homólogos maiores, de modo a se acomodarem melhor na estrutura do solvente, causando uma menor perturbação para cada grupo metileno acrescentado. As entalpias de solução destes compostos também apresentam um comportamento irregular com o aumento da cadeia alquílica.

A grande aplicabilidade dos parabens também motivou uma série de estudos de permeação através de membranas naturais e sintéticas. Twist e Zatz<sup>66,67</sup> relataram estudos de permeação dos parabens através de membranas de polidimetilsiloxano. Seus resultados mostraram<sup>66</sup> que o logaritmo do coeficiente de partição dos parabens entre a fase aquosa e a membrana sintética aumenta com o número de átomos de carbono na cadeia de hidrocarbonetos, enquanto a difusividade através da membrana diminui. Outro estudo dos mesmos autores<sup>67</sup>, mostrou que a permeação através da membrana sintética é maior em soluções de álcoois, com valor máximo para o butanol, do que em soluções aquosas ou em presença de glicóis. Este comportamento foi atribuído à maior interação do solvente com a membrana.

Komatsu e colaboradores <sup>68-71</sup> estudaram a absorção de butilparaben em de pele de cobaias ("guinea pig") na presença de micelas e lipossomas. A adição de micelas não iônicas e polietilenoglicol reduziu a quantidade de butilparaben absorvida <sup>68,69</sup>. Os estudos com lipossomas indicaram que somente o soluto livre penetrava na pele <sup>71</sup> e que o padrão de distribuição do paraben no corpo do animal permanece inalterado <sup>70</sup>. Eles observaram ainda <sup>70</sup> que a encapsulação do butilparaben em lipossoma reduzia sua atividade biocida contra 8 tipos de fungos e bactérias na mesma medida em que diminuía a quantidade de soluto livre.

Existem também outros estudos sobre a interação dos parabens com micelas. Shimamoto e colaboradores <sup>72,73</sup> estudaram a interação de metil e propilparaben com micelas não iônicas com diferentes números de grupos oxietileno. A partir de medidas de deslocamentos químicos por RMN e coeficiente de partição por ultrafiltração, eles propuseram a existência de dois sítios de solubilização na micela não iônica. O primeiro, de alta afinidade e baixa capacidade, na interface entre a cadeia carbônica e o grupo polioxietileno; e o segundo, de menor afinidade e maior capacidade, na região ocupada pelos grupos oxietileno.

A interação dos parabens com os grupos oxietileno de surfatantes não iônicos também foi proposta, por Goto et al. <sup>74,75</sup>, a partir de medidas de coeficiente de partição e dos deslocamentos para o vermelho dos espectros eletrônicos de absorção. Além disto, estes autores também observaram que os parabens provocam o abaixamento do ponto de turbidez de soluções destes surfatantes, sendo o efeito mais pronunciado para os homólogos mais hidrofóbicos <sup>75</sup>. Este efeito sobre a separação de fase pode ser atribuído a modificações causadas pelo paraben nas interações entre as cadeias de polioxietileno ou sobre a sua hidratação.

Este mesmo grupo estudou sistematicamente a interação de parabens com micelas de SDS <sup>76-79</sup>. Seus principais resultados foram:

- determinação dos coeficientes de partição do metil ao butilparaben entre água e micelas de SDS<sup>77</sup>;

- observação de correlação entre estes valores e o abaixamento da c.m.c. do SDS provocado pela interação com o respectivo paraben<sup>77</sup>;

- diminuição do volume micelar para o SDS, observado a partir da variação de seus tempos de retenção na cromatografia de filtração em gel, em oposição ao aumento de volume micelar observado para micelas não iônicas<sup>78</sup>;

- deslocamento do  $\lambda_{max}$  de absorção dos parabens com a incorporação na micela de SDS, atribuído à formação de pontes de hidrogênio com o grupo sulfato do surfatante<sup>78</sup> e

- diminuição da interação dos solutos com as micelas de SDS com a adição de NaCl na concentração de 50 mM<sup>79</sup>.

A interação dos parabens com micelas também vem sendo sistematicamente estudada por Shimizu e Iwatsuru. Eles determinaram os coeficientes de partição do metil ao butilparaben em micelas de SDS, Tween 20 (um surfante não iônico) e CTAB medindo o deslocamento dos espectros eletrônicos de absorção dos parabens com sua incorporação nas micelas e sua dependência com a temperatura<sup>80-82</sup>. Ainda utilizando a variação dos espectros de absorção dos parabens causada pela interação com as micelas, eles determinaram os valores de c.m.c. de surfatantes não iônicos e de micelas mistas compostas por surfatantes iônico e não iônico<sup>83-85</sup>.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Reagentes Químicos

Os p-hidroxibenzoatos de alquila foram utilizados a partir de amostras doadas pela Nipa Inc, gentilmente cedidas pelo Prof. A.E. Beezer, com uma pureza atestada pelo fornecedor de 99,9%, e foram utilizados sem tratamento prévio. Durante todos os experimentos, em solução alcalina ou ácida, com ou sem micelas, não foi detectado nenhum indício de hidrólise do paraben, através do aparecimento da banda de absorção devida ao ácido p-hidróxibenzóico.

A água utilizada em todos os experimentos foi bidestilada, em aparelhagem de vidro, a partir de uma solução levemente alcalina de  $\text{KMnO}_4$ . O etanol utilizado como solvente, era p.a., Merck, 95% em volume.

Os surfatantes utilizados foram :

- CTAB, brometo de hexadeciltrimetilamônio, Merck, p.a. (Clote 331 KZ 2738342). Antes de serem usadas, as amostras foram purificadas por, pelo menos, 3 recristalizações a partir de uma mistura acetona/etanol, 1:1 em volume, e mantidas em dessecador. A sua c.m.c. em água, a  $25^\circ\text{C}$ , medida por condutividade, foi  $9,2 \times 10^{-4}$  M, em boa concordância com os valores da literatura <sup>11</sup>.

- SDS, dodecilsulfato de sódio, Sigma, 99%, foi usado sem tratamento prévio.

- Genapol X-080,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_8$ , foi doado pela Hoescht, e usado como recebido. Sua c.m.c em água, a  $25^\circ\text{C}$ , medida utilizando fenol como sonda foi  $2,1 \times 10^{-4}$  M.

- DODAC, cloreto de dioctadecildimetilamônio, foi purificado de uma amostra cedida pela Herga Indústrias Químicas, por recristalização a partir de uma mistura etanol/acetona, conforme procedimento descrito na literatura <sup>86</sup>. Estas amostras já purificadas foram gentilmente cedidas pela profa. Iolanda M. Cuccovia.

Os sais inorgânicos utilizados foram : cloreto de sódio, Vetec, p.a.; cloreto de potássio, Vetec, p.a.; sulfato de potássio, Malinckrodt/Quimis, p.a.; brometo de potássio, Ecibra, p.a.; nitrato de potássio, Reagen, p.a.; fluoreto de potássio, KF.2H<sub>2</sub>O, Ecibra, p.a.; biftalato de potássio, Reagen, p.a..

O p-toluenossulfonato de potássio foi preparado por titulação do ácido p-toluenossulfônico, Carlo Erba, p.a., com KOH. O ácido bórico, ArtLab, p.a., foi recristalizado a partir de solução aquosa. O hidróxido de sódio foi Merck, p.a., e as soluções foram padronizadas contra biftalato de potássio. O ácido clorídrico foi usado a partir de soluções 37% em volume, Merck, p.a.. O Tris, tris-hidroximetilaminometano, p.a. foi fornecido pela Reagen.

Os álcoois utilizados como aditivos nas medidas de pKa aparente foram: etanol, Malinckrodt, p.a.; propanol, Carlo Erba, p.a. e butanol, Ecibra, p.a. . Estes foram secos e purificados conforme descrito anteriormente <sup>87</sup>.

O polieletrólito polietilenoimina, nome comercial Polymin P, foi utilizado a partir de uma solução aquosa 50% em massa, da BDH Chemical Ltd, cedida pelo Prof. I. Wadsö. Estas amostras apresentavam um forte cheiro de hidróxido de amônio. Foi realizada uma tentativa de borbulhamento de nitrogênio, para arrastar o hidróxido de amônio dissolvido. Esta, entretanto, devido à alta viscosidade da amostra, não surtiu efeito. Como o pH de todas as soluções com polieletrólito foi medido diretamente, o pH das soluções utilizadas foi abaixado por adição de solução de HCl.

Os estudos de hemólise foram realizados com sangue de fêmeas de rato albino, coletado no dia do experimento sem o uso de anticoagulantes. Os eritrócitos foram separados por centrifugação e lavados com tampão fosfato, isotônico, de pH 7,4. As amostras foram preparadas a partir de uma suspensão 50% em volume de hemácias. As membranas de eritrócito, "ghosts", foram obtidas por hemólise induzida em meio hipotônico e lavadas repetidas vezes segundo o procedimento sugerido por Dodge e colaboradores <sup>88</sup>.

## 2.2. Equipamentos

Espectrofotômetros UV-Visível : as medidas de absorbância realizadas em comprimento de onda fixo, foram feitas utilizando um espectrofotômetro Beckman DB-G, com um compartimento de termostatização da cubeta. Os espectros de absorção no UV foram obtidos em um espectrofotômetro DMS 100, Intralab.

Banhos termostatizados : a termostatização das amostras foi feita com um banho e circulador Masterline 2095, Forma Scientific, que na faixa de temperaturas utilizada, entre 15 e 35 °C, assegurou uma variação na temperatura menor que 0,5°C.

Para as medidas de sorção em Teflon utilizamos uma bomba peristáltica modelo Microperpex 2132, da LKB.

As tentativas de determinação da massa molecular do polieletrólito PEI foram feitas utilizando um osmômetro de pressão de vapor Knauer.

Medidas de pH foram feitas com um pHmetro Micronal, modelo B 371, com eletrodo de vidro calibrado com soluções de referência de pH 4 e 7, fornecidas pela Merck. Nas medidas de condutividade utilizamos um condutivímetro Micronal B 331.

As medidas dos coeficientes de difusão foram realizadas utilizando um cromatógrafo HPLC Varian 8500, com detector UV/visível de comprimento de onda variável. O equipamento para estas medidas foi arranjado conforme mostrado na figura 2.1. A amostra injetada era previamente dissolvida no mesmo solvente utilizado como eluente, e os volumes injetados variaram entre 5 e 15 µl. As concentrações dos parabens injetadas eram em torno de  $6 \times 10^{-4}$  M. O eluente era bombeado através de um tubo de Teflon de 8,5 m de comprimento, enrolado com diâmetro de 50 cm e termostatizado, a uma vazão de 10 ml.h<sup>-1</sup>. A curva de dispersão do soluto era obtida em um registrador a partir das medidas de absorbância fornecidas pelo detector UV/Visível. O tubo de Teflon

foi comprado da LKB.

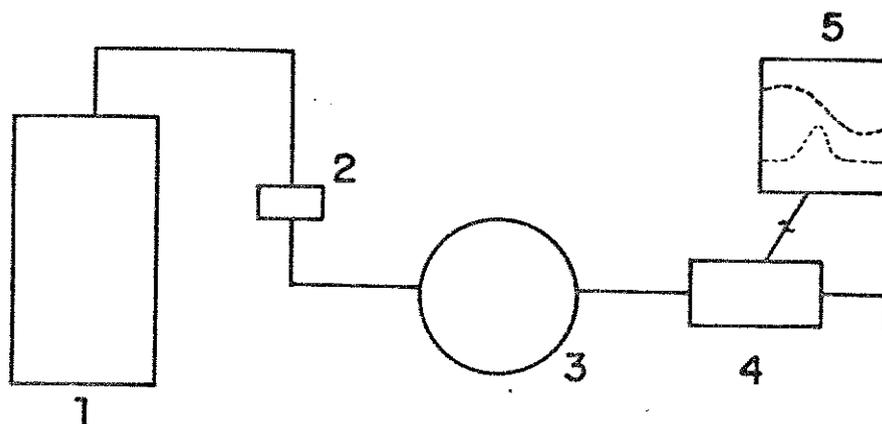


Figura 2.1. Equipamento usado para as medidas dos coeficientes de difusão. 1. reservatório de eluente e bomba do HPLC; 2. injetor; 3. tubo de Teflon; 4. detector UV/visível; 5. registrador.

O raio interno deste tubo foi calibrado a partir da determinação dos coeficientes de difusão de p-nitrofenol, p.a., Fluka;  $\beta$ -naftol, p.a., Quimbrasil, e cafeína, p.a., Carlo Erba, comparando-os com valores da literatura<sup>89,90</sup>. Entretanto, os valores obtidos com os dois primeiros compostos apresentaram baixa reprodutibilidade. Os raios assim obtidos foram:  $0,356 \pm 0,015$  mm com p-nitrofenol e  $0,389 \pm 0,050$  mm com  $\beta$ -naftol. As curvas de dispersão destes compostos apresentaram características que indicam a ocorrência de adsorção sobre o tubo de Teflon, conforme é discutido na seção 3.1.

No caso da cafeína, estas características não foram observadas. Além disto, os valores medidos por Price<sup>90</sup>, utilizando o método de cela de diafragma e o de Taylor, com tubo de aço

inoxidável, concordam entre si, e com o descrito por Leaist e Hui<sup>91</sup>, que foi obtido pela técnica de Taylor usando tubo de Teflon. Isto indica que no caso de cafeína, não ocorre adsorção significativa, permitindo o seu uso como padrão. Assim, utilizamos o valor obtido através da calibração com cafeína, que foi  $r = 0,418 \pm 0,014$  mm. Também foi feita uma estimativa deste valor através de medidas do diâmetro de uma seção transversal do tubo utilizando um microscópio metalográfico no CPqD, Telebrás. O valor médio assim obtido foi  $r = 0,38 \pm 0,02$  mm, em boa concordância com o obtido através das medidas de difusão.

A preparação das amostras de lipossomas foi feita utilizando um banho com ultra-som Thornton: Os termogramas destas amostras foram obtidos em um aparelho de DSC DuPont 9900, sob fluxo de nitrogênio. As temperaturas e energia de transição foram calculadas em relação à fusão de índio metálico.

### 3. PROCEDIMENTOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estudo do Comportamento dos Parabens em Solução através da Determinação dos seus Coeficientes de Difusão

O fenômeno da difusão molecular em líquidos está presente em diversos processos físicos e químicos que envolvem transferência de massa, como : reações químicas; processos de mistura, destilação e extração; processos biológicos, como o transporte de nutrientes e metabólitos nos seres vivos; de separação, como cromatografia; entre outros. Além disto, o estudo da difusão fornece informações importantes sobre outros processos que ocorrem em solução como interações soluto-solvente <sup>92,93</sup>, agregação de solutos <sup>94,95</sup> ou processos de partição de solutos em sistemas macromoleculares <sup>96-98</sup>.

Por estes motivos, vários estudos vêm tratando da determinação dos coeficientes de difusão em líquidos, da interpretação destes resultados ou de técnicas a serem empregadas nestes estudos. Neste sentido, uma grande variedade de métodos vêm sendo empregada para determinação destes valores. Entre os mais utilizados, citamos : a técnica de interferência de Gouy <sup>99</sup>, a de cela de diafragma <sup>100</sup>, a de ressonância magnética nuclear com eco de spin <sup>101</sup> e o método de dispersão, ou de alargamento de banda, ou ainda cromatográfico, de Taylor <sup>102-103</sup>. Esta última técnica tem sido uma das mais empregadas devido à relativa simplicidade dos equipamentos empregados e a uma base teórica bem desenvolvida <sup>104</sup>.

Os coeficientes de difusão usualmente descritos na literatura podem estar relacionados a diferentes processos. O termo coeficiente de intradifusão ou autodifusão descreve a difusão de um composto em uma solução homogênea ou em um líquido puro, devida ao movimento Browniano das moléculas. A difusão que ocorre durante a mistura de dois componentes, associada a gradientes de concentração, é descrita por um coeficiente de interdifusão, ou de

difusão mútua. Quando ocorre auto-associação dos solutos, Leaist e Hui <sup>91</sup> mostraram que os coeficientes de inter e intradifusão se igualam. No caso da técnica de dispersão de Taylor, o coeficiente de difusão obtido é o coeficiente de interdifusão.

### 3.1.1. O Método de Taylor para Estudos de Difusão

Este método originou-se dos estudos de Taylor sobre a dispersão de solutos em um solvente fluindo em fluxo laminar no interior de um tubo <sup>102</sup>, tendo sido aperfeiçoado por Aris <sup>103</sup>. De acordo com esta técnica, uma pequena quantidade de soluto é injetada em um eluente que flui em fluxo laminar por um tubo estreito e longo. O soluto sofre uma combinação de processos de dispersão devidos à difusão molecular, causada pelo gradiente de concentrações no interior do tubo, e ao perfil parabólico de velocidades de fluxo do eluente. Após um determinado intervalo de tempo a partir da injeção, a dispersão do soluto leva a um perfil quase gaussiano de concentração ao atingir o detector. Uma representação esquemática deste processo é fornecida na figura 3.1.1. Os tipos de detectores mais empregados são os de índice de refração ou, no caso de solutos com cromóforos, os de absorção no UV ou visível.

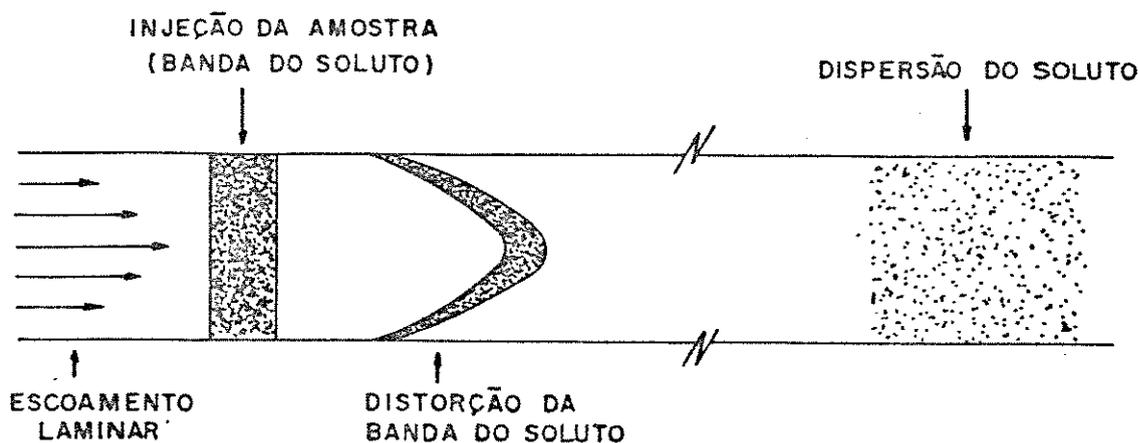


Figura 3.1.1. Dispersão do soluto no tubo utilizando o método de Taylor (adaptado de C.A. Ouano e J.A. Carothers *J. Phys. Chem.* 1975, 79, 1314).

A partir da curva de dispersão, o coeficiente de difusão é obtido por <sup>104</sup>

$$D = \frac{0,231 \cdot r_i^2 \cdot t_R}{(W_{1/2})^2} \quad [3.1.1]$$

onde  $r_i$  é o raio interno do tubo em que ocorre a difusão,  $t_R$ , o tempo de retenção do soluto, tempo decorrido entre a sua injeção e detecção do máximo na curva de dispersão, e  $W_{1/2}$ , a largura da banda de dispersão à meia-altura. As condições experimentais de validade dos requisitos teóricos foram analisadas por Wakeham e colaboradores <sup>104</sup>. Segundo estas condições, para a aplicação da equação [3.1.1], deve-se satisfazer :

$$i) \quad \frac{\bar{u}_o \cdot r}{D} > 700 \quad [3.1.2]$$

onde  $\bar{u}_o$  é a velocidade média do fluido e  $D$ , o coeficiente de difusão do soluto. Em nossos experimentos, segundo as condições descritas na seção anterior,  $\bar{u}_o$  é aproximadamente  $6 \times 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  e o valor mínimo de  $D$ , em torno de  $4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Estes valores levam a um valor de aproximadamente 2400 nesta equação.

$$ii) \quad \frac{D \cdot t_R}{r^2} > 10 \quad [3.1.3]$$

Este requisito não é totalmente satisfeito de acordo com nossas condições experimentais, uma vez que os valores para este produto variam entre 3 e 8. Esta condição provem da desconsideração de um termo na equação que descreve a largura da banda de dispersão <sup>104</sup>. Entretanto, o erro máximo provocado pela desconsideração deste termo, sob nossas condições experimentais, é de menos de 2%.

iii) Para assegurar que o fluxo seja laminar, o número de Reynolds,  $Re$ , deve satisfazer

$$Re = 2 \cdot u_0 \cdot r_i \cdot \rho / \eta < 2000 \quad [3.1.4]$$

Usando a densidade,  $\rho$ , e viscosidade,  $\eta$ , da água, obtivemos  $Re = 5,1$ .

iv) Os efeitos de fluxos secundários causados pelo enrolamento do tubo em que ocorre a difusão podem ser negligenciados se a razão entre os raios de enrolamento e interno do tubo,  $\omega$ , for maior que 100. De acordo com o arranjo utilizado, figura 2.1, esta razão é igual a 1300. Outro requisito é que o produto do número de Dean pelo número de Schmidt deve satisfazer

$$De^2 \cdot Sc \leq 20 \quad [3.1.5]$$

onde  $De = Re \cdot \omega^{-1/2}$  e  $Sc = \eta / (\rho \cdot D)$ . De acordo com as nossas condições, o valor máximo para este produto é próximo de 25. Como estas condições foram impostas <sup>104</sup> de modo a fornecer valores com precisão melhor que 0,1%, valores um pouco além destes limites são aceitáveis.

### 3.1.2. Determinação dos Coeficientes de Difusão

Os coeficientes de difusão dos parabens foram determinados utilizando o método de Taylor, tendo como solventes água, misturas água/etanol e soluções de hidróxido de sódio. Os resultados, expressos como médias de pelo menos 4 determinações, estão listados na Tabela 3.1.1. Os valores assim determinados serão chamados coeficientes de difusão aparentes,  $D_{ap}$ . Analisando-se estes resultados, observa-se que, em alguns casos, a diminuição do coeficiente de difusão ao longo da série homóloga é muito grande, conforme pode ser verificado na figura 3.1.2. Este desvio é maior para os homólogos maiores e para eluentes com maior conteúdo de água.

Tominaga e colaboradores <sup>105-107</sup> estudando a difusão de moléculas apolares em água e etanol observaram que a difusão em

água para os mesmos solutos, feitas as correções devido às diferenças na viscosidade dos solventes, era mais lenta do que em etanol. Eles propuseram que esta diferença seria consequência de um aumento na microviscosidade do solvente reflexo de um aumento na ordenação deste, causado pela interação com as porções hidrofóbicas do soluto. Entretanto, os valores dos coeficientes de difusão por eles determinados para benzeno, tolueno, etil e butilbenzeno não apresentam nenhum desvio considerável com o aumento da cadeia alifática do soluto, como seria esperado devido a um efeito hidrofóbico.

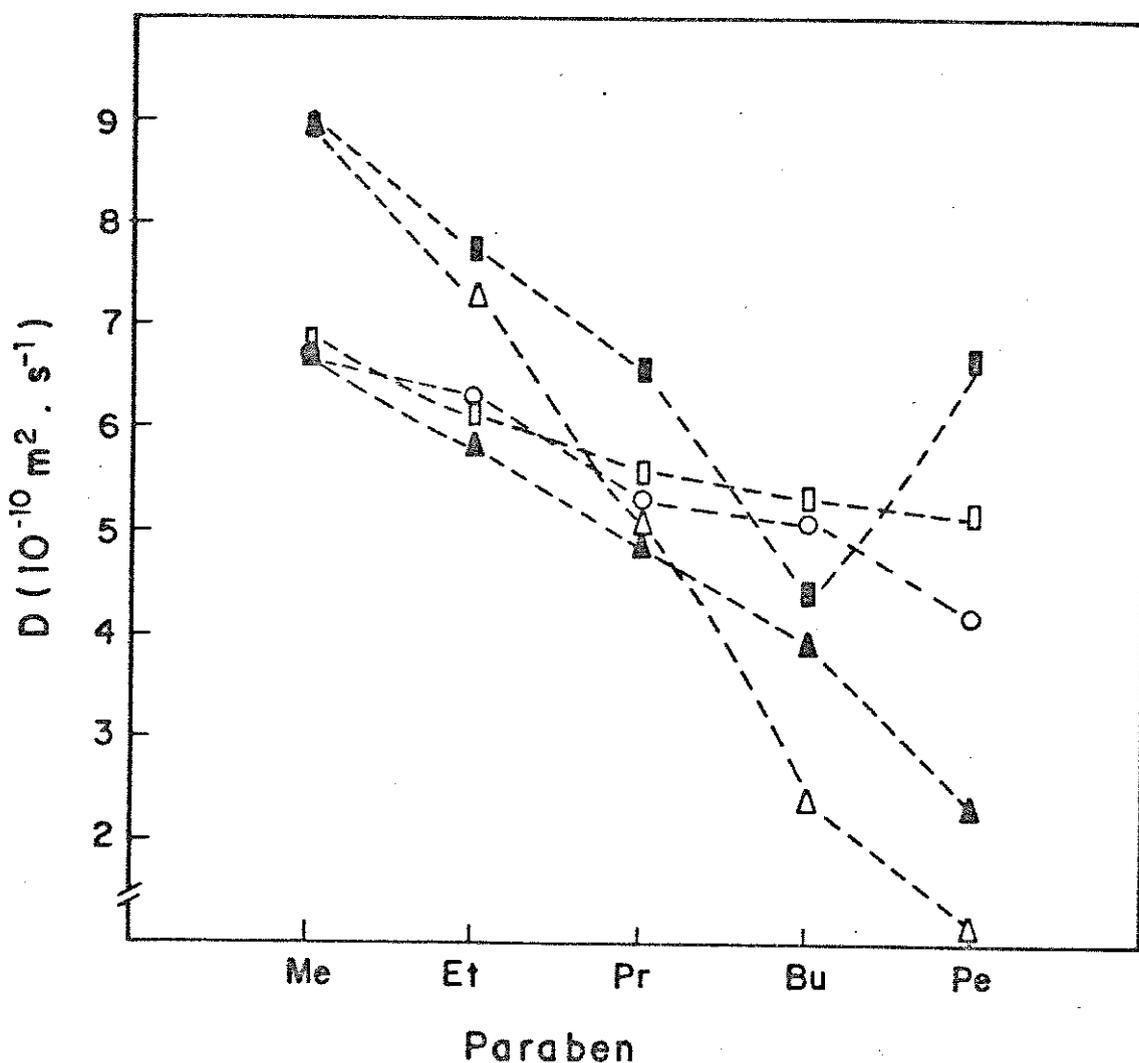


Figura 3.1.2. Variação dos coeficientes de difusão aparentes e corrigidos dos parabens. Dap em:  $\Delta$  - água,  $\blacktriangle$  - 10% etanol,  $\square$  - 95% etanol. Dcor em:  $\blacksquare$  - água e  $\circ$  - 10% etanol.

Tabela 3.1.1. Coeficientes de Difusão Aparentes, Dap, e tempos de retenção, tr, para os parabens em água, solução de NaOH 5mM e misturas água/etanol.

homólogo		Água	NaOH	EtOH 10%	EtOH 20%	EtOH 30%	EtOH 95%
metil	Dap	8,93	8,63	6,73	5,24	4,27	6,86
	tr	1544	1500	1526	1525	1552	1541
etil	Dap	7,25	7,84	5,82	5,01	3,94	6,13
	tr	1564	1511	1551	1516	1544	1532
propil	Dap	5,07	7,26	4,84	4,16	3,69	5,58
	tr	1630	1529	1553	1534	1517	1554
butil	Dap	2,37	6,79	3,90	3,78	3,30	5,35
	tr	1775	1542	1614	1546	1520	1535
pentil	Dap	1,14	5,72	2,30	2,53	2,93	5,22
	tr	2566	1563	1746	1643	1571	1551

a - frações volumétricas de etanol, b - coeficientes de difusão expressos em  $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , valores reprodutíveis em menos de 5%, c - tempos de retenção expressos em segundos, valores reprodutíveis em menos de 3 %.

Além disto, aqueles autores realizaram um estudo de difusão com variação da temperatura <sup>106</sup> e observaram que as energias de ativação para a difusão daqueles solutos eram muito próximas do valor descrito para a autodifusão da água, o que não seria esperado em caso de maior estruturação deste solvente. Aqueles experimentos foram realizados em concentrações de solutos variando de 1 a  $3 \times 10^{-4}$  M, e numa faixa de temperaturas de 265 a 433 K. Um comportamento semelhante, em que não se observa nenhuma variação anômala, é obtido analisando a variação dos coeficientes de difusão descritos por Frey e King <sup>108</sup> para acetatos de alquila, de etila a pentila, em água a 25°C, em concentrações entre 0,8 e 5 mM.

Outra possibilidade para explicar esta variação anômala é a de que os solutos poderiam estar sofrendo uma agregação hidrofóbica. De acordo com o método de Taylor, após a injeção, o soluto se dispersa no interior do tubo até que, quando atinge o detector, o perfil de sua concentração no interior do tubo é gaussiano. Através dos coeficientes de absorção molar dos parabens é possível avaliar que a concentração máxima em que estes solutos atingem o detector de UV é aproximadamente 1 / 50 do valor inicial, ou seja, em torno de  $1 \times 10^{-5}$  M.

A existência de agregação hidrofóbica em solução aquosa é bastante conhecida, por exemplo, para surfatantes. No caso de alguns surfatantes não iônicos, a agregação pode ocorrer em concentrações próximas de  $10^{-5}$  M <sup>109</sup>. A associação em solução também foi relatada para moléculas como cafeína <sup>91,94</sup>,  $\alpha$ -feniletilamina <sup>110</sup>, 2-butoxietanol <sup>111</sup> e fenol <sup>112</sup>, em água, a concentrações maiores, ou para álcoois e fenóis, em solventes apróticos. Entretanto, não existe, ao nosso conhecimento, relato de agregação de solutos similares aos parabens, em soluções aquosas e nesta faixa de concentrações. Além disto, não foi observado nenhum desvio na lei de Beer para a absorção de luz ultravioleta pelos parabens na faixa de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M, que seria esperado no caso de auto-associação destes compostos.

Entretanto, junto com os desvios nos coeficientes de difusão, observamos que ocorreu um aumento nos tempos de retenção dos solutos. O tempo de retenção do soluto depende somente da velocidade de bombeamento do eluente. Também foi observado que, junto com o aumento nos tempos de retenção, ocorreu, em alguns casos, o aparecimento de assimetria nas curvas de dispersão. Estas duas observações, de aumento no tempo de retenção e aparecimento de "cauda" nas curvas de dispersão podem ser interpretadas como sinal da ocorrência de adsorção do soluto sobre o tubo de Teflon 113

Na realidade, a variação da concentração do soluto em função do tempo nestes experimentos não é perfeitamente gaussiana. Esta variação é descrita por 114

$$C \propto (D/t)^{1/2} \cdot \exp [-12D (t - t_R)^2 / r_i^2 \cdot t] \quad [3.1.6]$$

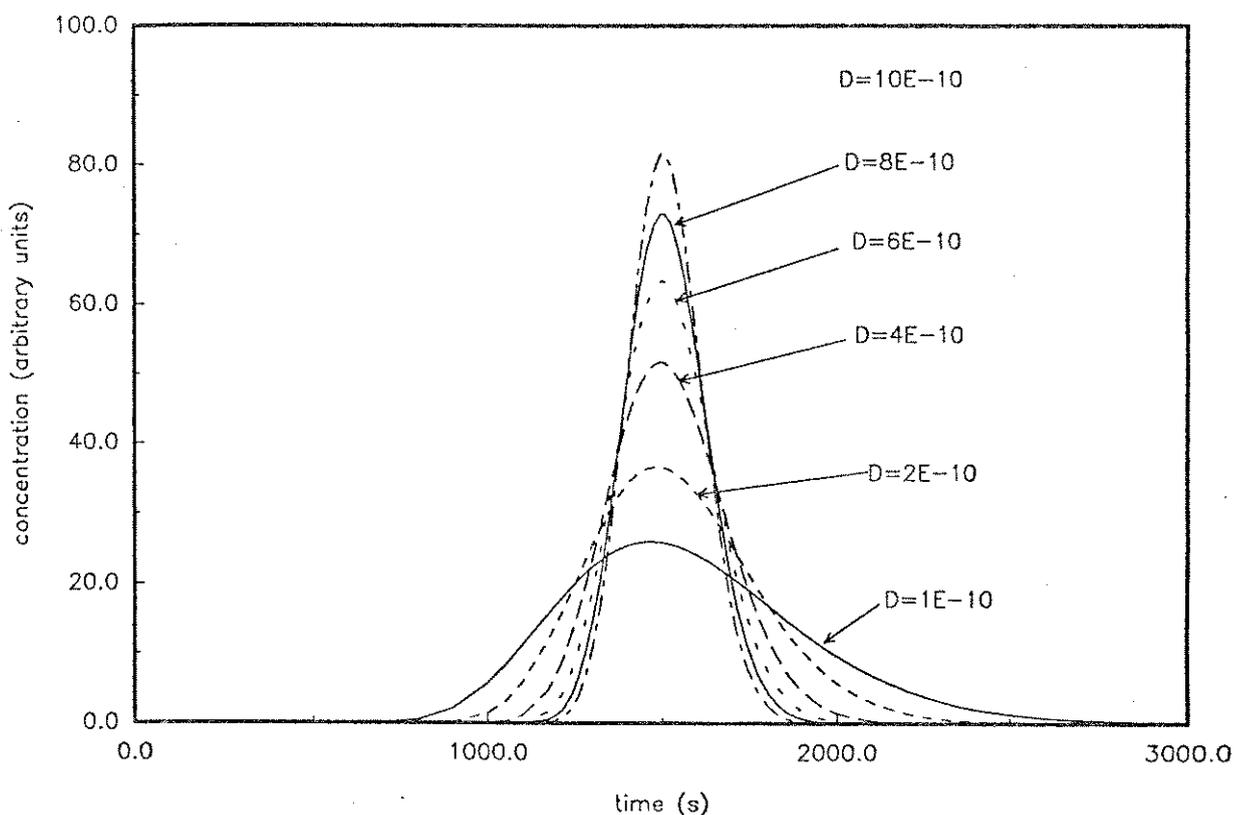


Figura 3.1.3. Simulação da equação 3.1.6, para coeficientes de difusão variando entre 1 e  $10 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Parâmetros utilizados :  $r_i = 0,418 \text{ mm}$  e  $t_R = 1500 \text{ s}$ .

Assim, de acordo com esta equação, assimetrias na curva de dispersão podem aparecer para solutos que difundem mais lentamente, à medida que o fator pré-exponencial se torne mais importante. A figura 3.1.3 mostra simulações de curvas de dispersão utilizando os mesmos parâmetros experimentais desta tese, e variando o coeficiente de difusão entre 1 e  $10 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Nesta figura observa-se que, para os menores valores de  $D$ , ocorrem assimetrias na parte final da curva de dispersão. Entretanto, comparando-se estas curvas com as obtidas experimentalmente para a difusão em água, mostradas na figura 3.1.4, verifica-se que a assimetria nas últimas é maior.

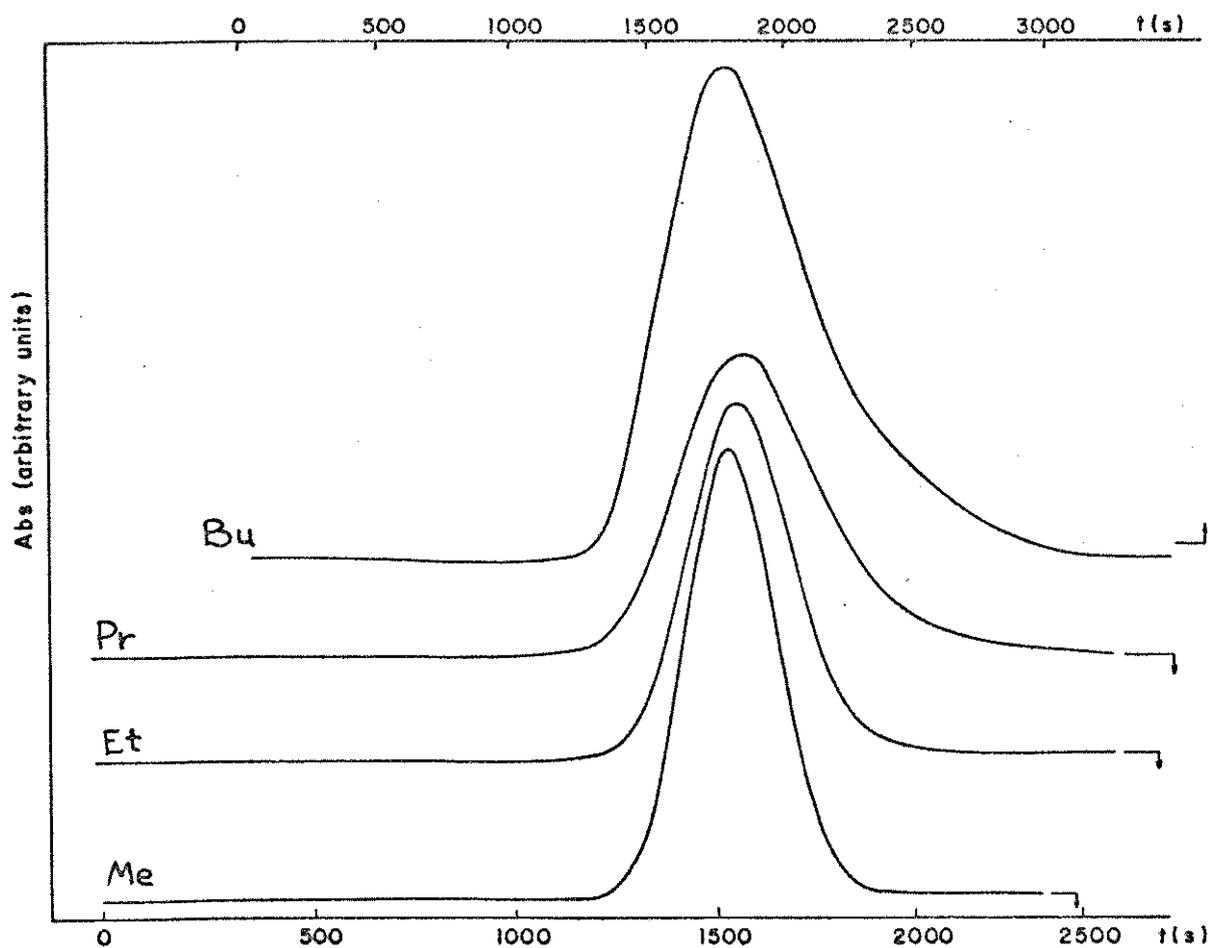


Figura 3.1.4. Curvas de dispersão obtidas experimentalmente para a difusão dos parabens em água (ver texto para condições experimentais).

### 3.1.2.1. Estudo da Adsorção dos Parabens sobre Teflon

Teflon, politetrafluoretileno, é um polímero fluorado, com grande resistência química e de características hidro e lipofóbicas. Os compostos perfluorados, termo utilizado para caracterizar que todos os átomos de hidrogênio ligados ao carbono foram substituídos por átomos de flúor, têm uma interação desfavorável tanto com água como com hidrocarbonetos <sup>115</sup>. Este comportamento é atribuído a impedimentos geométricos para acomodação dos grupos  $CF_2$ , mais volumosos <sup>116</sup>, em água, e para sua interação com os grupos  $CH_2$ , diminuindo as interações de van der Waals entre eles <sup>117</sup>. Por este motivo, os surfatantes perfluorados têm um caráter mais hidrofóbico que os equivalentes hidrocarbonados, sendo sua c.m.c. próxima da de um surfatante com cadeia de hidrocarboneto 1,5 vezes maior. A contribuição por grupo  $CF_2$  para a energia livre de micelização é de aproximadamente 1,6 kT, enquanto que para um grupo  $CH_2$ , é de 1,1 kT <sup>118</sup>. Outra propriedade interessante de líquidos perfluorados é a de fornecerem uma alta solubilidade para gases, obedecendo a lei de Henry até altas pressões <sup>119</sup>. Por este motivo, estes compostos têm sido utilizados como substitutos de sangue, para transporte de gases no organismo <sup>119</sup>.

Entretanto, apesar das interações desfavoráveis, algumas evidências de adsorção em Teflon têm sido relatadas. Entre alguns dos compostos cuja adsorção foi estudada, citamos : ferrocarbonilas, clorofórmio e ácido acético <sup>120</sup>, ácidos e bases inorgânicos <sup>121</sup> e surfatantes catiônicos <sup>117,122</sup>. Mesmo assim, Leaist <sup>123</sup> sugeriu a substituição de tubos de aço inoxidável por tubos de Teflon para medidas de difusão do surfatante não-iônico Triton X-100 através da técnica de Taylor.

Para verificar a pureza do tubo de Teflon utilizado nas medidas de difusão, foi obtido seu espectro de absorção na região do infravermelho utilizando um espectrofotômetro Nicolet 520, com

transformada de Fourier, com um acessório de ATR (refletância total atenuada). Operando neste modo, o espectro registrado representa a absorção devida à camada mais superficial do polímero. Os espectros obtidos apresentaram duas bandas características de estiramento C-F, na região entre 1100 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , em concordância com as observadas para compostos perfluorados como Fluorolube <sup>124</sup>. Não foram observadas bandas devidas à absorção de modos de estiramento C-H, na região de 2800-2900  $\text{cm}^{-1}$ , ou devido a grupos carbonila, em torno de 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  ou hidroxila, conforme mostra a figura 3.1.5.

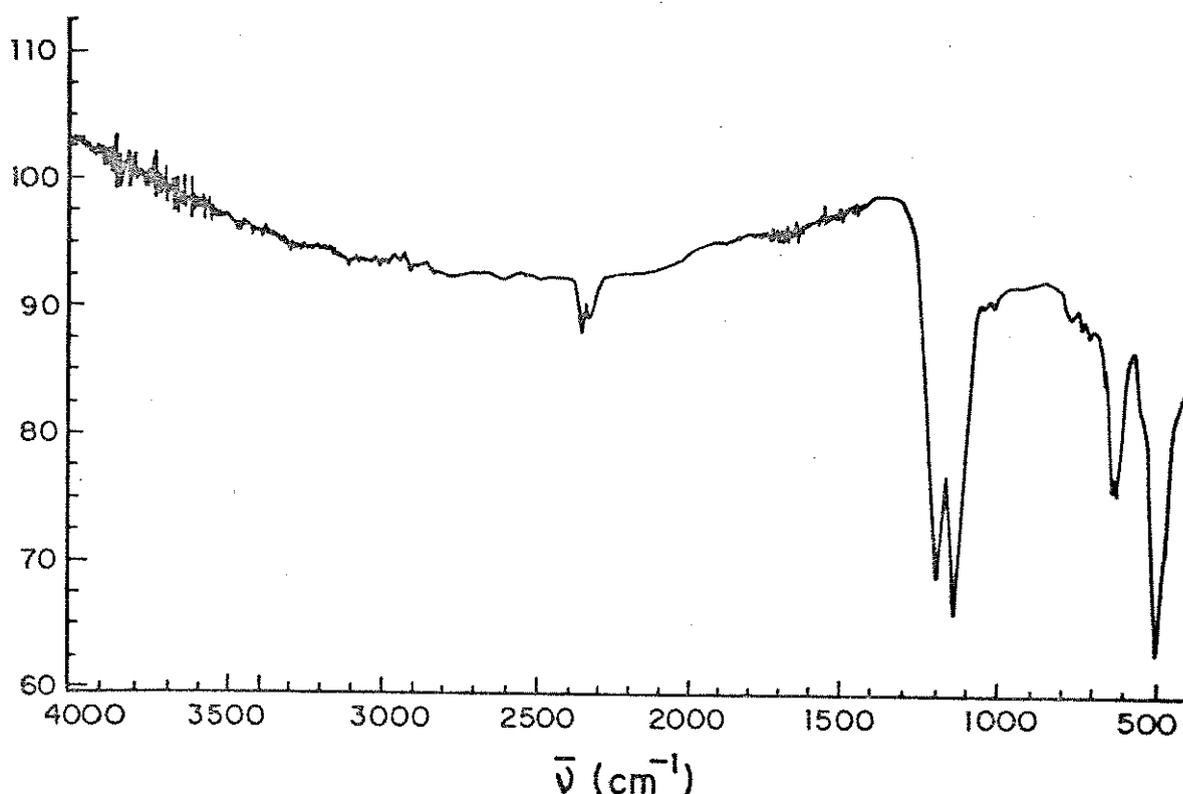


Figura 3.1.5. Espectro de absorção no infravermelho obtido com acessório de ATR para os tubos de Teflon utilizados nos experimentos de difusão.

Estudos com látex de Teflon <sup>117</sup> indicaram a presença de aproximadamente 2% de grupos aniônicos superficiais, provavelmente carboxilas, como decorrência do processo de polimerização por radicais livres. Entretanto, durante o processo de extrusão,

devido à menor energia superficial dos compostos fluorados, estes deveriam deslocar outros grupos polares da superfície do tubo. Além disto, o espectro de infravermelho indica que não há contaminação por hidrocarbonetos ou grupos polares na superfície do tubo de Teflon.

Para verificar a ocorrência de adsorção dos parabens sobre Teflon, foram realizados experimentos utilizando pó de Teflon. Este material foi escolhido por fornecer uma maior área superficial. O espectro de infravermelho deste material concorda com o obtido para o tubo de Teflon, de acordo com a discussão anterior. O pó de Teflon foi lavado com etanol e o álcool retirado por diálise contra água. As medidas de adsorção foram realizadas deixando uma solução de paraben em contato com o pó de Teflon por 48 horas, a 25°C, com agitação em intervalos de 3-4 horas, exceto durante a noite. A quantidade de paraben remanescente em solução foi determinada espectrofotometricamente. Entretanto, o pó de Teflon não era significativamente molhado pela água, permanecendo em sua maior parte na superfície da solução. Desta maneira, a superfície do polímero exposta à solução não era reproduzida nos diferentes experimentos, levando a uma baixa reprodutibilidade nos resultados obtidos.

Entretanto, mesmo sem uma boa reprodutibilidade, foi possível observar que ocorria adsorção e que a quantidade adsorvida era maior para os solutos mais hidrofóbicos. Outra constatação foi a de que a molhabilidade do pó de Teflon era maior nas soluções dos homólogos maiores, o que era qualitativamente evidenciado pela maior quantidade de pó submersa. Este fato indica que a adsorção do paraben sobre o Teflon diminui a energia livre interfacial para o contato água/Teflon. Assim, além da repulsão hidrofóbica do soluto, a adsorção parece ser favorecida pela diminuição da repulsão entre a superfície do polímero e a água.

Para obter resultados mais reprodutíveis para quantificar a adsorção dos parabens, foram realizados experimentos de adsorção utilizando o próprio tubo de Teflon em que foram realizadas as

medidas de difusão. Além da melhor reprodutibilidade, estas medidas fornecem uma visão mais realista do que ocorria durante as medidas de difusão. A área interna do tubo é de aproximadamente  $200 \text{ cm}^2$ , raio interno de  $0,38 \text{ mm}$  e  $8,5 \text{ m}$  de comprimento. Este arranjo experimental também permite o contato de uma área considerável de Teflon com um pequeno volume de solução, em torno de  $4 \text{ ml}$ . Assim, mesmo a adsorção de uma pequena quantidade de soluto provoca uma variação detectável na sua concentração. Isto não seria possível se fosse utilizado outro arranjo que envolvesse uma maior área superficial de Teflon, mas em contato com um maior volume de solução. A solução de paraben foi bombeada para o interior do tubo com o auxílio de uma bomba peristáltica e deixada em equilíbrio com o tubo. Após o intervalo de tempo desejado, a solução foi retirada e a concentração da solução remanescente, determinada espectrofotometricamente.

A cinética de adsorção foi estudada variando-se o tempo de equilíbrio de 30 minutos a 15 horas. A variação da quantidade de pentilparaben adsorvido em função do tempo de exposição é mostrada na figura 3.4. Estas medidas foram feitas em duplicatas independentes, sendo que os intervalos mostrados na figura 3.1.6 representam estes dois experimentos.

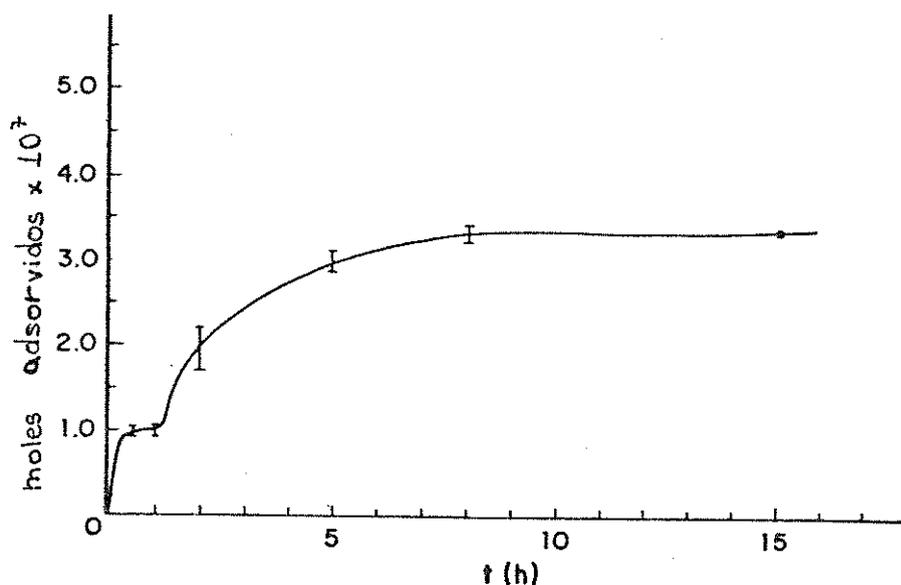


Figura 3.1.6. Quantidade de pentilparaben sorvida no tubo de Teflon em função do tempo de contato.  $[\text{pentil}] = 0,7 \text{ mM}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

Analisando-se estes resultados observamos que a cinética de difusão pode ser dividida em dois processos : um bastante rápido, atingindo um patamar que engloba intervalos de até uma hora, e um segundo, mais lento, cujo patamar é atingido com tempos de equilíbrio maiores que 5 horas. O primeiro processo pode ser atribuído à adsorção física sobre a superfície do tubo, e o segundo, a um processo de sorção dos parabens pelo Teflon. Pode-se assumir que no caso dos experimentos de difusão, o tempo de contato do soluto com o Teflon é curto uma vez que a banda de soluto difunde a uma velocidade média de  $6 \text{ mm.s}^{-1}$ . Assim, neste caso a interação do soluto com o Teflon deve ser principalmente como adsorção na superfície do polímero.

Processos de sorção são comuns em polímeros e a extensão da sorção depende da afinidade entre o soluto e o polímero. No caso do Teflon, foi verificado <sup>125</sup> que o intumescimento do polímero por solventes orgânicos estava relacionado com a afinidade entre o solvente e o Teflon, medida a partir dos parâmetros de Hildebrand,  $\delta$ . De acordo com este procedimento, compostos com  $\delta$  próximos têm uma maior interação <sup>126</sup>. Assim, compostos como ferrocarbonila, que possui um parâmetro de Hildebrand baixo apresentaram uma grande sorção em Teflon <sup>120</sup>.

As isotermas de adsorção foram obtidas deixando as amostras em contato com o Teflon por 5 horas. No caso do metil e etilparaben as variações de concentração devidas à adsorção foram muito pequenas, dificultando a detecção. Por este motivo, estas medidas foram limitadas aos homólogos maiores. Os resultados obtidos são mostrados na figura 3.1.7. As curvas representando a adsorção em função da concentração em equilíbrio têm a forma classificada por Giles como do tipo isotermas de baixa afinidade <sup>127</sup>. As quantidades máximas de paraben adsorvidas estão em torno de 10, 5 e 3%, respectivamente, para pentil, butil e propilparaben confirmando a baixa afinidade entre o soluto e o polímero.

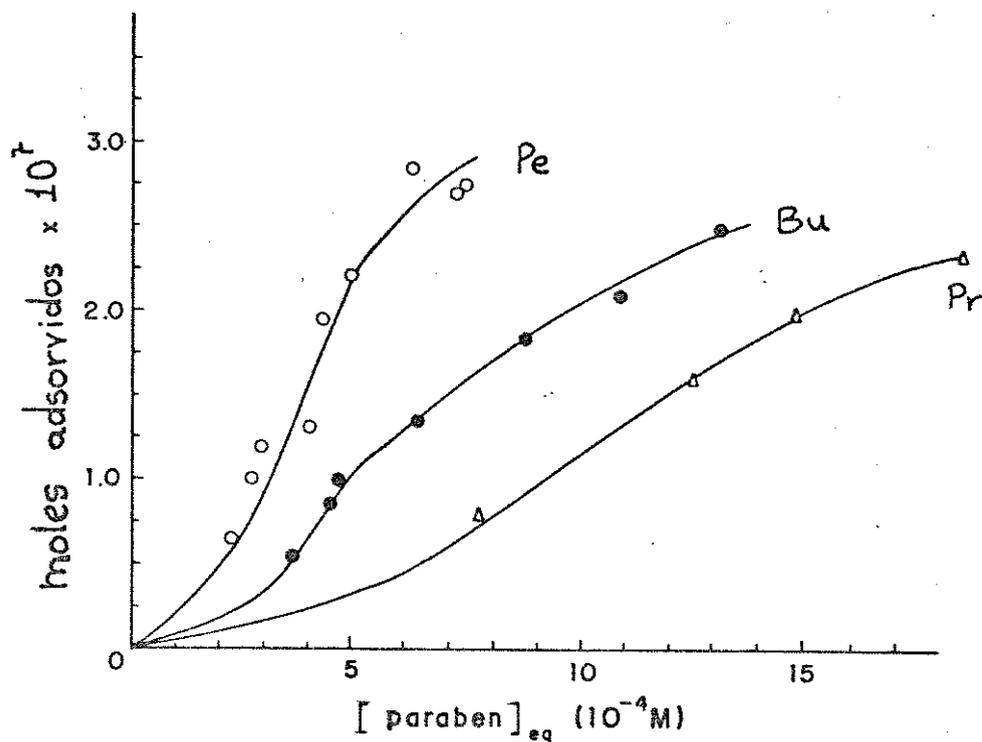


Figura 3.1.7. Isotermas de adsorção de propil, butil e pentilparaben sobre o tubo de Teflon. Tempo de contato, 5 horas, a 25° C.

Conforme discutido anteriormente, a afinidade desta interação pode ser interpretada através dos parâmetros de Hildebrand. Os perfluorcarbonetos têm parâmetros de Hildebrand muito baixos, entre 12 e 13 <sup>126</sup>. Alguns compostos similares aos parabens, como resorcinol e fenol, têm estes parâmetros maiores, respectivamente, 31,5 e 24,6 <sup>126</sup>. Via de regra, a substituição de átomos de hidrogênio por grupos polares diminui o valor de  $\delta$ : o valor para o o-hexilfenol é de 19,8, e os para 4-metilresorcinol e 4-octilresorcinol são, respectivamente, 28,4 e 25,4 <sup>126</sup>.

A adsorção de parabens já foi estudada sobre polietileno, polipropileno, cloreto de polivinila (PVC), polimetacrilato, policarbonato e poliestireno <sup>128</sup>. Segundo os autores daquele trabalho, as isotermas obtidas para a adsorção dos parabens a partir de soluções aquosas sobre aqueles polímeros se ajustavam de acordo com o modelo de Langmuir, indicando uma interação maior do que a por nós observado com Teflon. Em alguns casos, como polietileno, polipropileno e PVC, foi observado um aumento da adsorção com o tamanho do homólogo. Nos outros caso, esta tendência não foi observada. Outra observação daqueles autores, foi a de que a adsorção diminuía com a ionização dos parabens, em concordância com o que foi por nós verificado com as medidas de difusão (ver discussão na próxima seção). Estudos de adsorção sobre sílica por espectroscopia na região do infravermelho <sup>129</sup> indicaram que, naquele caso, os parabens adsorvem fisicamente através da interação dos seus grupos carbonila e hidroxila com os grupos hidroxila superficiais da sílica. Aquele estudo foi realizado apenas com metilparaben, não fornecendo informação sobre a dependência da adsorção com a hidrofobicidade do soluto.

Bee e colaboradores <sup>117</sup> estudaram a coagulação de látex de Teflon com adição de surfatantes catiônicos. Aqueles autores observaram que não havia aumento da coagulação com o aumento na cadeia carbônica do surfatante. Por este motivo, atribuíram a adsorção dos surfatantes à atração eletrostática entre cargas negativas superficiais no látex, cobrindo em torno de 2% da superfície, e o grupo iônico do tensoativo. Este resultado contrasta com a observação de que a adsorção dos parabens tem características hidrofóbicas. Os resultados por nós obtidos estão de acordo com a regra de Traube para adsorção <sup>130</sup>, indicando que há remoção efetiva da cadeia carbônica dos solutos da fase aquosa. De acordo com esta observação, os solutos devem estar orientados paralelamente à superfície do Teflon. Estes resultados podem ainda ser atribuídos à sorção dos parabens pelo Teflon, ou mesmo a uma combinação dos dois processos, o que parece mais provável.

### 3.1.2.2. Correção dos Coeficientes de Difusão para Adsorção

Os experimentos descritos anteriormente comprovaram a ocorrência de adsorção dos parabens sobre Teflon. No caso das medidas de difusão, esta adsorção é bem menor devido às menores concentrações de soluto utilizadas. Mesmo assim, os valores descritos para os coeficientes de difusão são valores aparentes. Estes valores foram corrigidos para a adsorção utilizando o tratamento proposto por Golay para cromatografia capilar <sup>131</sup>. Assumindo que o processo de adsorção é suficientemente mais rápido que o de difusão, o coeficiente de difusão real pode ser obtido a partir do aparente, que foi determinado diretamente das curvas de dispersão, através da equação

$$D = D_{ap} \frac{(1 + 6k + 11k^2)}{(1 + k)} \quad [3.1.7]$$

onde o fator de capacidade, ou razão de distribuição das massas,  $k$ , é definido como

$$k = \frac{t_a - t_o}{t_o} \quad [3.1.8]$$

e  $t_a$  e  $t_o$  são, respectivamente, os tempos de retenção dos solutos adsorvido e não retido. A Tabela 3.1.1. mostra os tempos de retenção médios para os experimentos com os parabens. Nesta tabela verifica-se que, dentro do erro experimental, os tempos de retenção do metilparaben não variam para os solventes utilizados. Isto indica que, para este composto, não ocorre adsorção significativa sobre o tubo de Teflon, permitindo a utilização do tempo de retenção do metilparaben em cada solvente como  $t_a$  para o soluto não retido,  $t_o$ , na equação [3.1.8].

Os fatores de capacidade e os coeficientes de difusão corrigidos segundo a equação [3.1.7] são mostrados na Tabela 3.1.2. Os fatores de capacidade,  $k$ , representam a fração de soluto presente na fase estacionária. Analisando-se estes resultados,

Tabela 3.1.2. Coeficientes de difusão corrigidos,  $D_{cor}$ , fatores de capacidade,  $k$ , e raios hidrodinâmicos dos parabens,  $r$ , em água, NaOH 5 mM e misturas água/etanol.

homólogo		Água	NaOH	EtOH 10%	EtOH 20%	EtOH 30%	EtOH 95%
metil	$D_{cor}$	8,93	8,63	6,73	5,24	4,27	6,86
	$k$	*	*	*	*	*	*
	$r$	2,74	2,83	2,63	2,48	2,42	2,42
etil	$D_{cor}$	7,76	8,16	6,29	5,01	3,94	6,13
	$k$	0,013	0,007	0,016	*	*	*
	$r$	3,16	3,01	2,81	2,60	2,62	2,71
propil	$D_{cor}$	6,59	7,99	5,28	4,33	3,69	5,58
	$k$	0,056	0,019	0,018	0,006	*	*
	$r$	3,72	3,07	3,36	3,00	2,80	2,98
butil	$D_{cor}$	4,44	7,74	5,11	4,04	3,30	5,35
	$k$	0,15	0,028	0,058	0,014	*	*
	$r$	5,52	3,16	3,46	3,21	3,13	3,11
pentil	$D_{cor}$	6,70	6,98	4,21	3,59	3,11	5,22
	$k$	0,66	0,042	0,14	0,077	0,012	*
	$r$	3,65	3,50	4,20	3,61	3,32	3,18

a - fração volumétrica de etanol, b - coeficientes de difusão expressos em  $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , c - raios hidrodinâmicos calculados assumindo  $C = 6$  e expressos em Å, valores de viscosidade retirados da ref. 150 .

observa-se que a adsorção, representada pelos fatores de capacidade, é maior para os homólogos mais hidrofóbicos, concordando com os resultados descritos na seção anterior. A adição de etanol ao eluente diminui esta adsorção devido a um aumento na solubilidade destes compostos. Os parabens são bastante solúveis em etanol, ao passo que apenas ligeiramente solúveis em água. Entretanto, no caso de eluentes com menor proporção de etanol, até 20% em volume, ainda ocorre uma pequena adsorção de paraben. Este comportamento comprova a natureza hidrofóbica da adsorção dos parabens sobre o Teflon, conforme verificado pelas medidas de adsorção nos experimentos de batelada.

Estes resultados permitem afirmar que, embora a interação entre hidrocarbonetos e fluorcarbonetos seja desfavorável <sup>115</sup>, ela não pode ser desprezada, especialmente quando ocorre simultaneamente com efeitos hidrofóbicos, como no caso das soluções de parabens. Um comportamento semelhante ao descrito para os parabens, embora um pouco menos intenso comparando-se os respectivos homólogos, foi observado para a difusão de m-alcoxifenóis em água <sup>133</sup>.

### 3.1.3. Estimativas do Volume Molecular dos Parabens

#### 3.1.3.1. Cálculo dos raios de van der Waals

Edward <sup>134</sup> propôs que a medida adequada para o raio hidrodinâmico de um soluto é obtida através de seu volume de van der Waals. Assim, os raios de van der Waals destes compostos foram estimados de duas maneiras : através das contribuições específicas de cada tipo de átomo da molécula <sup>134</sup> e utilizando o procedimento sugerido por Higo e Go <sup>135</sup> a partir das geometrias moleculares otimizadas pelo método AM1. Edward apresentou uma extensa compilação com os valores médios para as contribuições dos diferentes átomos para os volumes de van der Waals moleculares. Nós utilizamos estes valores para estimar os volumes de van der

Waals dos parabens. A partir da aproximação de que estes compostos podem ser considerados esféricos, calculamos seus raios de van der Waals .

A outra estimativa foi feita a partir das conformações moleculares de menor energia, calculadas para uma molécula no vácuo, segundo o método semi-empírico AM1. A partir desta geometria, de acordo com o procedimento sugerido por Higo e Go, e utilizando um programa elaborado por A. C. Gaudio, o volume molecular foi considerado como o volume ocupado pela molécula nesta geometria, considerando-se os raios de van der Waals de cada átomo. Ainda utilizando este procedimento, foi estimado o raio de cada composto totalmente solvatado, somando-se à esta geometria otimizada uma monocamada de água.

Tabela 3.1.3. Estimativas dos raios de van der Waals dos parabens.

homólogo	$r$ (Å) <sup>a</sup>	$r$ (Å) <sup>b</sup>	raio solvatado (Å) <sup>c</sup>
metil	3,15	3,15	4,97
etil	3,29	3,29	5,16
propil	3,41	3,40	5,33
butil	3,52	3,52	5,48
pentil	3,62	3,62	5,63

a - obtido usando as contribuições atômicas, b - obtido através das geometria otimizadas por AM1, c - obtido através dos raios calculados a partir das geometrias otimizadas, adicionando uma monocamada de moléculas de água.

Ambos os resultados são mostrados na Tabela 3.1.3. Esta tabela mostra que os dois procedimentos independentes levam aos mesmos valores. O volume molar experimental relatado para o metilparaben <sup>136</sup>,  $V_m = 117,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ , leva a um raio de 3,60 Å, que é maior do que o calculado segundo os procedimentos descritos acima.

### 3.1.3.2. Estimativa dos Raios Hidrodinâmicos

Os coeficientes de difusão podem ser relacionados aos raios hidrodinâmicos das partículas que difundem, através da relação de Stokes-Einstein

$$D = k_B \cdot T / f \quad [3.1.9]$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $f$ , um fator que representa a fricção da partícula com o solvente. Para o caso de uma partícula esférica, este fator de fricção,  $f$ , pode ser expresso como

$$f = C \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \quad [3.1.10]$$

em que  $\eta$  é a viscosidade do solvente,  $r$ , o raio da partícula, e  $C$  pode assumir valores entre 4 e 6. Estes valores de  $C$  representam os casos extremos em que se considera um coeficiente de atrito infinito entre a partícula e o solvente,  $C = 6$ , ou o caso de atrito nulo, em que  $C = 4$  <sup>137</sup>.

Para o caso de uma partícula não esférica, se a velocidade de fluxo for baixa o suficiente para permitir que o movimento Browniano provoque a aleatoriedade de orientações da partícula em relação à direção do fluxo, este fator de fricção torna-se <sup>138</sup>

$$f_{as} = \frac{C \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_s}{x(p)} \quad [3.1.11]$$

onde  $r_s$  é o raio de uma esfera com o mesmo volume da partícula e  $x$

$x(p)$ , uma função de  $p$ , a razão entre os eixos de revolução e axial do elipsóide, definida como

$$x(p) = \frac{p^{1/3}}{(p^2 - 1)^{1/2}} \ln [ p + (p^2 - 1)^{1/2} ] \quad [3.1.12]$$

Utilizando modelos moleculares em escala, nós estimamos os valores de  $p$  para os casos extremos em que a cadeia carbônica dos parabens está totalmente estendida, e quando esta se encontra curvada sobre o anel aromático. Em ambos os casos, o anel e o grupo carboxila foram mantidos coplanares, conforme indicado por cálculos de orbitais moleculares<sup>63</sup>. Os valores de  $p$  para os cinco primeiro homólogos nas duas conformações extremas e a diferença entre a aproximação esférica e a elipsoidal, expressa como  $1/x(p)$ , são mostrados na Tabela 3.1.4. Estes resultados mostram que a diferença máxima entre a aproximação esférica e o caso extremo de uma conformação totalmente estendida é de 8%.

A conformação estendida reduz a repulsão devida a conformações *gauche* na cadeia carbônica, mas a conformação com a cadeia enrolada deve ser favorecida em solução aquosa, por sua menor superfície hidrofóbica. Beezer e colaboradores<sup>64,65</sup> observaram que a solubilidade dos parabens em água, etanol/água 95%, octanol e hexano apresentam uma quebra na sua variação com o aumento da cadeia carbônica próxima ao hexilparaben. Estudos de tempos de relaxação de surfatantes em solução aquosa<sup>139</sup>, mostraram que a mobilidade dos grupos metileno aumenta a partir dos carbonos intermediários em relação aos mais próximos do grupo funcional. Por isto, Beezer et al.<sup>64,65</sup> sugeriram que, a partir de um certo homólogo, os grupos metileno têm uma maior liberdade de movimento, permitindo que assumam conformações curvadas, diminuindo sua área superficial e facilitando sua acomodação dentro da estrutura do solvente. É interessante notar que esta quebra na variação da solubilidade ocorre tanto em solventes polares e estruturados por pontes de hidrogênio, como água e etanol, quanto em hexano, um solvente apolar em que existem apenas interações mais fracas, do tipo van der Waals.

Tabela 3.1.4. Parâmetros de assimetria,  $p$ , e diferença relativa causada pela assimetria, em relação à hipótese de solutos esféricos, calculada usando as equações 3.1.11 e 3.1.12.

soluto	conformação	$p$	$[1 / x(p)]$
metil	estendida	1,7	1,03
	curvada	1,6	1,02
etil	estendida	1,9	1,04
	curvada	1,6	1,02
propil	estendida	2,1	1,05
	curvada	1,6	1,02
butil	estendida	2,3	1,06
	curvada	1,6	1,02
pentil	estendida	2,6	1,08
	curvada	1,6	1,02

Assim, é provável que a conformação adotada pelos parabens nas soluções aquosas e com as misturas água/etanol seja intermediária entre as totalmente estendida e curva. Como não temos outras informações que nos permitam determinar a sua conformação real, escolhemos usar a aproximação esférica, considerando que qualquer desvio devido a diferentes conformações pode ser negligenciado, baseados nos resultados expressos na Tabela 3.1.4.

A relação de Stokes-Einstein, equações [3.1.9] e [3.1.10], foi originalmente desenvolvida para a difusão de esferas macroscópicas em um fluido. Assim, devido à diferença de tamanho entre a partícula e as moléculas do solvente, este último pode ser considerado contínuo. Este procedimento vem sendo aplicado para difusão de macromoléculas<sup>138</sup> e agregados maiores, como micelas<sup>140</sup>. Entretanto, quando o soluto que difunde e o solvente têm

tamanhos similares, as considerações envolvidas na relação de Stokes-Einstein não são mais válidas. Esta falha foi verificada em alguns estudos de difusão <sup>141,142</sup>. Por isto, para este tipo de processo, outros procedimentos que estudam o processo de difusão sob o ponto de vista molecular foram propostos. Nestes casos, ao invés de atrito com um solvente contínuo, ocorrem colisões entre moléculas do soluto e do solvente, que são consideradas, por exemplo, nas teorias de esferas rígidas <sup>143</sup>.

Entretanto, muitos pesquisadores vêm aplicando a relação de Stokes-Einstein, preferida devido à sua simplicidade, para descrever a difusão de moléculas em líquidos. Em geral, estes resultados mostram que esta relação é válida, com os valores de  $C$  variando entre 4 e 6, conforme descrito pelas hipóteses de fluxo com e sem atrito entre o soluto e o solvente. Tominaga *et al.* <sup>105</sup> observaram que, para a difusão de benzeno, tolueno, etil e hexafluorbenzeno em água, os valores de  $C$  foram, respectivamente, 4,8, 5,3, 5,6 e 5,4. Naquele trabalho, os raios hidrodinâmicos foram obtidos a partir dos volumes de van der Waals calculados pelas contribuições atômicas.

Espinosa e De la Torre <sup>144</sup>, estudando a difusão de 33 compostos, de tamanhos variando do metano ao antraceno, em solventes não aquosos, verificaram que um valor médio de  $C = 4,74$  descrevia os resultados experimentais com desvios menores que 10%. Castillo e colaboradores determinaram que os coeficientes de difusão de fenol <sup>112</sup> e 2-butoxifenol <sup>111</sup>, em soluções aquosas bastante diluídas, podem ser relacionados aos seus raios de van der Waals usando a relação de Stokes-Einstein com valores de  $C$  aproximadamente iguais a 6. Outros, entretanto, utilizaram esta equação assumindo atrito nulo, ou seja,  $C = 4$ . Este procedimento foi aplicado para estudos de difusão de íons metálicos e ânions inorgânicos <sup>145</sup> e propanol <sup>146</sup> em água, e para a autodifusão de álcoois <sup>147</sup> e alcanos <sup>148</sup>.

Para verificar a validade desta equação, nós realizamos uma compilação de alguns resultados de estudos de difusão em solução.

Estes resultados são mostrados no Apêndice 1. Embora haja várias estimativas experimentais e teóricas utilizando procedimentos distintos, para os volumes de van der Waals dos compostos utilizados nestes estudos, optamos por padronizar estes valores determinando-os através das contribuições atômicas. As viscosidades dos solventes foram obtidas da literatura. Analisando-se os compostos listados nas tabelas do Apêndice 1, verifica-se que elas abrangem uma grande variedade de compostos, desde compostos polares e capazes de interagir com solventes por pontes de hidrogênio, até compostos apolares. Com isto, pretendemos verificar se existe um comportamento global, ou se cada tipo de composto tem um comportamento específico.

Para verificar a validade da relação de Stokes-Einstein graficamos os dados listados no Apêndice 1, de acordo com a equação

$$\frac{D \cdot \eta}{T} = \frac{k_B}{C \cdot \pi \cdot (3/4\pi)^{1/3}} \frac{1}{V^{1/3}} \quad [3.12]$$

Estes gráficos foram divididos de acordo com o tipo de solvente em água, solventes orgânicos apróticos e álcoois. Os resultados são mostrados, respectivamente, nas figuras 3.1.8 e 3.1.9.

Estas figuras mostram que a difusão destes compostos tem características diferentes de acordo com o tipo de solvente. A difusão em água, de acordo com os resultados obtidos, pode ser representada por

$$D \cdot \eta / T = 1,85 (\sigma = 0,12) \cdot 10^{-25} V^{-1/3} - 1,29 (\sigma = 0,25) \cdot 10^{-15}$$

$n = 60$ ;  $r = 0,895$ ;  $F = 232$ ;  $s = 0,225$  e  $C = 3,83$  ( $\sigma = 0,25$ )  
erro médio na predição = 6%

onde  $\sigma$  é o desvio padrão relativo a cada parâmetro da regressão,  $n$  é o número de dados,  $r$ , o coeficiente de correlação,  $F$ , o valor

para o teste F, s, o desvio padrão da regressão e C, a constante da equação de Stokes-Einstein. Nesta equação, os valores são expressos em unidades SI.

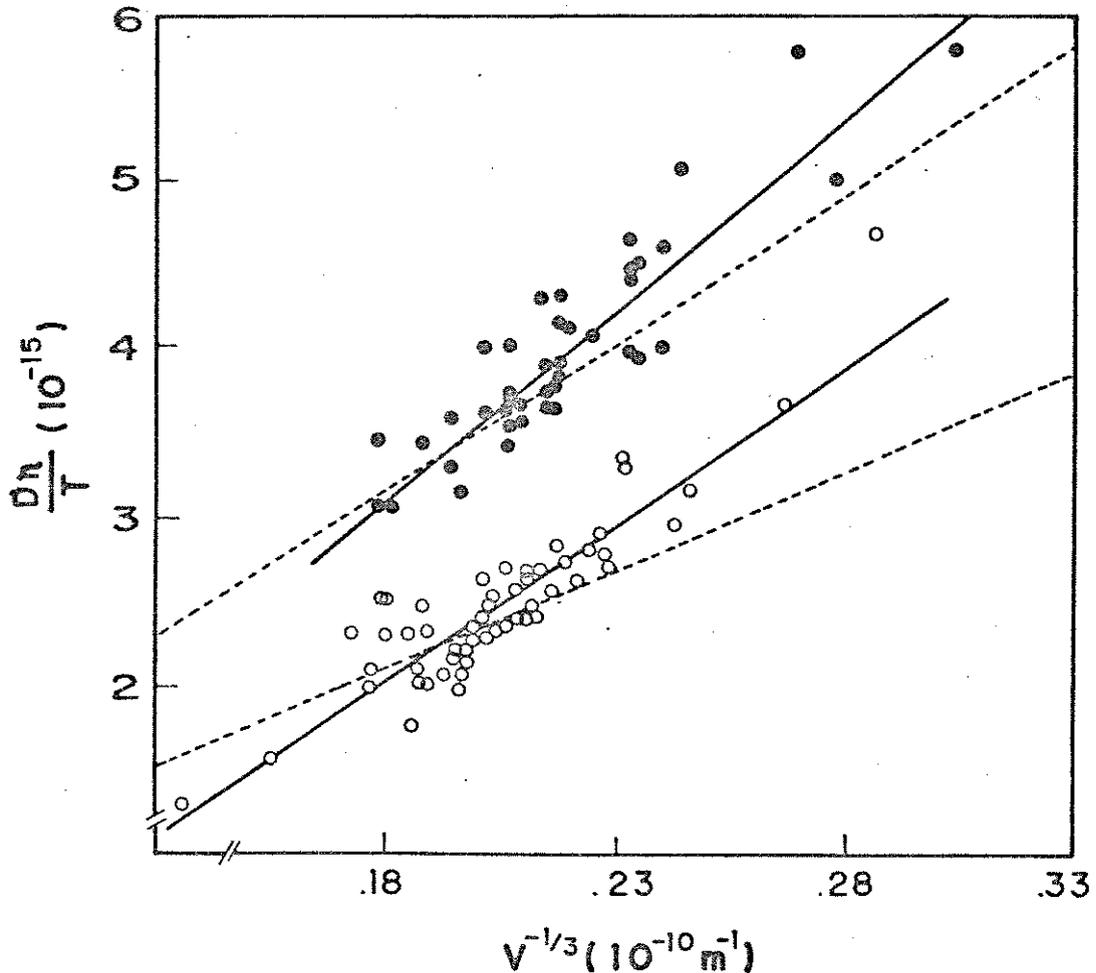


Figura 3.1.8. Aplicação da equação de Stokes-Einstein para a difusão em : O - água e ● - solventes orgânicos apróticos. Linhas pontilhadas, valores preditos com  $C = 4$  e  $C = 6$ . Linhas contínuas representam as melhores retas obtidas por regressão linear. Relação dos solutos utilizados apresentada no Apêndice 1.

Para o caso de difusão em solventes apróticos, o resultado é

$$D \cdot \eta / T = 2,31 (\sigma = 0,16) \cdot 10^{-25} V^{-1/3} - 1,05 (\sigma = 0,35) \cdot 10^{-15}$$

$n = 48$ ;  $r = 0,905$ ;  $F = 204$ ;  $s = 0,265$  e  $C = 3,07 (\sigma = 0,21)$   
 erro médio na predição = 5 %

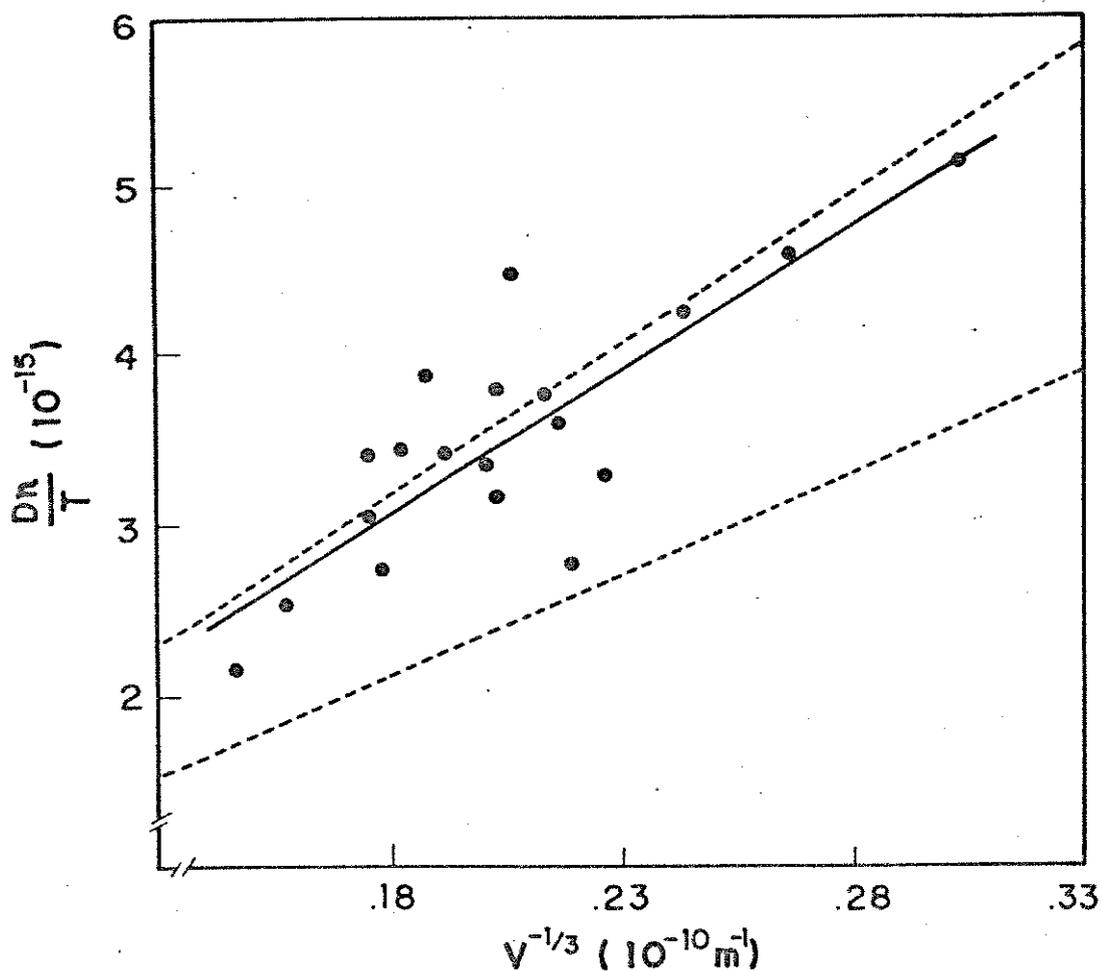


Figura 3.1.9. Aplicação da equação de Stokes-Einstein para a difusão em álcoois. Legenda idêntica à da figura 3.1.8.

Os resultados obtidos para a difusão em álcoois são

$$D \cdot \eta / T = 1,68 (\sigma = 0,23) \cdot 10^{-25} V^{-1/3} - 0,01 (\sigma = 0,30) \cdot 10^{-15}$$

$n = 20$ ;  $r = 0,875$ ;  $F = 56$ ;  $s = 0,378$  e  $C = 4,21 (\sigma = 0,58)$   
 erro médio na predição = 9 %

Considerando em conjunto os dados relativos à difusão em solventes apróticos e em álcoois, temos

$$D \cdot \eta / T = 2,08 (\sigma = 0,14) \cdot 10^{-25} V^{-1/3} - 0,63 (\sigma = 0,30) \cdot 10^{-15}$$

$n = 67$ ;  $r = 0,883$ ;  $F = 226$ ;  $s = 0,333$  e  $C = 3,40$  ( $\sigma = 0,23$ )  
erro médio na predição = 7 %

A análise das figuras 3.1.8 e 3.1.9 permite verificar que os coeficientes de difusão são bastante diferentes de acordo com a natureza do solvente. Analisando estes resultados em função dos intervalos de confiança obtidos a partir da regressão linear, figura 3.1.10, verifica-se que é possível, em um nível de 95% de confiança, separar os dados de difusão em água dos em solventes apróticos. Os dados obtidos para difusão em álcoois têm uma variância maior, mas a figura 3.1.11 mostra que, com níveis de confiança menores que 85%, é possível separar os dados relativos à difusão em água dos em álcoois.

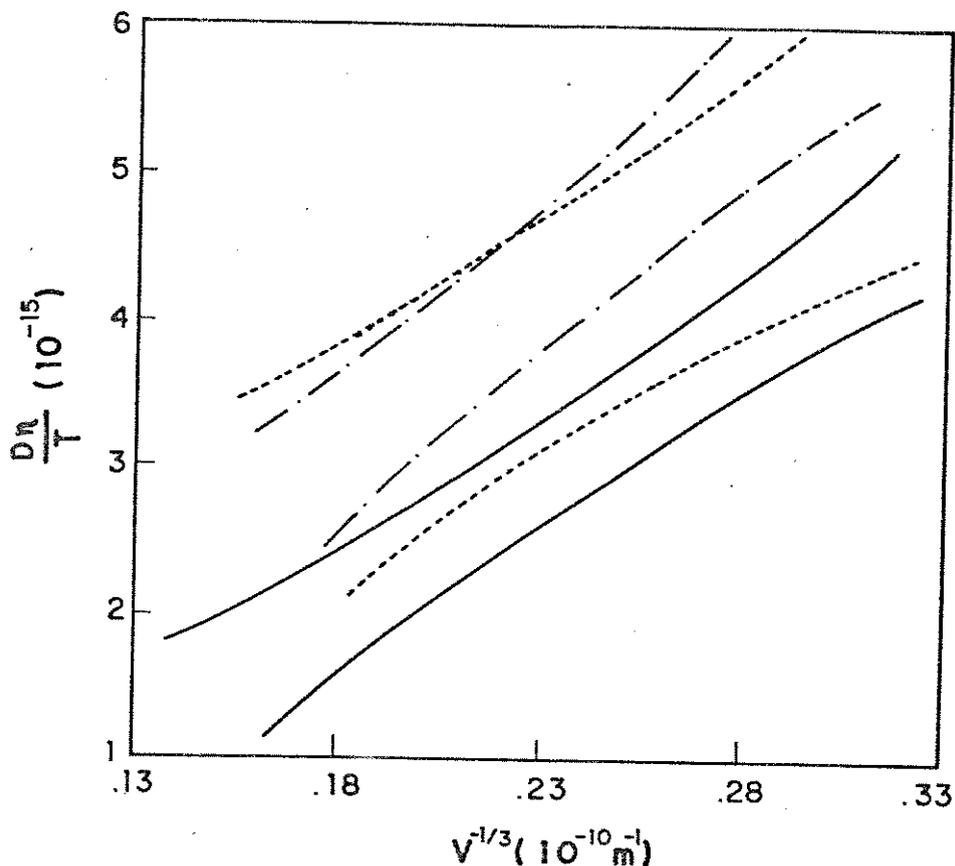


Figura 3.1.10. Intervalos de 95% de confiança para representação dos dados de difusão em : (—) água, (---) solventes apróticos e (-.-.-) álcoois.

Estes resultados mostram também que, a despeito de diferenças que poderiam advir de interações solvente-solvente e soluto-solvente, estes dados de difusão apresentam comportamento similar em álcoois e em solventes apróticos. Outra observação que pode ser feita a partir destes resultados, é a de que, ainda que as inclinações obtidas nas regressões lineares realizadas de acordo com a equação [3.12] levem a valores de  $C$  próximos dos previstos pela equação de Stokes-Einstein em condições de atrito nulo, os resultados obtidos para a difusão em água de compostos de dimensões entre os valores mais comumente encontrados localizam-se próximo dos valores preditos assumindo condições de atrito máximo.

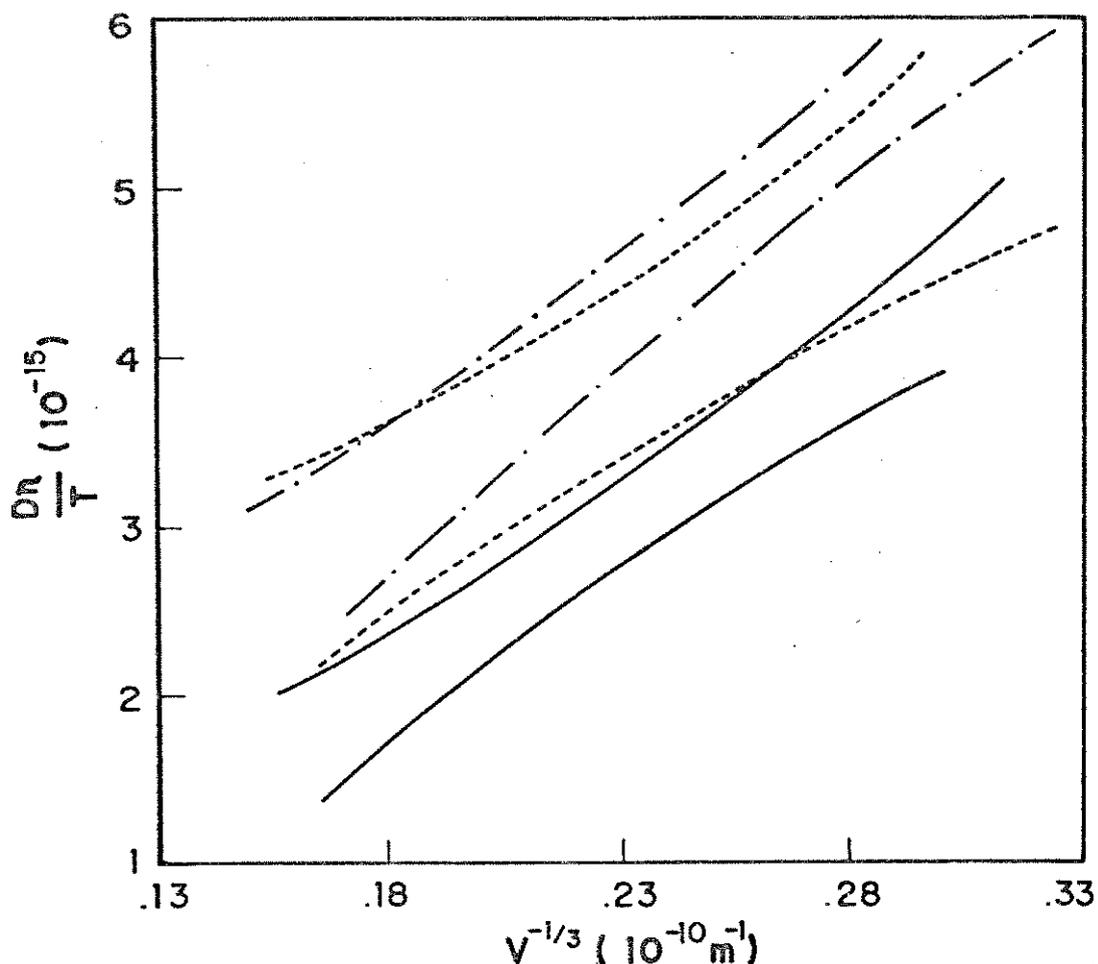


Figura 3.1.11. Intervalos de 85% de confiança para representação dos dados de difusão. Legenda idêntica à da figura 3.1.10.

A escolha dos solutos foi feita com o objetivo de evitar a possibilidade de formação de agregados, especialmente nos solventes apolares, e para fornecer um largo espectro de compostos polares e apolares, de modo a detectar qualquer influência resultante de interações soluto-solvente. Eastel e Woolf<sup>92</sup> atribuíram a tais interações as diferenças nas difusividades de solutos polares e apolares em acetonitrila, e para difusão em água, à capacidade de formação de pontes de hidrogênio. Por outro lado, Chan<sup>149</sup> não observou diferenças na difusão em acetona, etanol e tetradecano que pudessem ser atribuídas às massas ou momentos de dipolo dos solutos, mas apenas um pequeno efeito da forma destas moléculas.

De fato, os resultados mostrados nas figuras 3.1.8 e 3.1.9, não apresentam nenhuma diferença significativa causada por interações soluto-solvente, quando diferenciados de acordo com o tipo de solvente. As diferenças observadas para os dois tipos de solventes também não podem ser atribuídas a uma dependência dos coeficientes de difusão em função da viscosidade dos solventes diferente daquela proposta pela equação de Stokes-Einstein como já foi observado, uma vez que entre os solventes orgânicos utilizados representam uma larga faixa de viscosidades.

Assim, as diferenças detectadas pelos coeficientes de difusão devem ser decorrência da organização do solvente. Neste caso, a difusão em um solvente mais estruturado seria mais lenta, como se observa para as difusividades em água, em relação aos solventes orgânicos. Ainda que os álcoois tenham uma certa organização, devido à formação de pontes de hidrogênio, a difusão nestes solventes é similar à observada em solventes apróticos. Além disto, não foi verificada nenhuma diferença com a mudança na polaridade do solvente. Esta mesma diferença foi observada por Tominaga e colaboradores<sup>105-107</sup> comparando os coeficientes de difusão corrigidos para a viscosidade do solvente em água e em solventes orgânicos. Naquele caso, entretanto, a difusão mais lenta em água foi atribuída a um aumento na organização deste solvente causado pela interação com solutos hidrofóbicos, o que

não foi comprovado.

Os dados mostrados na figura 3.1.8 não apresentam nenhuma diferenciação devido à hidrofobicidade dos solutos, como seria esperado segundo esta hipótese. Estes resultados mostram, porém, que a viscosidade não é o único parâmetro do solvente que deve ser considerado para analisar a difusão, e que existem dois comportamentos distintos para soluções aquosas e de solventes orgânicos. Além disto, também indicam que a partir da estimativa dos volumes moleculares de um soluto obtida pelas contribuições atômicas, e utilizando uma relação simples como a de Stokes-Einstein, é possível estimar com boa precisão o coeficiente de difusão deste composto, contanto que a solução seja diferenciada entre aquosa e não aquosa.

Os raios hidrodinâmicos dos parabens foram estimados utilizando a equação de Stokes-Einstein com  $C = 6$ , e as viscosidades da mistura água/etanol da literatura <sup>150</sup>. Analisando-se os raios assim calculados, mostrados na Tabela 3.1.2, verifica-se uma pequena diminuição à medida em que aumenta o conteúdo de etanol no eluente. Esta diminuição deve ser interpretada com uma tendência, uma vez que sua magnitude é próxima do erro experimental associado aos coeficientes de difusão. Apesar das incertezas quanto à validade desta equação para a difusão molecular, estes valores têm sido usados para avaliar o número de moléculas que compõem a entidade que difunde em solução <sup>146</sup>.

Como a solubilidade dos parabens é maior em etanol que em água <sup>65</sup>, é esperada uma solvatação preferencial destes compostos pelas moléculas de etanol. De acordo com esta hipótese, a redução no raio hidrodinâmico indicaria a substituição das moléculas de água de solvatação, que estariam mais presas ao soluto, por moléculas de etanol, que não difundiriam com o paraben. Outra interpretação possível para os raios hidrodinâmicos é que estes reflitam a correlação entre os movimentos do soluto e do solvente <sup>146</sup>. Assim, esta redução no valor estimado para o raio

indica que, ainda que o etanol interaja preferencialmente com os parabens, em relação à água, este álcool tem um menor efeito sobre a difusão destes compostos.

Outra possibilidade é a de que os valores de  $C$  da equação de Stokes-Einstein diminuam do valor 6 em direção a 4. Isto ocorreria, de acordo com o que foi discutido anteriormente, se a adição de álcool diminuísse significativamente a estruturação do solvente. Se o valor de  $C$  fosse igual a 4, os raios hidrodinâmicos aumentariam 50%, e a adição de álcool na verdade estaria provocando um aumento do raio, contrariamente ao discutido anteriormente. Entretanto, as misturas água/etanol apresentam certas características que não confirmam a hipótese de desestruturação com o aumento na fração de álcool.

A viscosidade destas misturas, que representa o atrito entre camadas adjacentes do solvente, assume valores maiores que os dos líquidos puros<sup>150</sup>. Do mesmo modo, os volumes molares dos dois componentes e, conseqüentemente, o volume da mistura, diminuem em relação aos valores dos líquidos puros<sup>151</sup>. A variação de entalpia de mistura segue a mesma tendência, assumindo valores negativos, indicando uma forte interação entre os dois componentes<sup>152</sup>. Assim, pelo menos para as misturas com até 30% de etanol, em volume, não seria esperada uma diminuição na ordenação do solvente que pudesse modificar o valor de  $C$  a ser utilizado na equação de Stokes-Einstein. Como os raios hidrodinâmicos obtidos em etanol 95% obedecem a mesma tendência observada para os eluentes com menor quantidade de álcool, é razoável assumir que o comportamento descrito pela equação de Stokes-Einstein deve ser o mesmo.

Entretanto, conforme o que foi discutido em relação à validade da equação de Stokes-Einstein, as razões para os diferentes valores de  $C$  ainda não estão completamente entendidas, não sendo possível afirmar qual dos comportamentos acima descritos é mais correto.

### 3.2. Interação dos parabens com Micelas

#### 3.2.1. Incorporação de Solutos em Micelas

A interação de solutos com micelas tem sido estudada utilizando principalmente dois modelos: o modelo de ação das massas e o de pseudofase micelar.

O modelo de ação de massas considera que tanto a formação das micelas quanto a incorporação de solutos ocorre segundo um equilíbrio sucessivo de associação descrito pelas etapas



. . . . .



onde  $M_0, M_1, \dots, MS_n$  representam as micelas puras ou com  $n$  moléculas de soluto incorporadas,  $S_v$ , as moléculas de soluto na fase aquosa e  $K_i$ , as constantes de equilíbrio para cada etapa da associação, definidas por

$$K_i = \frac{[MS_i]}{[MS_{i-1}][S_v]} \quad [3.2.4]$$

O modelo de pseudofase analisa a incorporação do soluto na micela como um processo de transferência da fase aquosa para a fase micelar. Esta pseudofase, considerada contínua seria formada pela união de todas as micelas formadas. Segundo este modelo, podemos definir um coeficiente de partição como

$$K_{mv} = \frac{[S_m]}{[S_v]} \quad [3.2.5]$$

em que  $[S_m]$  e  $[S_v]$  representam as concentrações molares de soluto na micela e em água, definidas, respectivamente, em função dos volumes totais das fases micelar e aquosa. O coeficiente de partição também pode ser expresso em função das frações molares do soluto em ambas as fases, representado como  $K_x$ .

Outra maneira de quantificar este processo é através da constante de interação,  $K_s$ , definida como

$$K_s = \frac{[S_m]_T}{[S_v] D_m} \quad [3.2.6]$$

onde  $D_m$  é a concentração de surfatante micelizado, calculado subtraindo-se a c.m.c da concentração total, e  $[S_m]_T$  é a concentração de soluto na fase micelar expressa em função do volume total de solução. Estas constantes estão inter-relacionadas através de <sup>153</sup>

$$K_{mv} = \frac{K_s}{V_{m,D}} = \frac{K_x}{V_{m,D} \times 55,5} \quad [3.2.7]$$

onde  $V_{m,D}$  é o volume molar do surfatante micelizado.

A distribuição dos solutos entre as fases micelar e aquosa tem sido descrita com sucesso utilizando a distribuição de Poisson <sup>154</sup>. De acordo com este modelo, assume-se que as propriedades da micela não mudam com a incorporação do soluto, ou seja, as etapas descritas pelas equações [3.2.1] a [3.2.3] ocorrem com a mesma probabilidade, e que a capacidade de solubilização nas micelas é infinita. De acordo com estas características, verifica-se que este modelo deve ser adequado para baixos números de ocupação por micela.

Assim, a probabilidade de que uma micela contenha  $i$  moléculas de soluto, que corresponde à fração de micelas com este número de ocupação, pode ser estimada por

$$P_i = \frac{\langle n \rangle^i}{i!} \exp - \langle n \rangle \quad [3.2.8]$$

A variação do potencial químico de uma molécula do soluto ao ser transferida da fase aquosa para a fase micelar, à pressão padrão, pode ser obtida por

$$\mu_i^\circ (\text{micela}, T) - \mu_i^\circ (\text{aq}, T) = RT \ln \frac{(a_i, \text{mic})}{(a_i, \text{aq})} \quad [3.2.9]$$

Esta diferença é igual à variação molar da energia livre do soluto com a transferência, embora haja críticas para a aplicação deste procedimento a processos de transferência do soluto de um solvente para outro <sup>155</sup>. No caso de moléculas neutras, o coeficiente de atividade na fase aquosa pode ser assumido como unitário, sendo o mesmo normalmente aplicado para solutos iônicos. Existem algumas tentativas <sup>156</sup> de aplicar teorias como a de soluções regulares para estimativa do coeficiente de atividade do soluto na fase micelar. Usualmente, porém, este coeficiente também é considerado unitário.

Assim, a atividade do solutos em ambas as fases pode ser estimada determinando-se a sua concentração ou fração molar. Neste sentido existem controvérsias sobre qual a melhor forma de se expressar a atividade do soluto em uma das fases. Ben-Naim <sup>157</sup> sugere a utilização da concentração molar justificando que esta é a grandeza que melhor reflete a variação local das propriedades termodinâmicas do soluto. Para o caso de micelas, ambos os procedimentos têm sido adotados <sup>153,158</sup>. Nesta tese, expressaremos as variações de energia livre para a transferência em função dos coeficientes de partição calculados utilizando as concentrações molares do soluto nas duas fases, segundo a equação

$$\Delta G = - R . T . \ln K_{mv} \quad [3.2.10]$$

### 3.2.2. Determinação dos Coeficientes de Partição dos Parabens em Micelas de CTAB

O coeficiente de partição dos parabens foi determinado a partir de medidas da variação da absorbância dos parabens com o aumento na concentração de surfatante. Genericamente, quando uma propriedade P do sistema, referente ao soluto ou ao surfatante, varia com a incorporação do soluto na micela, podemos assumir que esta variação seja proporcional à concentração de soluto incorporado. Assim,

$$\Delta P = k \cdot [S_m] \quad [3.2.11]$$

onde k é a constante de proporcionalidade. Supondo que esta proporcionalidade se mantenha para o caso limite em que todo o soluto está incorporado na fase micelar, o que pode ser aceito para casos de baixo número de ocupação nas micelas, temos

$$\Delta P_{\infty} = k \cdot [S_m]_{\infty} \quad [3.2.12]$$

ou

$$\Delta P_{\infty} = k \cdot [S_t] \quad [3.2.13]$$

onde  $\Delta P_{\infty}$  é a variação máxima da propriedade P com a incorporação do soluto e  $[S_t]$  é a concentração total do soluto. Como

$$[S_v] = [S_t] - [S_m]_T \quad [3.2.14]$$

podemos combinar as equações [3.2.11], [3.2.13] e [3.2.14] em [3.2.6], que rearranjada leva a

$$\Delta P = \frac{K_{mv} \cdot D_m \cdot \Delta P_{\infty}}{K_{mv} \cdot D_m + V_{m,D}} \quad [3.2.15]$$

Esta equação, semelhante às propostas por Michaelis-Menten para cinética enzimática e por Langmuir para adsorção, pode ser rearranjada para permitir a determinação de  $K_{mv}$  através de medidas

de  $\Delta P$  com a variação na concentração de surfatante micelizado,  $D_m$ ,

$$\frac{D_m}{\Delta P} = \frac{D_m}{\Delta P \omega} + \frac{V_{m,D}}{K_{mv} \cdot \Delta P \omega} \quad [3.2.16]$$

Utilizando os valores de coeficientes de partição obtidos e a distribuição de Poisson, segundo a equação [3.2.8], temos que, na faixa de concentrações de soluto e de surfatante utilizadas, cerca de 40 % das micelas encontram-se desocupadas, 40 % têm apenas uma molécula de soluto e os restante 20 % podem conter mais de uma molécula por micela. Assim, o coeficiente de partição,  $K_{mv}$ , obtido por este método pode ser considerado um valor médio para as diversas situações descritas nas equações [3.2.1] a [3.2.3], de acordo com as suposições do modelo de pseudofase.

No caso dos parabens, foram realizadas medidas de variação da absorbância em 274 nm, para a espécie neutra, e em 310 nm, para a espécie aniônica, conforme mostra a figura 3.2.1. Embora estes não sejam os comprimentos de onda de absorção máxima destes compostos, eles foram escolhidos por apresentarem a maior variação de absorbância com a incorporação.

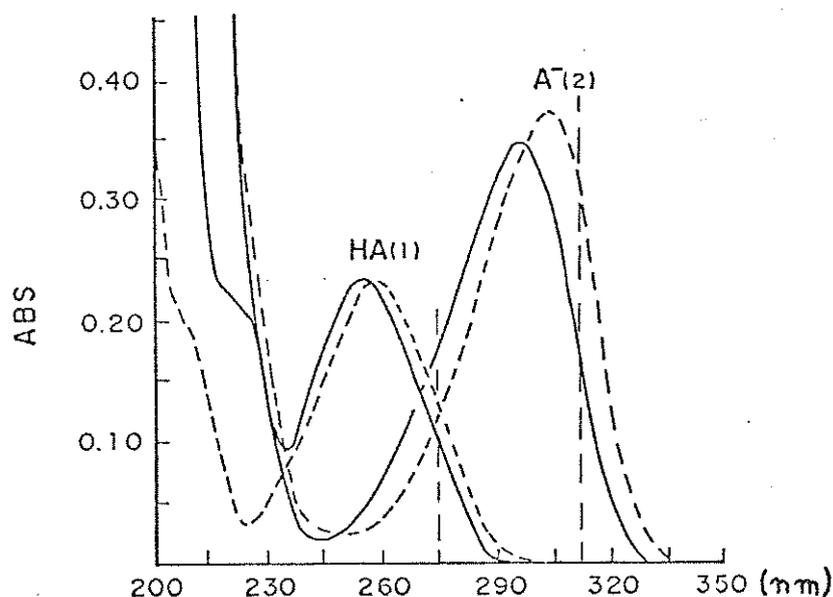


Figura 3.2.1. Espectro de absorção de propilparaben,  $1,5 \times 10^{-5}$  M, neutro, com HCl 5 mM e aniônico, com NaOH 5 mM. Em solução aquosa (—) e com CTAB 3 mM (---).

Para garantir que as variações medidas eram devidas a apenas uma das espécies, neutra ou aniônica, estas medidas foram realizadas em solução de HCl 5 mM e NaOH 5 mM, respectivamente. Os ânions cloreto e hidroxila apresentam uma interação fraca com a superfície do CTAB<sup>159</sup>, de modo que os resultados não devem diferir dos que seriam obtidos em água. Quando o CTAB foi adicionado, acima da c.m.c., a uma solução aquosa de paraben, sem controle de pH, observou-se o aparecimento da banda de absorção da espécie ionizada.

Alguns dos resultados obtidos, representando a variação da absorbância dos solutos com a concentração de surfatante micelizado, respectivamente, segundo as equações [3.2.15] e [3.2.16], são mostrados na figura 3.2.2. O bom ajuste obtido com os resultados experimentais de acordo com a equação [3.2.16], comprova a validade das hipóteses envolvidas neste método, descritas anteriormente.

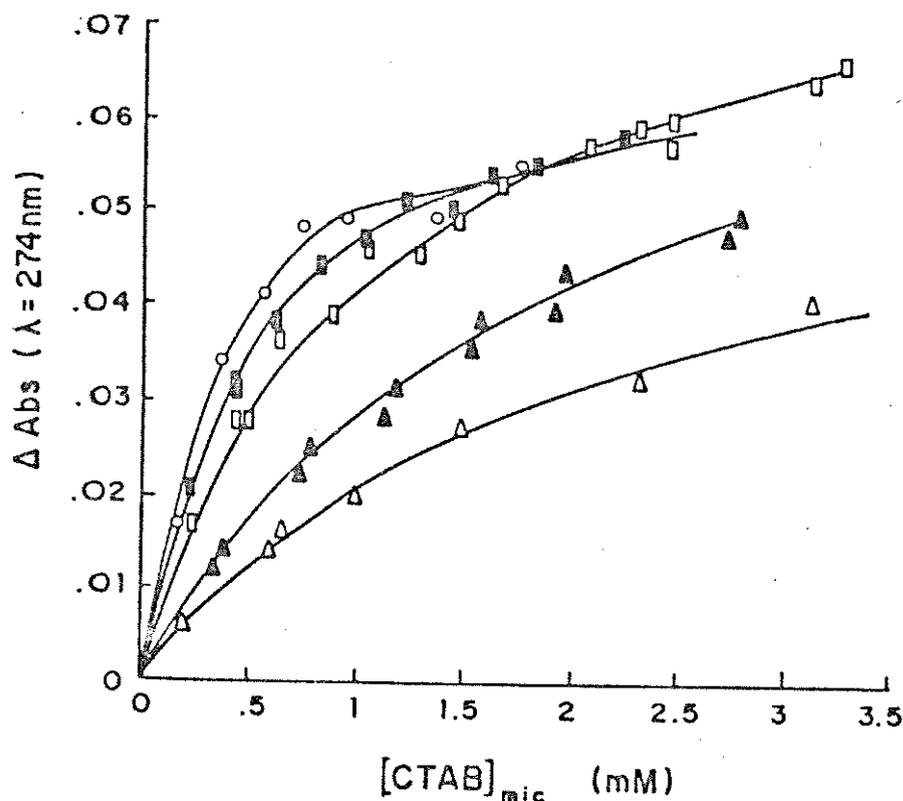


Figura 3.2.2. Variação da absorbância dos parabens em 274 nm em função da concentração de CTAB micelizado, a 25°C.

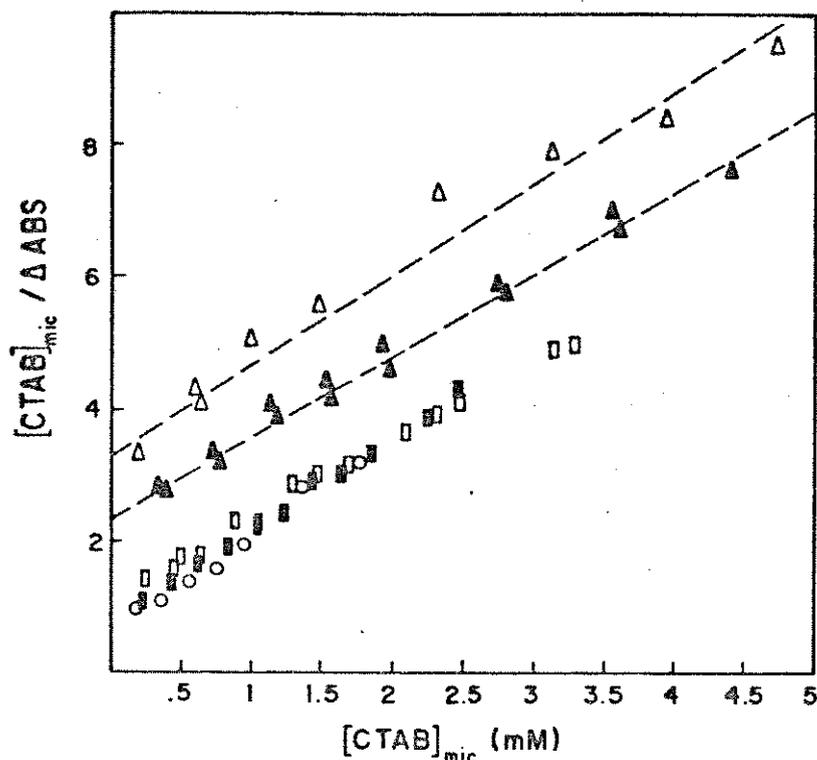


Figura 3.2.3. Linearização dos resultados mostrados na figura 3.2.2 de acordo com a equação [3.2.16]

Os resultados obtidos para a partição das espécies neutra e aniônica, a 15, 25 e 35° C e dados da literatura para os parabens neutros, a 25° C, são mostrados na Tabela 3.2.1. O volume molar do CTAB micelizado utilizado foi  $V_{m,D} = 0.364 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  160. Os desvios-padrão associados à determinação da constante de interação,  $K_s$ , e, conseqüentemente, de  $K_{mv}$ , foram menores que 10 %, levando a variações menores que 3 % nos valores de  $\Delta G$ . Os valores obtidos para o coeficiente de partição para a espécie aniônica do pentilparaben não se mostraram reprodutíveis devido à grande incorporação do soluto na micela. Para o pentilparaben, os valores obtidos foram pouco reprodutíveis, provavelmente devido à sua grande incorporação nas micelas. Por isto, o valor listado na Tabela 3.2.1. é o obtido por extrapolação supondo uma dependência

linear de  $\ln K_{mv}$  com o número de átomos de carbono na cadeia alifática.

Tabela 3.2.1. Coeficientes de partição,  $K_{mv}$ , para as espécies aniônica e neutra dos parabens entre água e micelas de CTAB

homólogo	$K^a$ , 15°C	$K^b$ , 25°C	$K^c$ , 35°C	$K^d$ , 25°C	$K_A^-$ , e, 25°C
metil	1180	1050	960	885	7370
etil	1950	1580	1390	1687	12250
propil	4140	2860	2570	4398	17600
butil	6010	5170	4650	12225	26950
pentil	8090	7210	5700	--	41770

a, b e c) coeficientes de partição para a espécie neutra dos parabens, medidos pela equação [3.2.16], d) valores medidos por Shimizu e Iwatsuru<sup>82</sup>, e) coeficientes de partição medidos para os parabens ionizados (para o pentilparaben, calculado por extrapolação)

Comparando-se os coeficientes de partição por nós obtidos com os relatados por Shimizu e Iwatsuru<sup>82</sup>, vemos que há uma diferença que aumenta para os últimos compostos da série. Estes autores mediram  $K_{mv}$  através do deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima dos parabens com a incorporação na micela. Entretanto, aqueles autores não fazem menção de controle de pH durante os seus experimentos, indicando a possibilidade de ionização dos parabens devido à interação com as micelas de CTAB, conforme discutido anteriormente.

O aparecimento da banda de absorção relativa à espécie aniônica,  $\lambda_{max} = 302 \text{ nm}$ , causaria um  $\Delta\lambda_{max}$  maior do que o provocado pela simples incorporação do soluto na micela. Como a ionização causada pelas micelas de CTAB aumenta com a hidrofobicidade do soluto, conforme será discutido na próxima seção, este erro aumentaria ao longo da série, o que explicaria a

divergência dos resultados. Os valores obtidos por aqueles autores, através do mesmo método, para a partição dos parabens em micelas de SDS, em que não existe o problema da ionização dos solutos, são concordantes com os descritos por Goto e Endo <sup>78</sup> obtidos pela técnica de filtração em gel. O método de acompanhamento de  $\Delta\lambda_{max}$  com a incorporação do soluto também foi aplicado para a partição de m-alcoxifenóis em micelas de CTAB <sup>161</sup> e os resultados obtidos concordaram com os determinados através da variação dos coeficientes de difusão dos solutos. Assim, a diferença entre os nossos e os resultados de Shimizu e Iwatsuru pode ser atribuída à falta de controle de pH mais do que a deficiências nos métodos empregados.

Abu-Hamdiyyah <sup>162</sup> relatou um valor de  $K_{mv}$  de 662 para o etilparaben obtido através de medidas da variação da c.m.c. do CTAB com a incorporação do soluto. Este valor é menor que o por nós obtido,  $K_{mv} = 1580$ . Outros valores relatados no mesmo trabalho para fenol,  $K_{mv} = 41$ , e p-etilfenol,  $K_{mv} = 603$ , são menores do que os descritos por Bunton e Sepúlveda <sup>161</sup>, respectivamente 723 e 2180, também obtidos através de medidas da variação da absorbância do soluto. Isto indica que o método utilizado por Abu-Hamdiyyah pode levar a coeficientes de partição menores que os determinados por outros métodos.

Por outro lado, os coeficientes de partição por nós obtidos são bastante próximos dos descritos por Sepúlveda e colaboradores para a partição de compostos similares aos parabens, como os p-alquilfenóis <sup>161</sup> e os ácidos p-alquilbenzóicos <sup>163</sup>, em micelas de CTAB.

Através da análise dos resultados listados na Tabela 3.2.1, observa-se que o aumento da temperatura produz uma tendência de diminuição nos valores dos coeficientes de partição. Esta variação é discutida apenas como tendência porque ela é comparativamente menor que a variação devida ao erros experimentais. Entretanto, este comportamento associado a valores de  $\Delta H$  pequenos e negativos, representado por uma pequena redução na constante de equilíbrio

com o aumento da temperatura é uma característica comum a processos de transferência de solutos da água para uma fase apolar, tendo sido observado, por exemplo, para a partição de fenol e hidrocarbonetos aromáticos em micelas de SDS <sup>164</sup>.

A partir da variação da temperatura é possível, utilizando a relação de van't Hoff, calcular a variação de entalpia para o processo de transferência dos parabens da água para as micelas de CTAB. Entretanto, conforme salientado por Beezer e colaboradores <sup>165</sup>, o erro experimental associado à determinação de  $K_{mw}$  aumenta consideravelmente a incerteza nos valores de  $\Delta H$  obtidos indiretamente. Por este motivo, as medidas calorimétricas de  $\Delta H$  são sempre preferidas. Além disto, conforme discutido anteriormente, os valores de  $\Delta H$  nesta faixa de temperaturas são geralmente pequenos. Apesar destas ressalvas, utilizamos os coeficientes de partição a 15, 25 e 35°C para obter uma estimativa de  $\Delta H$ . Os valores obtidos foram : -7,6, -12,8, -18,1, -9,8 e -13,2 kJ.mol<sup>-1</sup>, para metil, etil, propil, butil e pentilparaben, respectivamente.

Existem poucas determinações calorimétricas de  $\Delta H$  para compostos similares. Um destes estudos é o de Larsen e Magid <sup>166</sup>, que obtiveram, para os ácidos o-nitro, o-cloro, o-amino, p-amino, o-hidróxi e p-hidróxibenzóico, os respectivos valores : -9,57, -9,28, -21,3, -7,44, -25,9 e -38,7. Comparando com a faixa de valores obtidos para os parabens, observa-se que os  $\Delta H$  dos ácidos o-amino, orto e p-hidróxibenzóico são bem maiores. Esta diferença pode ser atribuída à transição de fase de micelas de CATB esféricas para cilíndricas, que foi observada em soluções de CTAB com os dois primeiros compostos <sup>167</sup>.

Estes efeitos da temperatura sobre processos em solução aquosa estão relacionados principalmente à estrutura do solvente. A água no estado líquido apresenta uma estrutura única em termos de ordenamento devido à possibilidade de um arranjo geométrico das moléculas levando à formação de pontes de hidrogênio muito estáveis <sup>168</sup>. Estudos sobre processos em solução aquosa como

solubilidade de compostos apolares, estabilidade de proteínas <sup>169</sup> e formação de micelas <sup>170</sup> indicam que, próximo da temperatura ambiente, há uma pequena redução na variação de energia livre destes processos com o aumento da temperatura.

Nesta faixa de temperatura estes processos são governados pela variação de entropia causada pela diminuição na perturbação das moléculas de água devido à interação com solutos hidrofóbicos. Com a transferência destes solutos para outras fases, as moléculas do solvente, mais estruturadas devido à interação com o soluto hidrofóbico, são liberadas causando um grande aumento da entropia global do sistema. Isto é a causa do chamado efeito hidrofóbico, em que se observa uma tendência de favorecimento de processos que envolvam a diminuição dos contatos entre a água e porções hidrofóbicas de um soluto. A temperaturas maiores, a estrutura do solvente torna-se menos ordenada e existe um aumento da contribuição entálpica envolvida nestes processos, dando origem à chamada interação hidrofóbica <sup>169</sup>.

### 3.2.3. Análise das Variações de Energia Livre de Transferência Através das Contribuições de Grupos

Uma das maneiras utilizadas para analisar a variação de energia livre associada a um processo químico é aplicando o princípio da aditividade. De acordo com este princípio, assume-se que as contribuições de partes da molécula para as funções termodinâmicas do processo são independentes e aditivas. A aplicação deste procedimento permite a análise do processo de acordo com as contribuições individuais das várias interações específicas envolvidas.

Um exemplo antigo de aplicação deste método foi a constatação relatada por Langmuir <sup>171</sup> de que a transferência de série homólogas de compostos orgânicos da fase aquosa para a interface solução/ar envolvia uma variação constante de energia por grupo

metileno, que dependia do tipo de composto estudado. Este princípio foi também aplicado por Cratin<sup>172</sup> para a partição de surfatantes não iônicos entre água e uma fase apolar. Naquele trabalho, Cratin observou que a variação de energia livre do processo podia ser dividida em uma contribuição devida aos grupos hidrofílicos e outra devida aos grupo hidrofóbicos. Outro exemplo de aplicação deste esquema foi relatado por Beezer e colaboradores, que aplicaram este tipo de procedimento para interpretar as funções termodinâmicas para a transferência de m-alcoxifenóis de água para solventes apolares<sup>15</sup> e para analisar a atividade bactericida de alguns fenóis.<sup>55</sup>

Aplicando este procedimento ao processo de transferência dos parabens para micelas, temos que a variação de energia livre pode ser decomposta em uma contribuição hidrofóbica, representada pelos grupos metileno da cadeia hidrocarbônica, uma contribuição relativa à estrutura base, devida ao anel benzênico e seus substituintes, e outra eletrostática, para o caso de solutos e micelas iônicos. Assim, temos

$$\Delta tG = \Delta tG_B + n \cdot \Delta tG_H + \Delta tG_E \quad [3.2.17]$$

onde os índices B, H e E representam, respectivamente, as contribuições da estrutura base, hidrofóbica e eletrostática, e n é o número de átomos de carbono na cadeia alifática.

A equação [3.2.17] tem sido aplicada a diversos processos de interação, comprovando a possibilidade de separação das contribuições individuais de grupos das moléculas. A Tabela 3.2.2 mostra a aplicação desta equação para processos de partição de compostos aromáticos entre a fase aquosa e solventes orgânicos e micelas.

A contribuição da estrutura base reflete a afinidade pela fase apolar, em relação à fase aquosa. No caso dos compostos listados na Tabela 3.2.2, todas contêm um anel aromático e substituintes hidrofílicos. De maneira geral, a afinidade das

Tabela 3.2.2. Contribuições para energia livre de transferência de compostos aromáticos de água para solventes apolares e micelas. Valores obtidos a 25°C e expressos em  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

compostos	sistema	$\Delta tG_B$	$\Delta tG_H$	$\Delta tG_E$	ref.
parabens	H <sub>2</sub> O/octanol	- 8,04	- 3,08	--	16
	H <sub>2</sub> O/ CTAB	-15,79	- 1,28	- 5,30	tese
	H <sub>2</sub> O/ SDS	-12,14	- 2,02	--	78
m-alcoxi- fenóis	H <sub>2</sub> O/octanol	- 4,37	- 2,96	--	15
	H <sub>2</sub> O/ CTAB	-10,38	- 2,64	--	24
	H <sub>2</sub> O/heptano	8,13	- 3,07	--	15
p-alquil- fenóis	H <sub>2</sub> O/octanol	0,0	- 3,28	--	16
	H <sub>2</sub> O/heptano	5,21	- 3,26	--	163
	H <sub>2</sub> O/ CTAB	-16,38	- 1,34	- 5,02	161
	H <sub>2</sub> O/ SDS	-12,92	- 1,51	--	163
	H <sub>2</sub> O/ CPC	-13,63	- 2,33	--	173
ácidos p-al- quilbenzói- cos	H <sub>2</sub> O/heptano	4,29	- 3,76	--	163
	H <sub>2</sub> O/ CTAB	-17,63	- 1,42	- 4,18	163
	H <sub>2</sub> O/ SDS	-16,05	- 1,21	--	163
p-alquil- anilinas	H <sub>2</sub> O/ CTAB	-14,29	- 1,13	--	163
	H <sub>2</sub> O/ SDS	-12,61	- 1,63	- 5,02	163
	H <sub>2</sub> O/ CPC	-11,19	- 1,72	--	173
p-alquilben- zaldeídos	H <sub>2</sub> O/ CPC	-10,49	- 2,76	--	173
p-nitrofe- nilalquil- carboxilatos	H <sub>2</sub> O/ CTAB	- 6,76	- 2,63	--	175

\* CPC - cloreto de hexadecilpiridínio

estruturas base dos compostos da Tabela 3.2.2 pelas fases hidrofóbicas segue a ordem

CTAB > CPC  $\cong$  SDS > octanol > heptano.

O heptano é bastante apolar e, mesmo em condições de saturação, possui uma pequena quantidade de moléculas de água solubilizadas. Estudos com m-alcoxifenóis <sup>176</sup> mostraram que a estrutura base contribui para a transferência com um aumento de entropia,  $\Delta S_{tr} = 51,6 \text{ J.K}^{-1}$ , atribuído à dessolvatação que acompanha a solubilização na fase apolar. A contribuição entálpica, entretanto, é desfavorável,  $\Delta H_{tr} = 23,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . O octanol, por outro lado, é capaz de solubilizar até  $2,2 \text{ mol.l}^{-1}$  de água, de modo que com a transferência, a estrutura base do soluto pode manter sua camada de hidratação. Além disto, existe a possibilidade de interação dos m-alcoxifenóis com o octanol através de pontes de hidrogênio que, junto com interações tipo van der Waals favoráveis levam a uma variação de entalpia negativa.

No caso das micelas, a interação com o soluto é mais forte do que com os solventes apolares. Vários estudos mostraram que existe uma razoável penetração de moléculas de água na estrutura micelar <sup>176,177</sup>. Além disto, estudos com sondas solvatocrômicas <sup>41</sup> indicaram que a região de solubilização de compostos semelhantes aos descritos na Tabela 3.2.2 apresenta uma constante dielétrica efetiva em torno de 32 para o CTAB. Este valor é maior do que a constantes dielétricas do heptano ( $\epsilon \cong 2$ ) e octanol ( $\epsilon \cong 10$ ) <sup>150</sup>, e equivale a um solvente com características próximas ao etanol ( $\epsilon = 27$ ).

Além da questão da polaridade da estrutura base e do solvente apolar, existem evidências de interações específicas entre compostos semelhantes e micelas de SDS e CTAB. Goto e Endo <sup>74</sup> verificaram que os parabens formam pontes de hidrogênio com os grupos sulfato de micelas de SDS. No caso de micelas catiônicas, estudos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C <sup>178</sup> e de fluorescência <sup>179,180</sup> indicaram a existência de uma interação entre o anel aromático e os grupos amônio quaternário dos surfatantes. O fato de que os

valores de  $\Delta G_b$  são maiores para CTAB do que para SDS indica que, das interações descritas acima, a maior é a com o surfatante catiônico.

Através da análise dos efeitos do anel aromático de p-alkilfenóis sobre os deslocamentos químicos dos prótons do CTAB <sup>181</sup> foi confirmada a proximidade e a existência de uma interação entre o anel e o grupo iônico do surfatante. Estes mesmos estudos mostraram que não foi possível determinar diferenças na localização do soluto na micela em função do aumento da cadeia hidrofóbica, nem com a ionização do soluto. Entretanto, outro estudo de RMN <sup>182</sup> sobre a localização do naftol ionizado em micelas de brometo de tetradeciltrimetilamônio propõe que os anéis estejam localizados mais próximos dos grupos metileno mais externos do surfatante. Segundo este estudo, a interação do cátion amônio com o oxigênio negativo prevalece sobre a com o anéis benzênicos. Portanto, no caso de solutos aromáticos não ionizados, parece razoável assumir que o anel permaneça próximo da superfície micelar.

Embora a natureza desta interação ainda não esteja esclarecida, devem predominar interações do tipo carga, do cátion amônio, - dipolo, representado pelo anel aromático e seus substituintes. Assim, supondo que o número de grupos ionizados do surfatante não varie significativamente para cada tipo de soluto, uma maneira de analisar esta interação é através da estimativa da carga sobre a estrutura base. A carga sobre os fragmentos da molécula foi estimada a partir da soma das cargas atômicas líquidas de Mulliken <sup>183</sup> calculadas utilizando o método semi-empírico AM1 <sup>184</sup>. Este procedimento tem sido largamente aplicado quando se deseja estimar a densidade de carga negativa sobre determinado átomo ou grupo da molécula.

Como os grupos substituintes presentes nos compostos aromáticos listados na Tabela 3.2.2 são bastante diferentes entre si, torna-se difícil comparar a densidade de carga sobre as várias estruturas base. Por este motivo, resolvemos padronizar

esta medida utilizando apenas a carga negativa sobre o anel aromático. O papel dos substituintes seria avaliado, portanto, de modo indireto, através de seu efeito sobre o anel.

Outra maneira de analisar a interação entre os compostos aromáticos e os cátions amônio é segundo a teoria de ácidos e bases de Lewis. De acordo com esta teoria, os compostos aromáticos agem com bases, doadores de elétrons, e os cátions amônio, como ácidos, deficientes em elétrons. Uma base forte apresenta um orbital de fronteira ocupado (HOMO - "Highest Occupied Molecular Orbital") com alta energia de modo que a interação com o orbital desocupado do ácido (LUMO - "Lowest Unoccupied Molecular Orbital") resulte em um ganho líquido de energia para o sistema <sup>185</sup>.

Ainda utilizando a teoria de ácidos e bases de Lewis, podemos analisar a interação segundo o conceito de dureza e moleza dos ácidos e bases, enunciado por Pearson <sup>186</sup>. Neste sentido, os resultados obtidos por Sepúlveda e colaboradores <sup>187</sup> para a interação de ânions com micelas de cetiltrimetilamônio mostram que a ordem na intensidade para interação segue a sequência de moleza dos ânions. Assim, isto indica que estes cátions têm comportamento de ácidos moles. Para avaliar a moleza de um composto, Parr e Pearson <sup>188</sup> propuseram a utilização de um índice baseado na diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO. Segundo esta proposta, o índice de moleza, S, pode ser calculado como

$$S = 2 (\epsilon_{\text{HOMO}} - \epsilon_{\text{LUMO}})^{-1} \quad [3.2.18]$$

onde o símbolo  $\epsilon$  representa a energia de cada orbital.

Um procedimento semelhante foi recentemente aplicado para interpretar valores de variação de energia livre de interação de compostos aromáticos com eletrodos de mercúrio <sup>189</sup>. Neste caso, o mercúrio tem comportamento de um ácido de Lewis mole. Em concordância com a teoria de Pearson, foi observado que, após uma correção das variações de energia livre associadas à adsorção sobre o eletrodo devido unicamente a fatores hidrofóbicos,

obtinha-se uma variação de energia livre atribuída à interação do composto aromático com o mercúrio metálico que apresentava uma boa correlação com o parâmetro de moleza, S, descrito acima.

A Tabela 3.3.3 mostra os valores obtidos para as várias propriedades, calculados para os menores homólogos de cada uma das séries listadas na Tabela 3.2.2. As cargas atômicas foram calculadas utilizando o program semi-empírico AM1. As energias dos orbitais de fronteira foram obtidas através do método HAM/3<sup>190</sup>, a partir das geometrias otimizadas pelo AM1. A utilização das hipóteses descritas acima não levou a nenhuma correlação significativa entre as propriedades calculadas e a variação de energia livre associada à interação da estrutura base destes compostos com as micelas de CTAB. Também foram testadas regressões múltiplas de  $\Delta G_b$  contra mais de uma das propriedades calculadas, mas em nenhuma das tentativas foram obtidas correlações significativas.

Tabela 3.3.3. Parâmetros teóricos calculados para os menores compostos de séries homólogas de solutos aromáticos

composto	$\epsilon(\text{HOMO})$	$\epsilon(\text{LUMO})$	S	carga
metilparaben	- 8,968	- 0,496	- 0,236	- 0,519
m-metóxi-fenol	- 8,495	1,022	- 0,210	- 0,512
p-metilfenol	- 8,390	1,162	- 0,209	- 0,584
ác. metilbenzóico	- 9,504	- 0,645	- 0,226	- 0,586
p-metilanilina	- 8,027	1,181	- 0,217	- 0,623
tolueno	- 9,236	1,043	- 0,195	- 0,720
metilbenzaldeído	- 9,070	- 0,919	- 0,245	- 0,622
nitrofenilformiato	- 9,726	- 1,576	- 0,245	- 0,445

Estes resultados negativos podem ser interpretados como um indicativo de que o modelo proposto é muito simples e não leva em consideração todos os aspectos envolvidos na interação. Entre as principais causas para a falha dos modelos propostos deve estar o efeito dos diferentes grupos sobre a localização do soluto na micela e suas interações individuais com o surfatante. Além dos diferentes tipos de substituintes, a Tabela 3.2.2 apresenta também compostos mono e dissustituídos e em diferentes posições relativas, meta e para. Como a interação depende da distância entre o anel e os grupos polares do surfatante, sua intensidade deve ser bastante dependente da localização do soluto. Além de influenciar na localização dos solutos, os substituintes podem, separadamente, interagir com o surfatante, especialmente no caso de substituintes com alta densidade eletrônica como carbonila, carboxilas e grupos nitro.

A contribuição hidrofóbica para a variação de energia livre do processo de transferência de fase,  $\Delta G_H$ , pode ser interpretada como o trabalho exercido, a temperatura e pressão constantes, para transferir um grupo metileno da fase aquosa para a fase apolar. Um dos primeiros trabalhos neste sentido foi o realizado por Langmuir <sup>171</sup> para a transferência de séries homólogas do interior da solução aquosa para a interface solução/ar. Naquele trabalho, Langmuir determinou uma contribuição média de  $-2,61 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para a energia livre de transferência de grupos metileno do interior da solução aquosa para a interface. Uma observação semelhante foi relatada por Traube <sup>130</sup>, levando a uma regra empírica sobre o abaixamento da tensão superficial de soluções de homólogos.

A interpretação dos valores de  $\Delta G_H$  está relacionada à equação proposta por Collander, em 1951 <sup>192</sup>. De acordo com aquela proposição, os coeficientes de partição,  $K$ , de um determinado soluto entre água e duas fases apolares I e II, podem ser relacionados segundo

$$\ln K_I = a + b \cdot \ln K_{II} \quad [3.2.19]$$

onde  $a$  e  $b$  são os parâmetros para os ajustes da equação. Aplicando esta relação para a transferência de séries homólogas, Beezer e colaboradores <sup>15</sup> propuseram que o parâmetro  $b$  da equação de Collander, eq. [3.2.19], descrito como

$$b = (\Delta tGH)_I / (\Delta tGH)_{II} \quad [3.2.20]$$

pode ser utilizado para avaliar certas características dos ambientes de solubilização do soluto nas fases apolares I e II. Naquele trabalho os autores observaram que, para uma grande variedade de sistemas como solventes orgânicos, micelas, lipossomas e membranas de eritrócitos,  $\Delta tGH$  estava relacionado com a quantidade de água solubilizada na fase apolar.

Vários estudos têm sido feitos a respeito da interpretação da contribuição por grupo metileno. Entre outros, Poole e colaboradores <sup>193</sup> sugeriram que os valores de  $\Delta tGH$  obtidos por cromatografia para a transferência de fase gasosa para a fase estacionária estaria relacionada à polaridade global, sem defini-la especificamente. Com este objetivo, Abraham *et al.* <sup>194</sup> tentaram correlacionar valores de incremento por grupo metileno para  $\Delta tG$  envolvida na transferência da fase gasosa para solução com vários parâmetros dos solventes. Entre os parâmetros estudados estavam parâmetro de Hildebrand, constante dielétrica, índice de refração, parâmetro  $E_T(30)$  de polaridade de solventes etc.

A conclusão deste estudo foi de que  $\Delta tGH$  não é apenas um parâmetro de polaridade do solvente, mas reflete uma combinação de processos envolvidos na partição. Como suporte para esta proposta estava o fato de que as melhores correlações foram obtidas entre  $\Delta tGH$  e o parâmetro de solubilidade de Hildebrand ( $\delta_H$ ) e uma função,  $f(n)$ , definida em termos do índice de refração do solvente. De acordo com esta proposta, o parâmetro de Hildebrand, que está relacionado com a energia coesiva do solvente, mede a energia necessária para a criação de uma cavidade no solvente para inserção de cada fragmento do soluto. O parâmetro de refração abrange as interações dispersivas entre os grupos metileno,

apolares, e o solvente.

Mata-Segreda <sup>195</sup> aplicando um modelo cinético denominado modelo de pressão de solvatação para dados de transferência de solutos da água para fases hidrofóbicas, sugeriu que o termo entrópico deve ser considerado, além das contribuições entálpicas. As contribuições entrópicas tornam-se mais importantes quando o soluto é transferido para uma fase hidrofóbica organizada, como micelas, lipossomas ou proteínas. Segundo aquele autor, a restrição de movimentos do soluto incorporado na fase apolar explicaria porque a contribuição  $\Delta G_H$  é menor quando envolve sistemas hidrofóbicos organizados, em comparação com os solventes orgânicos.

De maneira geral, estes estudos concordam no fato de que o parâmetro  $\Delta G_H$  reflete certas propriedades do sítio de solubilização na fase apolar. Segundo este princípio geral, valores mais negativos são encontrados para fases que mais se assemelham aos hidrocarbonetos líquidos.

Analisando as contribuições hidrofóbicas listadas na Tabela 3.2.2 para compostos aromáticos, verificamos que os valores de  $\Delta G_H$  para transferência para micelas encontram-se na faixa de -1,1 a -2,7 kJ.mol<sup>-1</sup>. Já os valores relatados para a transferência para solventes apolares variam entre -3,0 e -3,8 kJ.mol<sup>-1</sup>. Desta maneira, podemos concluir que os sítios de solubilização em micelas têm propriedades intermediárias entre a água e solventes apolares como octanol e heptano.

No caso específico da transferência dos parabens para micelas de CTAB, estes valores são menores que alguns reportados para a transferência de compostos como os m-alcoxilfenóis <sup>24</sup> e álcoois <sup>196, 197</sup> para micelas de CTAB, ou dos próprios parabens para micelas de SDS <sup>74</sup>. Por outro lado, estes valores se assemelham aos obtidos para a transferência de outros compostos aromáticos como os p-alquilfenóis, ácidos p-alquilbenzóicos e p-nitrofenilcarboxilatos de alquila para micelas de CTAB, conforme mostra a

Tabela 3.2.2. Ainda no caso dos parabens, as contribuições hidrofóbicas para a transferência para micelas de CTAB são menores que as medidas para água/octanol, indicando que o sítio de solubilização nas micelas tem características intermediárias entre octanol e água.

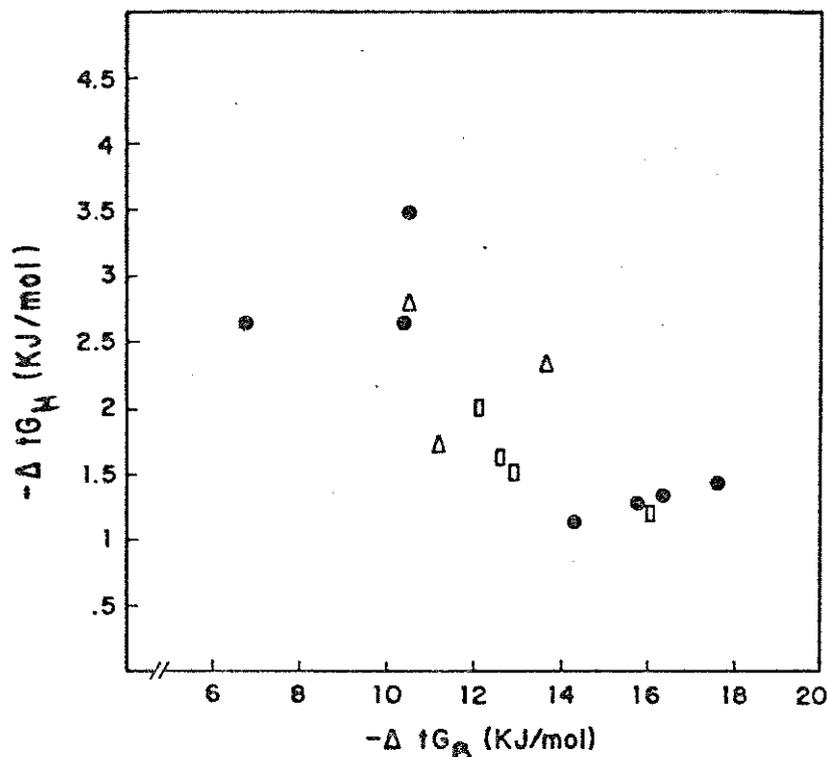


Figura 3.2.4. Relação entre as contribuições da estrutura base,  $\Delta IG_B$ , e hidrofóbica,  $\Delta IG_H$ , para a variação energia livre para a transferência de compostos aromáticos para micelas. ● - CTAB, □ - SDS e Δ - CPC

Observou-se, também, que existe uma certa correlação entre os valores de  $\Delta IG_B$  e  $\Delta IG_H$ , conforme mostra a figura 3.2.4. Os resultados mostrados nesta figura indicam um comportamento geral, aplicável à partição de compostos aromáticos em micelas catiônicas como CTAB e CPC, e aniônicas, como SDS. A equação obtida por

regressão linear para as 14 séries de aromáticos representadas na figura 3.2.4, foi

$$\Delta G_B = -18,91 (\sigma = 1,62) + 3,10 (\sigma = 0,79) \Delta G_H \quad [3.2.21]$$

onde as contribuições de  $\Delta G$  estão expressas em  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e  $\sigma$  representa o desvio padrão de cada parâmetro da regressão. O coeficiente de correlação obtido foi  $r = 0,751$ , e o valor para o teste F,  $F = 15,5$ . O desvio médio dos pontos experimentais para os preditos pela regressão foi de 12%.

De acordo com a tendência representada por estes pontos, uma forte interação entre a estrutura base e as micelas leva a valores pequenos para a contribuição hidrofóbica. Conforme a interpretação dada à contribuição hidrofóbica, no caso de valores grandes de  $\Delta G_B$ , os grupos metileno seriam solubilizados em ambientes menos semelhantes aos hidrocarbonetos. Assumindo que haja um aumento na quantidade de moléculas de água incorporadas, a partir da superfície micelar<sup>198</sup>, estes resultados indicam que uma interação forte da estrutura base com a micela manteria os solutos mais próximos à superfície.

Os valores listados na Tabela 3.2.2 para as contribuições eletrostáticas,  $\Delta G_E$ , são bastante semelhantes, mesmo para o caso de micelas de SDS. Entretanto, para o caso de micelas de CTAB, estes valores são menores que os obtidos para a associação de contra-íons inorgânicos, relatados por Sepúlveda e colaboradores<sup>187</sup>. Estes valores variam de  $-9,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , para fluoreto, a  $-17,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , para nitrato. A variação na energia livre de um íon sob ação de um potencial eletrostático,  $\Psi$ , pode ser calculada através de<sup>1</sup>

$$\Delta G_E = \Psi \cdot z \cdot e \quad [3.2.22]$$

onde  $z$  e  $e$  representam a carga do íon e o valor da carga do elétron, respectivamente.

Para o caso do CTAB, supondo uma interação puramente eletrostática e utilizando o valor de  $\Psi$  da literatura <sup>41</sup>,  $\Psi = 140$  mV, temos que a contribuição eletrostática seria  $\Delta G_E = -13,5$  kJ.mol<sup>-1</sup>. Os valores maiores obtidos para alguns ânions inorgânicos <sup>187</sup> podem ser creditados à presença de outras interações além das puramente eletrostáticas. Estas decorrem da interação do cátion amônio, que tem comportamento de ácido mole, com bases moles como alguns dos ânions. A participação de ácidos e bases moles confere um certo caráter covalente à interação.

No caso da interação dos compostos aromáticos com micelas de CTAB, existem algumas hipóteses para explicar os baixos valores de  $\Delta G_E$  em relação aos obtidos com ânions inorgânicos. A primeira, sugerida por Sepúlveda *et al.* <sup>153</sup> é de que os ânions orgânicos formem pares iônicos com os cátions de CTAB na fase aquosa e que este par iônico é que seja transferido para a micela. Outra possibilidade é a de que a carga sobre o oxigênio, adquirida com a ionização, seja distribuída pela estrutura base devido à ressonância. Assim, a interação ocorreria através de mais de um sítio negativo representado pelos átomos com maior densidade de carga devido à ressonância. Outra possibilidade, ainda, é a de que, uma vez que apenas 20 % das moléculas de CTAB na micelas estão dissociadas, os solutos aniônicos se encontrem distantes das cargas positivas, embora a proximidade entre os dois seja favorecida pela atração eletrostática.

Valores de energia de interação da ordem de  $-5 \pm 1$  kJ.mol<sup>-1</sup> foram descritos para contribuições eletrostática para a interação em sistema macrocíclicos, em soluções aquosas <sup>199,200</sup>. Este resultado foi relatado a partir do estudo de uma grande variedade de combinações de compostos aniônicos de diferentes características como tamanho, tipo de átomos, polarizabilidades e densidades de carga <sup>199</sup>. Entre alguns dos grupos aniônicos, citamos : carboxilato, fosfato e fenolato. Os compostos hospedeiros estudados compreenderam macrociclos e ciclodextrinas modificadas com carga negativa sobre átomos de nitrogênio em

grupos do tipo  $^+NH_2R_2$ ,  $^+NR_4$  e heterociclos aromáticos. A obtenção de um valor semelhante para as contribuições eletrostáticas para interação em macrociclos ciclodextrinas e micelas sugere que todas envolvem um tipo comum de interação apontando a necessidade de mais estudos a fim de entender esta similaridade.

#### 3.2.4. Efeito dos Parabens sobre a c.m.c. do CTAB

A incorporação de solutos com características hidrofóbicas em micelas, reduz a sua c.m.c. e, de acordo com a equação [1.4], aumenta a sua estabilidade, medida por  $\Delta G_{mic}$ . Este efeito pode ser atribuído à redução na repulsão entre os grupos iônicos do surfatante e pela interação favorável entre solutos com características hidrofóbicas e a fase micelar. O efeito dos solutos sobre a c.m.c está relacionado com a quantidade de soluto incorporada na fase micelar. Por este motivo, foram propostos métodos <sup>162,201</sup> que permitem a determinação dos coeficientes de partição a partir do abaixamento da c.m.c. Estes métodos levam à equação geral

$$\ln [(c.m.c.^v) / (c.m.c.^s)] = k \cdot C_s \quad [3.2.23]$$

onde os índices  $v$  e  $s$  representam os valores de c.m.c em água e na presença de uma concentração  $C_s$  de soluto. Segundo estes modelos, a constante  $k$  está diretamente relacionada com o coeficiente de partição do soluto.

A c.m.c do CTAB na presença dos parabens foi medida a partir do aparecimento da espécie aniônica do soluto, representada pela absorvância em  $\lambda = 302$  nm. Na figura 3.2.5, mostramos este efeito segundo a equação [3.2.23]. Como, de acordo com os modelos propostos <sup>162,201</sup>,  $k$  é diretamente proporcional aos coeficientes de partição, seria esperado um aumento linear de  $\ln k$  com o número de átomos de carbono na cadeia alifática. A figura 3.2.5 mostra a relação de  $\ln k$ , calculado pela equação [3.2.23], com o tamanho da

cadeia dos parabens.

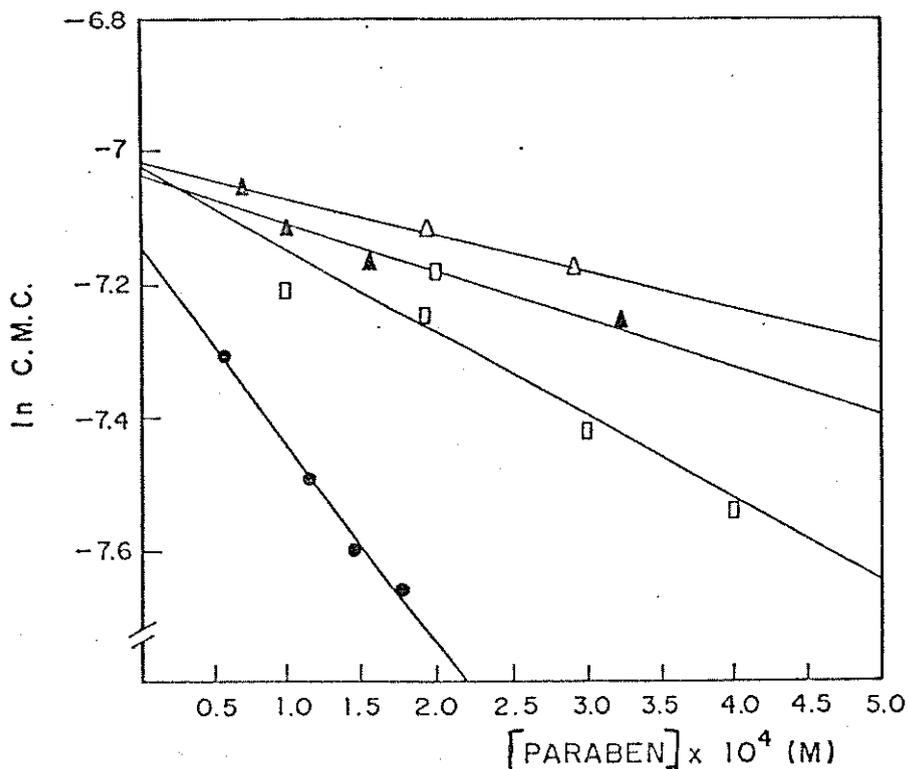


Figura 3.2.5. Variação da c.m.c. de CTAB com a concentração de paraben, a 25°C. Δ - metil; ▲ - etil; ◻ - propil e ● - butilparaben.

Analisando-se os resultados graficados na figura 3.2.6, observa-se que a relação entre  $\ln k$  e o número de átomos de carbono na cadeia alifática não é linear. É que neste caso, ocorre a incorporação de duas espécies do mesmo soluto, a forma neutra e a aniônica. Assim, a equação [3.2.23] torna-se

$$\ln (c.m.c.^v / c.m.c.^a) = k_{HA} \cdot [HA] + k_A \cdot [A^-] \quad [3.2.24]$$

onde  $k_{HA}$  e  $k_A$  representam a capacidade da redução da c.m.c. para as espécies HA e  $A^-$ .

A espécie aniônica deve ser mais efetiva em reduzir a c.m.c. do CTAB devido ao seu maior coeficiente de partição e ao seu maior efeito sobre a repulsão entre os grupos iônicos do surfatante.

Assumindo que as constantes  $k_{HA}$  e  $k_A$  não variem muito para os quatro homólogos estudados, o desvio do comportamento linear predito por equações do tipo da equação [3.2.23] pode ser atribuído majoritariamente à ionização dos parabens. Confirmando esta suposição, observa-se na figura 3.2.6 que este desvio, assim como a ionização, aumenta ao longo da série.

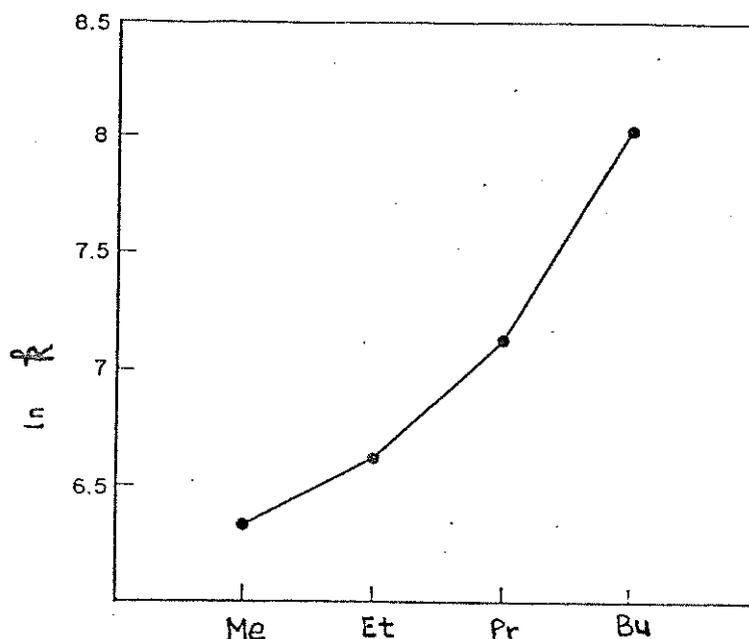


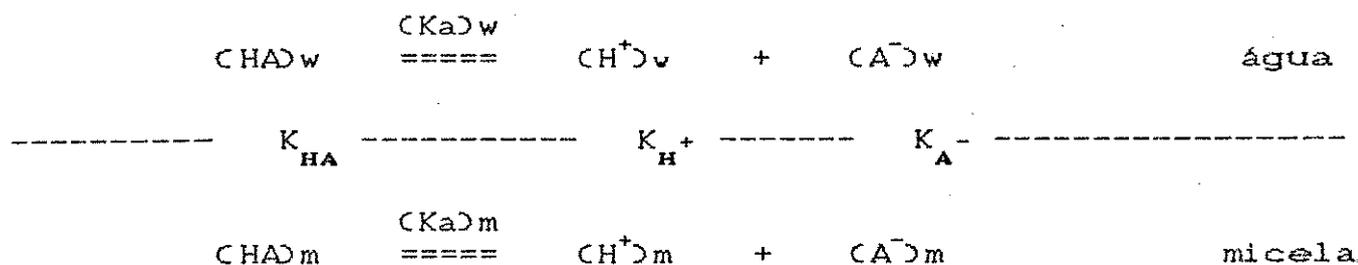
Figura 3.2.6. Relação entre  $\ln k$  (eq. [3.2.23]) e o número de átomos de carbono na cadeia alifática dos parabens

Do mesmo modo que o discutido na seção 3.2.1 para os coeficientes de partição descritos por Shimizu e Iwatsuru<sup>82</sup>, a ionização dos solutos na presença das micelas pode levar a erros sistemáticos na aplicação de equações do tipo da equação [3.2.23]. Este tipo de método foi aplicado por Abu-Hamdiyyah<sup>162</sup> para medir os coeficientes de partição de uma série de solutos em micelas de CTAB, entre eles o etilparaben. O valor obtido,  $K_{mv} = 662$ , é menor do que o medido por nós,  $K_{mv} = 1580$ . Naquele trabalho não há menção de controle de pH para evitar a ionização. Entretanto, a discrepância entre os resultados deve ter outra causa, uma vez que a ionização levaria a valores de  $K_{mv}$  maiores que os reais. De qualquer maneira, resultados do tipo dos mostrados na figura 3.2.6 enfatizam a importância de controle do pH em estudos que utilizem solutos ionizáveis e micelas.

### 3.3. Ionização dos Parabens em Presença de Micelas

A observação do efeito de surfatantes sobre a ionização de solutos remonta aos primeiros estudos envolvendo micelas, como os relatados por Hartley em 1939<sup>202</sup>. Nestes estudos, Hartley observou que micelas afetam a ionização de corantes utilizados como indicadores de pH e enunciou uma regra qualitativa para a descrição deste efeito. De acordo com esta regra, o deslocamento do equilíbrio de ionização seria favorecido no sentido de aumentar a interação, ou reduzir a repulsão, eletrostática entre a espécie ionizada do soluto e a micela.

A influência das micelas sobre o equilíbrio de ionização de um soluto pode ser representada, para o caso de um ácido, HA, conforme o esquema abaixo



Esquema 3.3.1.

A constante de ionização dos solutos na fase aquosa,  $(Ka)_w$ , não se altera na presença de micelas, exceto pela mudança na força iônica da solução. Entretanto, a interação do soluto com as micelas muda a constante aparente de ionização, definida como

$$(Ka)_{ap} = \frac{[A^-]_t \cdot [H^+]_w}{[HA]_t} \quad [3.3.1]$$

onde o índice  $t$  refere-se às concentrações totais, definidas como a soma das concentrações nas fases aquosa e micelar, expressas em

relação ao volume total da solução.

Esta forma de expressar a constante de ionização é a mais adequada porque, usualmente procede-se de modo a que as micelas não interfiram nas medidas realizadas e assim, as quantidades medidas, por exemplo intensidade de luz absorvida ou emitida pelo soluto, são relativas às concentrações totais das espécies HA e  $A^-$ . Além disto, o pH determinado experimentalmente, seja por medida direta utilizando eletrodos ou controlado pelo uso de tampões, é o pH da fase aquosa.

Analisando-se o esquema 3.3.1, para o caso de uma micela catiônica, observa-se que uma interação maior da espécie  $A^-$ , em relação à HA, com a micela leva a um deslocamento do equilíbrio de dissociação na fase aquosa no sentido do aumento da ionização. Assim, obedecendo à invariância da constante de ionização ( $K_a$ )<sub>w</sub>, observa-se um aumento da concentração total da espécie aniônica e uma conseqüente redução do pKa aparente. No caso oposto, representado por uma micela aniônica, há uma interação maior da espécie neutra devido à repulsão eletrostática entre os surfatantes e a espécie aniônica. Neste caso, há um deslocamento do equilíbrio na fase aquosa no sentido de diminuição da dissociação, com um aumento no pKa aparente. Este procedimento leva às regras qualitativas enunciadas por Hartley para predição do efeito de micelas sobre equilíbrios de ionização.

Outra maneira de interpretar este fenômeno é analisando o efeito do potencial eletrostático da superfície micelar sobre a concentração de  $H^+$  nesta fase. No caso de micelas catiônicas, o pH na interface micelar deve ser maior do que na solução, e vice-e-versa. Assim, uma espécie solubilizada na fase micelar comporta-se como se estivesse em um meio de pH diferente do pH no interior da solução aquosa. Este comportamento leva a uma diferença entre o pKa aparente e o determinado em solução aquosa.

A distribuição dos ions  $H^+$  a partir da superfície micelar pode ser assumida como obedecendo a relação de Boltzmann. Assim,

$$[H^+]_m = [H^+]_w \cdot \exp - (e \cdot \Psi / k_B T) \quad [3.3.2]$$

onde  $e$  é a carga do elétron e  $k_B$ , a constante de Boltzmann. No caso de solutos totalmente incorporados na fase micelar, as concentrações nesta fase podem ser igualadas às concentrações totais. Aplicando este princípio e substituindo a equação [3.3.2] na equação [3.3.1], obtém-se a seguinte relação entre o pKa aparente de compostos presentes apenas na fase apolar e o potencial eletrostático micelar :

$$(pKa)_{ap} - (pKa)_m = - e \cdot \Psi / k_B \cdot T \quad [3.3.3]$$

Fernandez e Fromherz<sup>203</sup> aplicaram este procedimento utilizando a equação [3.3.3] para avaliar o potencial eletrostático da superfície de micelas. Estes autores, utilizando como sondas compostos totalmente incorporados na fase micelar e estimando  $(pKa)_m$  como o pKa dos mesmos compostos totalmente incorporados em micelas não-iônicas, obtiveram estimativas dos potenciais superficiais para micelas de SDS,  $\Psi = -134$  mV, e CTAB,  $\Psi = 140$  mV.

O mesmo tipo de procedimento foi bastante utilizado por Drummond e colaboradores<sup>41,204-206</sup> utilizando corantes solvatocrômicos como sondas para determinação simultânea do potencial eletrostático e da constante dielétrica efetiva de interfaces de micelas, lipossomas e microemulsões. Bonnet *et al.*<sup>207</sup> utilizaram um procedimento semelhante para estudar a ionização de ácido esteárico em lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC. Aplicando as relações envolvidas no Esquema 3.3.1, pode-se obter a equação

$$(pKa)_m - (pKa)_w = \log (K_A / K_{HA}) - (e \cdot \Psi / 2,3 \cdot kT) \quad [3.3.4]$$

Segundo esta equação, a diferença entre o pKa na fase aquosa e na fase hidrofóbica depende da relação entre os coeficientes de

partição das espécies HA e A<sup>-</sup> e do potencial eletrostático da interface. No caso do ácido esteárico, como ambas as formas, HA e A<sup>-</sup>, devem estar quase completamente incorporadas nos lipossomas, a razão entre os coeficientes de partição assume um valor bem próximo da unidade. Deste modo, a equação [3.3.4] proposta por Bonnet e colaboradores <sup>207</sup> se aproxima da equação [3.3.3], proposta por Fernandez e Fromherz <sup>203</sup>.

Entretanto, para solutos que se encontrem distribuídos entre as fases aquosa e a hidrofóbica, a equação [3.3.4] é de grande importância. Uma vez determinados os coeficientes de partição das formas ácida e básica, é possível estimar o valor da constante de ionização na fase hidrofóbica, (K<sub>a</sub>)<sub>m</sub>. Este valor, que pode ser utilizado em relações do tipo da equação [3.3.3] para determinação de  $\Psi$ , é usualmente estimado de duas maneiras: através da medida do pK<sub>a</sub> em micelas não-iônicas (por exemplo <sup>203,204</sup>) ou através da determinação do pK<sub>a</sub> em misturas de solventes, por exemplo água/dioxano <sup>41,203,204</sup>, com constante dielétrica próxima da estimada para a superfície micelar.

Do mesmo modo, esta relação permite a avaliação de  $\Psi$  a partir da determinação dos coeficientes de partição K<sub>A</sub> e K<sub>HA</sub> e da estimativa de (pK<sub>a</sub>)<sub>m</sub>. Aplicando esta relação para a ionização de ácidos graxos marcados com sondas de ESR, Bonnet e colaboradores <sup>207</sup> estimaram o potencial superficial de lipossomas de DPPC. Os valores obtidos para três tipos de sondas variaram de -20 a -36 mV, enquanto o valor descrito por Drummond et al. <sup>204</sup> é de -56 mV.

Utilizando a relação de Boltzmann para a distribuição dos íons H<sup>+</sup> entre a superfície micelar e a solução aquosa, é possível estimar a diferença entre o pH nos dois ambientes. Para o caso do CTAB, com  $\Psi = 140$  mV e aplicando a equação [3.3.2] temos que a diferença entre o pH dos dois meios é de aproximadamente 2,4 unidades. Assim, no caso extremo de o soluto estar totalmente incorporado na fase micelar, esta seria a variação máxima no pK<sub>a</sub> aparente. A menor constante dielétrica da interface micelar,

entretanto, deveria dificultar a ionização do soluto naquela fase, de modo que esta variação máxima de 2,4 unidades dificilmente seria alcançada. A maioria dos valores de  $\Delta pK_a$  relatados para micelas está abaixo deste valor, existindo, porém, vários relatos de variações de  $pK_a$  aparente em torno de 2 unidades <sup>208</sup>. Alguns valores maiores ainda, de até 5 a 6 unidades, foram reportados para o caso de microemulsões <sup>208</sup>.

Assim, a variação do  $pK_a$  aparente com a incorporação na micela não pode ser totalmente explicado pelo efeito do potencial de superfície. Além disto, isto não explicaria a influência de micelas não-iônicas. Outros efeitos como a redução da constante dielétrica efetiva e das diferenças entre os coeficientes de partição das duas espécies devem contribuir para o efeito global. Por este motivo, os modelos que descrevem quantitativamente os efeitos de micelas sobre o  $pK_a$  de solutos podem ser divididos em dois grupos principais: os que atribuem o efeito ao potencial eletrostático da micela e os que relacionam este efeito com os coeficientes de partição das espécies em equilíbrio.

Os primeiros modelos, representados pelas equações [3.3.3] e [3.3.4], têm sido aplicados com sucesso para compostos totalmente incorporados na fase micelar. Desta maneira, através do uso de sondas adequadas é possível estimar o potencial eletrostático superficial de micelas <sup>203,204</sup>, lipossomas <sup>204</sup> e fragmentos de membranas biológicas <sup>209</sup>.

Entre os modelos que relacionam o  $\Delta pK_a$  com os coeficientes de partição entre as duas fases, um é representado pela equação descrita por Martinek e colaboradores <sup>210</sup>. De acordo com este procedimento, combinando as constantes dos equilíbrios descritos no Esquema 2.1 com a definição de  $pK_a$  aparente, equação [3.3.1], é possível obter a seguinte expressão para  $\Delta pK_a$

$$(pK_a)_{ap} - (pK_a)_w = \log \frac{(1 + K_{S,HA} \cdot D_M)}{(1 + K_{S,A} \cdot D_M)} \quad [3.3.5]$$

Nesta equação, o efeito do potencial eletrostático é considerado a partir da dependência das constantes de ligação,  $K_s$ , que estão diretamente relacionadas aos coeficientes de partição,  $K_{mw}$ .

Outra maneira de quantificar o efeito de micelas sobre o pKa de solutos decorrente da interação entre estes agregados e as espécies ácida e básica do soluto é através da aplicação do modelo de troca iônica de pseudofase, PPIE, proposto por Quina e Chaimovich<sup>27,211</sup>. Este modelo considera que a partição de espécies iônicas em micelas também iônicas pode ser descrita como um processo de troca iônica, semelhante ao que ocorre sobre resinas. Desta maneira, é possível definir uma constante de seletividade,  $K_{A/Y}$ , para a troca iônica da espécie  $A^-$  pelos contra-íons,  $Y^-$ , do surfatante ou outros íons presentes. Segundo este modelo, podemos escrever

$$(pKa)_{ap} - (pKa)_w = \log \frac{(1 + K_{S,HA} \cdot D_m)}{(1 + K_{A/Y} \cdot ([Y_b] / [Y_f]))} \quad [3.3.6]$$

onde  $[Y_f]$  e  $[Y_b]$  representam, respectivamente, as concentrações dos contra-íons livres e ligados à micela. Segundo esta equação, o efeito do potencial eletrostático é representado pela razão entre as concentrações dos contra-íons livres e ligados, que indica a quantidade de cargas elétricas remanescentes sobre a superfície da micela.

### 3.3.1. Determinação do Efeito de Micelas sobre o pKa Aparente dos Parabens

Os pKa dos parabens em presença de micelas foram determinados utilizando a relação

$$pKa = pH + \log ([HA] / [A^-]) \quad [3.3.7]$$

A razão entre as concentrações das espécies em equilíbrio foi determinada espectrofotometricamente, em  $\lambda = 302$  nm. O pH foi determinado através de medida direta utilizando eletrodo de vidro.

Os pKa em água foram determinados utilizando tampões borato, com força iônica ajustada para 0,1 M, com KCl. Estes valores foram corrigidos para o valor termodinâmico,  $pK_a^T$ , admitindo solução em água pura, utilizando a relação de Davies<sup>212</sup> para determinação do coeficiente de atividade de espécies iônicas em função da força iônica

$$\log \gamma_{\pm} = -0,5 \cdot z_1 \cdot z_2 \frac{I^{1/2}}{1 + I^{1/2}} - 0,30 I \quad [3.3.8]$$

onde  $z_1$  e  $z_2$  são as cargas do cátion e do ânion, e I, a força iônica da solução.

Assumiu-se que a atividade da espécie neutra pode ser aproximada pela sua concentração molar e que não varia com a presença de íons. Com isto, e utilizando a equação [3.3.8] o pKa determinado através da equação [3.3.7], em um meio de força iônica I pode ser transformado no pKa termodinâmico através da relação

$$pK_a^T = pK_a - 2 \cdot \log \gamma_{\pm} \quad [3.3.9]$$

Os valores determinados neste trabalho são mostrados na Tabela 3.3.1. A comparação com os valores descritos na literatura<sup>213</sup> para a ionização em água, mostra uma boa concordância.

Na presença de surfatantes, o pKa aparente foi determinado do mesmo modo descrito anteriormente para as medidas em tampão. Existem algumas críticas ao uso de eletrodos de vidro para medidas de pH em presença de surfatantes. Berthod e Saliba<sup>214</sup> observaram que a adsorção de surfatantes sobre o eletrodo de vidro modificava a sua resposta. Esta adsorção levava à uma modificação do valor de pH fornecido pelo aparelho, efeito este que aumentava em função do

tempo decorrido até a medida. Aqueles autores estudaram estes efeitos em soluções tamponadas de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em pH próximo de 7. Os menores efeitos foram observados com CTAB e Brij, em que se observou um aumento do pH menor que 0,03 unidades em uma hora de observação, com soluções de surfatante 1 % em massa. No caso do SDS, na mesma concentração, foi observada uma redução no pH de 0,4 unidades em uma hora. Shikahata e colaboradores<sup>215</sup> estudaram o efeito da adição de CTAB em concentrações de 5 e 10 mM sobre o pH de soluções de HCl, com valores de pH até 4. Eles observaram que o surfatante causa um aumento de pH de até 0,1 unidade, nas soluções menos ácidas.

Tabela 3.3.1. Constantes de ionização, pKa, para os parabens em água e pKa aparentes em presença de micelas, a 25°C. Variação nos resultados experimentais menor que 1%.

paraben	em NaCl 0,1 M	I = 0 <sup>a</sup>	I = 0 <sup>b</sup>	CTAB 1,2 <sup>c</sup>	CTAB 2,4 <sup>c</sup>	CTAB 6,0 <sup>c</sup>	Genapol 1,2 <sup>c</sup>	SDS 10 <sup>c</sup>
metil	8,26	8,48	8,48	7,97	7,74	7,60	8,29	8,49
etil	8,27	8,48	8,50	7,78	7,66	7,56	8,34	8,55
propil	8,25	8,47	--	7,57	7,42	7,50	8,40	8,67
butil	8,22	8,43	8,47	7,37	7,31	7,42	8,67	8,85

a- calculado através das equações [3.3.8] e [3.3.9], b- ref. 213, c- valores de concentração expressos em mM.

Nesta parte do trabalho, os pKa foram determinados através da medida direta de pH com eletrodo de vidro. Na seção seguinte desta tese, são descritos resultados de estudos da ionização dos parabens em presença de micelas de CTAB em meio tamponado, utilizando tampão Tris.HBr, 25 mM em Tris e 15 mM em HBr, com pH próximo a 8. Para verificar a concordância dos dois métodos, comparamos na Tabela 3.3.2 os resultados obtidos em meio tamponado

com os obtidos pela medida direta de pH em solução 15 mM em Br<sup>-</sup>, como no caso tamponado.

Na Tabela 3.3.2 observa-se que os pKa obtidos pelos diferentes métodos se aproximam ao longo da série ocorrendo uma inversão para o butilparaben. Isto ocorre porque, no caso das medidas em meios não tamponado, o aumento na concentração de CTAB provoca uma diminuição do ΔpKa, o que será discutido a seguir. Por este motivo, a comparação deve ser feita utilizando apenas os dois primeiros compostos, em que este efeito de competição é menos pronunciado. Assim, observa-se que os valores de pKa em meio tamponado são até 0,2 unidades maiores que os obtidos por medida direta do pH. Isto indica, de acordo com a equação [3.3.7], que os valores de pH medidos com eletrodo de vidro em presença de CTAB, nesta faixa de concentração, são até 0,2 unidades menores.

Tabela 3.3.2. Verificação da concordância entre as medidas de pKa em meio tamponado e através da determinação direta do pH. Valores de pKa em soluções de CTAB 2,7 mM, 15 mM em Br<sup>-</sup>, a 25°C.

homólogo	pKa, tampão	pKa, eletrodo	diferença
metil	8,28	8,09	+ 0,19
etil	8,15	8,10	+ 0,05
propil	8,01	7,99	+ 0,02*
butil	7,86	8,03	- 0,17*

\* valores não considerados, ver discussão no texto

Analisando-se os resultados da Tabela 3.3.1., verifica-se que eles concordam com a regra enunciada por Hartley. As micelas catiónicas de CTAB provocam uma diminuição no valor do pKa aparente, o que corresponde a um aumento na ionização dos parabens. As micelas aniônicas e não iônicas têm um efeito contrário, sendo que as micelas de SDS apresentam um efeito maior.

Além disto, este efeito aumenta com a concentração das micelas e com a hidrofobicidade dos solutos. Estes dois últimos efeitos podem ser inferidos das equações [3.3.5] e [3.3.6].

A dependência de  $\Delta pK_a$  com a hidrofobicidade do soluto também foi observada por Bonnet e colaboradores<sup>207,216</sup>. Estes autores descreveram este efeito de acordo com a equação [3.3.4], conforme descrito anteriormente. O mesmo efeito foi observado por Harada *et al.*<sup>217</sup> estudando a dissociação de propil e metilamina em presença de micelas de SDS. Entretanto, Harada e colaboradores atribuíram este efeito a diferentes posições do grupo amino da metil e propilamina na superfície micelar. No caso de p-alquilfenóis, Bunton e Cowell<sup>181</sup> realizaram um estudo sobre o efeito destes compostos sobre o deslocamento químico de RMN de prótons do CTAB e concluíram que o tamanho do radical alquila não afeta a localização do soluto na micela. Estes resultados concordam com observações dos mesmos autores<sup>218</sup> de que a reatividade de íons fenóxido em micelas de CTAB não era afetada pelo tamanho do substituinte alquila. Assim, o efeito da hidrofobicidade do soluto sobre o  $\Delta pK_a$  deve ser atribuído a uma maior interação das espécies em equilíbrio com as micelas, conforme prevêm as equações [3.3.5] e [3.3.6].

O efeito de micelas de CTAB foi estudado em maior profundidade. A figura 3.3.1 mostra a variação na relação entre as concentrações das formas ácida e básica dos parabens em função da concentração de CTAB, em meio não tamponado. Nela pode-se observar que a adição de CTAB provoca um aumento na ionização do paraben até um valor máximo, que corresponde a um mínimo de  $\log [HA]/[A^-]$ , a partir do qual este efeito começa a diminuir. Este máximo é dependente do tamanho do homólogo, ocorrendo a concentrações menores para os solutos mais hidrofóbicos. Além disto, este máximo ocorre a concentrações ligeiramente maiores a 35°C em relação aos valores a 25°C. Este mesmo efeito pode ser verificado nos resultados mostrados na Tabela 3.3.2.

A ocorrência deste máximo no  $\Delta pK_a$  é prevista pelo modelo de

troca iônica de pseudofase. O grau de dissociação micelar,  $\alpha$ , é assumido como constante com o aumento na concentração de CTAB. Esta hipótese é confirmada por um estudo sistemático <sup>219</sup>. Assim, podemos definir  $\beta$  como  $1 - \alpha$ , expressando-o como

$$\beta = (m_{OH})_s + (m_X)_s \quad [3.3.10]$$

onde  $(m)_s$  representa a razão entre as concentrações analíticas das espécies  $OH^-$  e  $X^-$ , neste caso  $Br^-$ , ligadas à micela por mol de surfatante micelizado. Do formalismo de troca iônica, podemos definir a contante de troca iônica na superfície micelar como

$$K_{OH}^X = \frac{[OH^-]_w \cdot (m_X)_s}{[X^-]_w \cdot (m_{OH})_s} \quad [3.3.11]$$

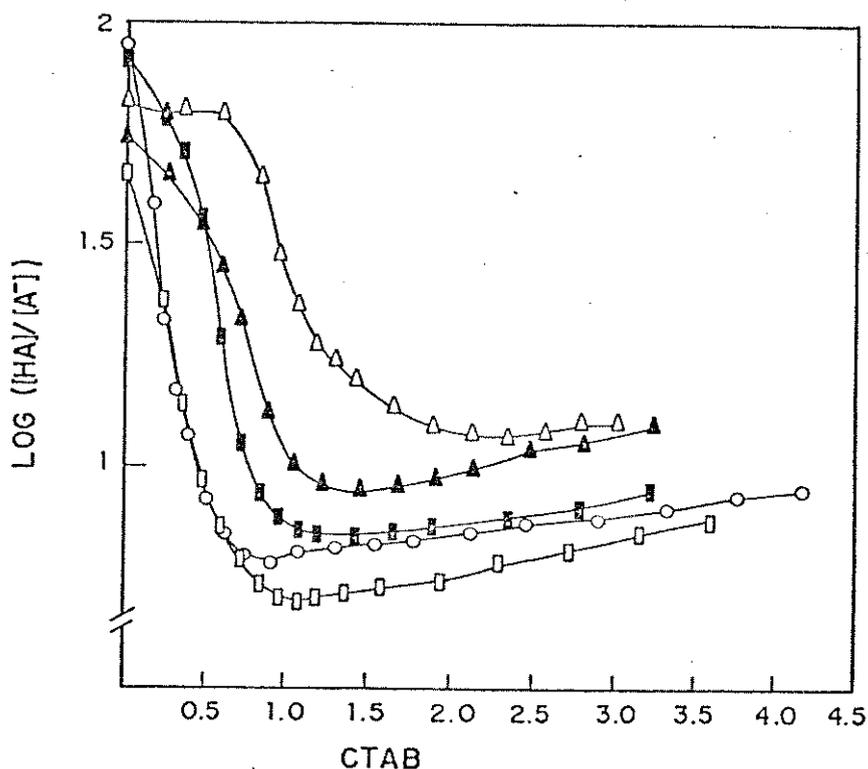


Figura 3.3.1. Efeito da adição de CTAB sobre a ionização dos parabens em água. A 25°C :  $\Delta$  - metil,  $\blacksquare$  - butil e  $\circ$  - pentil. A 35°C :  $\Delta$  - butil e  $\square$  - pentil.

Rearranjando a equação [3.3.11] e combinando-a com a equação [3.3.9], temos

$$\beta = \frac{(m_x)_s + [\text{OH}^-]_w \cdot (m_x)_s}{[\text{X}^-]_w \cdot K_{\text{OH}}^x} \quad [3.3.12]$$

Com o aumento na concentração de CTAB há um conseqüente aumento na concentração de contra-íons livres,  $[\text{X}^-]_w$ . Como o pH em água e, conseqüentemente,  $[\text{OH}^-]_w$ , permanecem constantes,  $(m_x)_s$  deve aumentar para que  $\beta$  permaneça constante. Do mesmo modo, da equação [3.3.10], se  $(m_x)_s$  aumenta e  $\beta$  é constante,  $(m_{\text{OH}})_s$  deve diminuir. Com a redução de  $(m_{\text{OH}})_s$ , diminui o pH na superfície micelar e, como conseqüência, ocorre a redução no valor de  $\Delta pK_a$ . O aparecimento do decréscimo de  $\Delta pK_a$  é sentido a concentrações menores pelos solutos mais hidrofóbicos porque estes estão mais presentes na fase micelar. Nas concentrações em que foram feitos os experimentos, este efeito não foi observado quando se trabalhou em meio tamponado.

A ionização dos parabens em função da concentração de CTAB foi estudada em meio tamponado, a 25 e 35°C. O tampão utilizado foi o Tris.HBr, 25 mM em Tris e 15 mM em HBr, com pH em torno de 8. A utilização de tampões para estudos com micelas requer cuidado devido à possibilidade de competição do tampão com o substrato pela superfície micelar<sup>208</sup>. Estudos de Chaimovich e colaboradores<sup>27</sup> mostraram que os pKa aparentes medidos diferem de acordo com o tipo de tampão utilizado. Por este motivo, é importante escolher um tipo de tampão que interaja pouco com a micela. O Tris, tris-hidroximetilaminometano, é um composto bastante solúvel em água, e por isto, menos solúvel nas micelas. Além disto, as formas em equilíbrio no tampão são neutra e positiva, sem presença de espécie aniônica. O único ânion presente no tampão é o brometo que é também o contra-íon do surfatante e cujo efeito pode ser considerado pelo formalismo de troca iônica, equação [3.3.6].

As medidas do pKa aparente foram feitas determinando

espectrofotometricamente, em  $\lambda = 302 \text{ nm}$ , a concentração do paraben na forma aniônica e, conseqüentemente, a relação entre as concentrações das duas espécies. O pH foi medido para o tampão e considerou-se que não variava com a adição de CTAB. A adição de CTAB foi feita através de micro-seringa, calibrada por pesagem, com adições de surfatante tipicamente na ordem de  $10 \mu\text{l}$ . Embora os volumes adicionados fossem pequenos, os valores de absorbância foram corrigidos para a diluição.

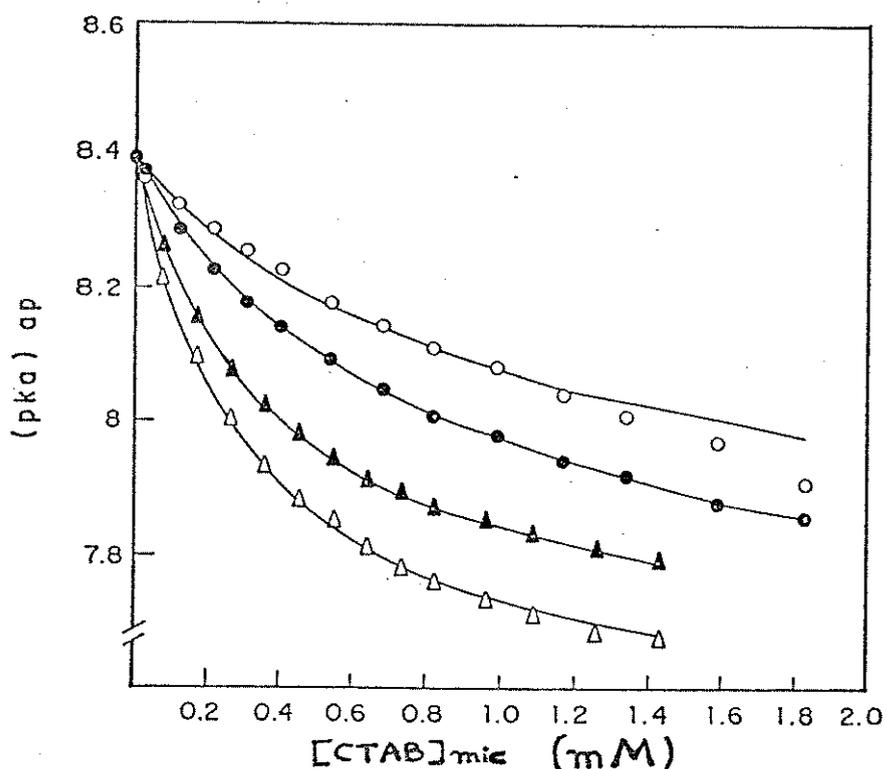


Figura 3.3.2. Variação do pKa aparente dos parabens, em meio tamponado, em função da concentração de CTAB micelizado, a  $25^{\circ}\text{C}$ . O - metil e  $\Delta$  - propil, experimental; O - metil e  $\Delta$  - propil, calculado, segundo a equação [3.3.5]; linhas contínuas - calculadas segundo o modelo PPIE, equação [3.3.6]

Os resultados são mostrados nas figuras 3.3.2 e 3.3.3, respectivamente para 25 e 35° C, para metil e propilparaben. O comportamento dos outros compostos da série é semelhante. Na figura 3.3.2, estes resultados são comparados com os previstos pelas equações [3.3.5] e [3.3.6], utilizando os coeficientes de partição das espécies neutra e aniônica dos parabens. A equação [3.3.5], que relaciona diretamente os coeficientes de partição com a variação do pH, apresenta uma boa concordância qualitativa com os resultados experimentais. Entretanto, os valores de  $\Delta pK_a$  previstos para o metil e etilparaben são maiores que os experimentais, enquanto a situação se inverte para os outros homólogos.

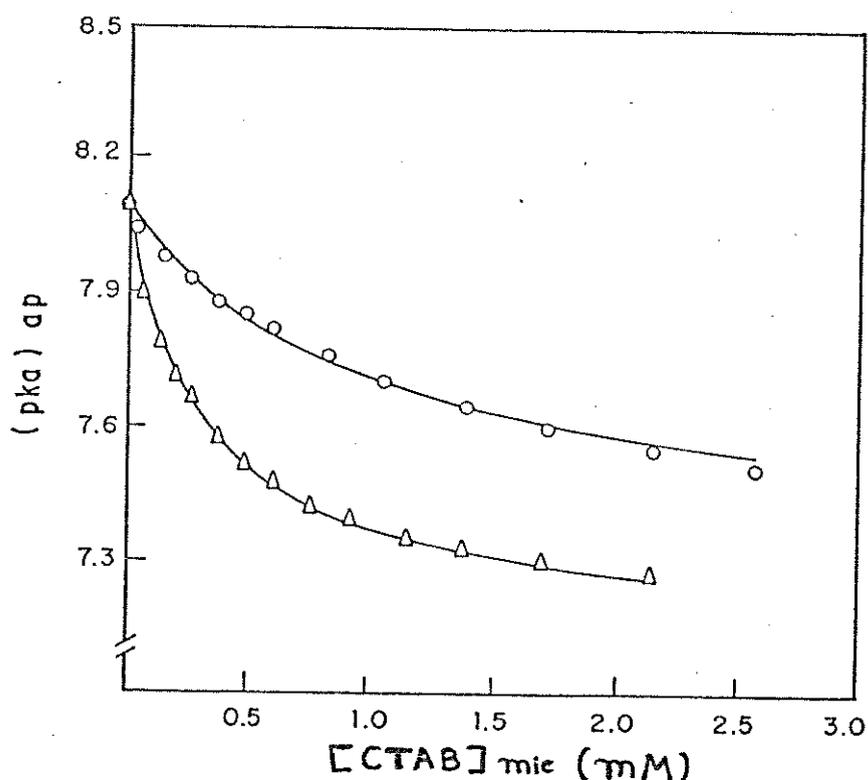


Figura 3.3.3. Variação do pKa aparente dos parabens, em meio tamponado a 35°C, com a concentração de CTAB micelizado. O -metil e  $\Delta$  - propil, experimental; linhas contínuas - calculado segundo o modelo PPIE, equação [3.3.6].

A Tabela 3.3.3 mostra os coeficientes de partição das espécies aniônicas calculados utilizando os valores experimentais do coeficiente de partição da forma neutra e do pKa aparente. Comparando estes valores com os determinados diretamente, observa-se que eles também apresentam um crescimento linear de  $(\ln K_A)$  com o número de átomos de carbono na cadeia alifática. Entretanto, o coeficiente linear, que representa as outras contribuições que não a hidrofóbica, é menor, e o incremento por grupo metileno, maior. O menor valor obtido para o coeficiente linear pode ser decorrência da presença de brometo na determinação do pKa aparente, o que diminuiria a interação do ânion com a micela catiônica.

Um incremento maior por grupo metileno indicaria uma mudança no sítio de solubilização na micela, em relação ao da espécie neutra. Ao contrário, estudos de Bunton e Cowell<sup>181</sup> com p-alquilfenóis mostraram que a ionização daqueles compostos não provocava mudança na sua localização nas micelas de CTAB. Além disto, não seria esperado que a presença de íons brometo em concentração baixa causasse tal modificação. Por isto, e como os valores de  $K_A$  - relatados na seção anterior foram medidos diretamente, enquanto os listados na Tabela 3.3.3 são calculados a partir de diferentes resultados experimentais, consideramos que os primeiros devem ser os mais exatos.

O aumento da temperatura provoca uma redução no efeito das micelas sobre a variação do pKa aparente dos parabens, em relação ao pKa em água, na mesma temperatura. Este comportamento concorda com o observado na determinação dos coeficientes de partição, indicando uma menor interação dos parabens com a micela à medida que se aumenta a temperatura.

Tabela 3.3.3. Coeficientes de partição,  $K_{mv}$ , para as espécies aniônicas dos parabens, calculados através da equação [3.3.5], e constantes de seletividade para a troca iônica,  $K_{A/Br}$ . Valores calculados a partir dos pKa aparentes, medidos a 25 e 35°C.

homólogo	$K_A, 25^\circ C$	$K_{A/Br}, 25^\circ C$	$K_A, 35^\circ C$	$K_{A/Br}, 35^\circ C$
metil	5200 ± 290	36,3 ± 2,2	6370 ± 390	44,6 ± 2,9
etil	10450 ± 330	72,4 ± 2,3	11930 ± 380	77,1 ± 3,5
propil	24330 ± 600	163 ± 5	25860 ± 1100	180 ± 6
butil	44700 ± 1200	309 ± 9	35770 ± 4470	250 ± 32
pentil	68800 ± 6000	463 ± 37	52400 ± 3700	362 ± 27

Os valores de pKa aparentes também foram interpretados de acordo com o modelo de troca iônica de pseudofase (PPIE). As figuras mostram uma boa concordância entre os resultados experimentais e os calculados, com um pequeno desvio a concentrações maiores de CTAB, para metil e propilparaben. Os mesmos resultados foram obtidos para os outros homólogos De acordo com o modelo PPIE<sup>211</sup>, as concentrações dos ânions ligados e livres,  $Y_b$  e  $Y_f$ , respectivamente, podem ser expressas como

$$[Y_b] = (1 - \alpha) \cdot D_M - [OH^-]_b - [A^-]_b \quad [3.3.13]$$

onde o índice  $b$  representa as espécies ligadas à micela, e  $D_M$ , a concentração de surfatante micelizada, e

$$[Y_f] = \alpha \cdot D_M + c.m.c. + [OH^-]_b + [A^-]_b + [BY]_T \quad [3.3.14]$$

onde  $[BY]_T$  representa a concentração total de eletrólito adicionado. Para efetuar estes cálculos consideramos  $\alpha = 0,2$ , para CTAB, a 25 e 35°C<sup>27</sup>. A c.m.c. do CTAB variava de acordo com o

homólogo utilizado, e seu valor foi determinado pela extrapolação das curvas pKa aparente versus concentração de CTAB. Além disto, na faixa de concentrações de surfatante, paraben e tampão, principalmente em Br<sup>-</sup>, utilizadas, as equações [3.3.13] e [3.3.14] se reduziã a

$$[Y_b] = (1 - \alpha) \cdot D_M \quad [3.3.15]$$

e

$$[Y_f] = \alpha \cdot D_M + \text{c.m.c.} + [BY]_T \quad [3.3.16]$$

Assim, calculando [Y<sub>b</sub>] e [Y<sub>f</sub>] de acordo com as equações [3.3.15] e [3.3.16] e utilizando os coeficientes de partição da forma neutra dos parabens foi possível determinar as constantes de seletividade para a troca iônica do ânion brometo pela espécie aniônica do paraben na superfície do CTAB. Os valores calculados para 25 e 35°C são mostrados na Tabela 3.3.3. A título de comparação, o valor de K<sub>A/Br</sub> descrito para fenol e n-heptilmercaptana em CTAB, a 30°C, são, respectivamente, 34 e 75<sup>27</sup>

Como foi demonstrado no esquema 3.3.1, o ciclo que descreve os equilíbrios de ionização e partição em água e micela envolve também uma etapa de ionização do soluto na fase micelar. Conforme descrito anteriormente, rearranjando-se as equações que descrevem o esquema 2.1, Bonnet e colaboradores<sup>207</sup> obtiveram a equação [3.3.4], que relaciona a diferença entre os pKa em água e na fase micelar com os coeficientes de partição das espécies em equilíbrio e com o potencial eletrostático micelar. Utilizando os coeficientes de partição determinados para as formas neutras e aniônicas dos parabens e o potencial eletrostático do CTAB descrito na literatura,  $\Psi = 140 \text{ mV}$ <sup>41,202</sup>, podemos calcular (pKa)<sub>m</sub>. Os valores obtidos para os respectivos homólogos foram: 9,92, para o metilparaben; 9,88, etil; 9,98, propil, 10,05, butil e 10,00, pentil. De acordo com estes resultados, o ΔpKa médio, entre a ionização na fase micelar e em água, (pKa)<sub>w</sub> = 8,40, é 1,57 ± 0,07.

Fernandez e Fromherz <sup>203</sup> realizaram um extensivo estudo sobre os equilíbrios envolvidos no processo de ionização em presença de micelas. De acordo com seu trabalho, o processo de ionização no interior da micela, representado no esquema 3.3.1, pode ser decomposto em duas etapas. Na primeira, as espécies neutra, aniônica e o próton liberado pela ionização se encontram dentro da micela, em um ambiente de reduzida constante dielétrica, naquele trabalho, denominado  $(pK_a)_m$ . Numa etapa posterior, o próton migra para a interface micelar, em um ambiente predominantemente aquoso, com este processo sendo descrito por uma constante de equilíbrio por eles denominada  $(pK_a)_i$ . A diferença entre os dois processos é dada pela transferência do próton de um ambiente de constante dielétrica menor,  $\epsilon = 32$  para superfície de micelas de CTAB, para um ambiente de constante dielétrica semelhante à da água.

Aqueles autores mediram o  $pK_a$  de um indicador, hidroxycumarina, em água e em misturas de água/dioxano, de diferentes constantes dielétricas. Para misturas de constante dielétrica próximas das descritas para micelas,  $\epsilon \cong 32$ , o valor obtido para o  $\Delta(pK_a)_m$ , utilizando o valor determinado na mistura água/dioxano de mesma polaridade, foi de aproximadamente 1,6. Determinando a diferença no coeficiente de atividade do próton nesta mistura água/dioxano e em água, eles estimaram um  $\Delta(pK_a)_i$  de aproximadamente 1,0. Aplicando o mesmo tipo de procedimento, Drummond e colaboradores <sup>204</sup> estimaram valores de  $\Delta(pK_a)_m$  e  $\Delta(pK_a)_i$  para o corante  $E_T(30)$ , 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridínio)fenóxido, em várias micelas e lipossomas. Os valores obtidos para micelas de CTAB foram:  $\Delta(pK_a)_m = 1,5$  e  $\Delta(pK_a)_i = 1,0$ . Estes valores foram estimados em função da constante dielétrica efetiva de cada sistema organizado e foram bastante semelhantes para todos os sistemas estudados: micelas catiônicas, aniônicas, não iônicas e lipossomas aniônicos.

Bonnet e colaboradores <sup>216</sup> determinaram as constantes de ionização para ácido esteárico e mercaptoetanolamina (MEA) em água e em lipossomas de DPPC. Os valores obtidos foram:  $(pK_a)_w = 4,9$  e  $(pK_a)_m = 7,4$ , para ácido esteárico, e  $(pK_a)_w = 10,4$  e  $(pK_a)_m =$

5,4, para MEA. Comparando os valores de  $\Delta pK_a$  por nós estimados com os relatados por Fernandez e Fromherz<sup>203</sup> e Drummond e colaboradores<sup>204,205</sup>, vemos que estes se aproximam mais dos atribuídos a  $(\Delta pK_a)_m$ . Assim, de acordo com o valor determinado pela equação [3.3.4] para  $pK_a$  na fase micelar, o equilíbrio descrito no esquema 2.1 envolve a presença de todas as espécies na fase micelar e o  $pK_a$  corresponde ao  $(pK_a)_m$ , segundo a convenção utilizada por Fernandez e Fromherz. Entretanto, os valores por nós obtidos são menores do que os descritos por Bonnet *et al.*<sup>216</sup>: 2,5 para ácido esteárico e 5,0 para MEA.

### 3.3.2. Efeito de Aditivos sobre a Ionização dos Parabens com Micelas de CTAB

Nesta etapa foi estudada a influência de aditivos sobre o efeito das micelas de CTAB na ionização dos parabens. De acordo com o que foi descrito anteriormente, o efeito das micelas está intimamente relacionado com o potencial eletrostático superficial ou, segundo outro modelo, com a troca iônica entre o contra-íon micelar e a espécie aniônica do paraben. Assim, através do acompanhamento da ionização do paraben, é possível avaliar as modificações causadas na micela pela presença do aditivo. Os aditivos estudados foram ânions: fluoreto, cloreto, brometo, nitrato, sulfato e p-toluenossulfonato; álcoois de cadeia curta: de etanol ao butanol, e Genapol, um surfatante não iônico de composição média  $C_{12}H_{25} - (OCH_2CH_2)_9OH$ , ou  $C_{12}EO_9$ .

Os  $pK_a$  foram determinados, em meio não tamponado, pela medida direta do pH com eletrodo de vidro. O efeito dos aditivos foi examinado acompanhando-se espectrofotometricamente a variação da razão entre as concentrações das espécies neutra e aniônica dos parabens com a concentração adicionada. Os experimentos foram realizados a 25°C. Conforme descrito na seção anterior, a medida direta do pH em soluções micelares pode levar a desvios no valor medido estimados em até 0,2 unidades de pH.

Este estudo foi realizado utilizando os 4 primeiros homólogos dos parabens. A adição de ânions produzia uma diminuição no  $\Delta pK_a$  causado pelas micelas, em relação ao valor em água. Esta variação no  $pK_a$  aparente aumentava com a hidrofobicidade do soluto. Estes resultados são mostrados para as adições de brometo, fluoreto e p-toluenossulfonato, respectivamente, nas figuras 3.3.4 a 3.3.6. Entretanto, com a adição de álcoois e de Genapol o  $pK_a$  aparente aumenta, mas o efeito é aproximadamente igual para todos os homólogos. A maiores concentrações destes aditivos, ocorre uma pequena diferenciação entre os solutos. Os resultados para a adição de Genapol e propanol são mostrados nas figuras 3.3.7 e 3.3.8.

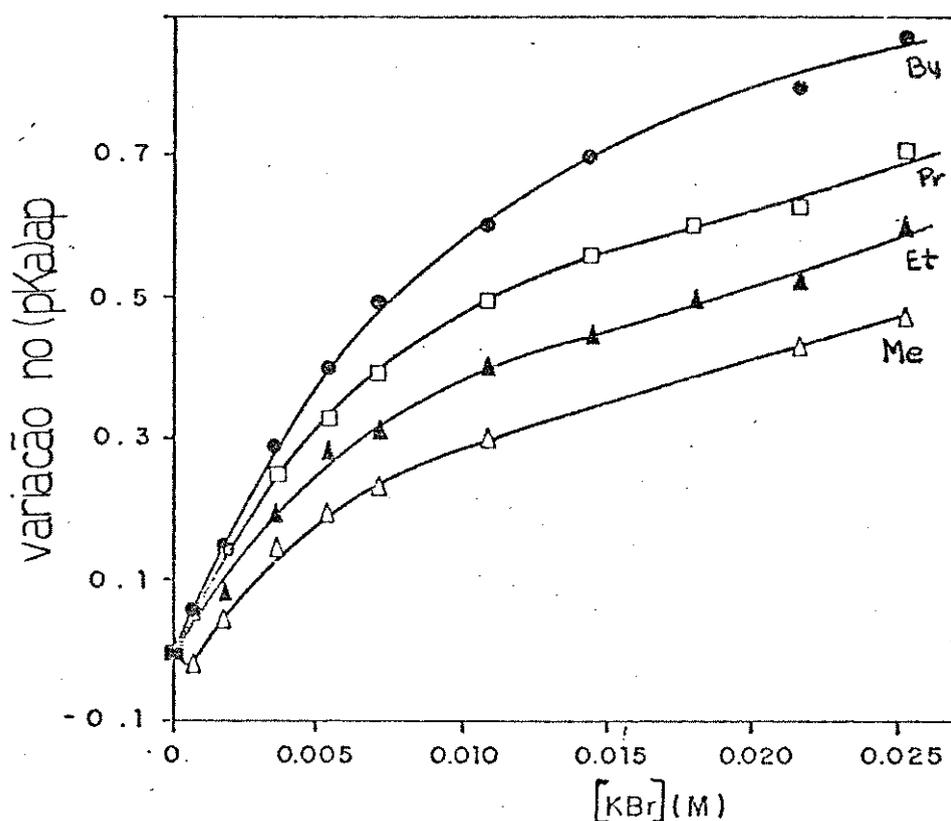


Figura 3.3.4. Efeito da adição de KBr sobre o  $pK_a$  aparente dos parabens em solução de CTAB 1,3 mM.

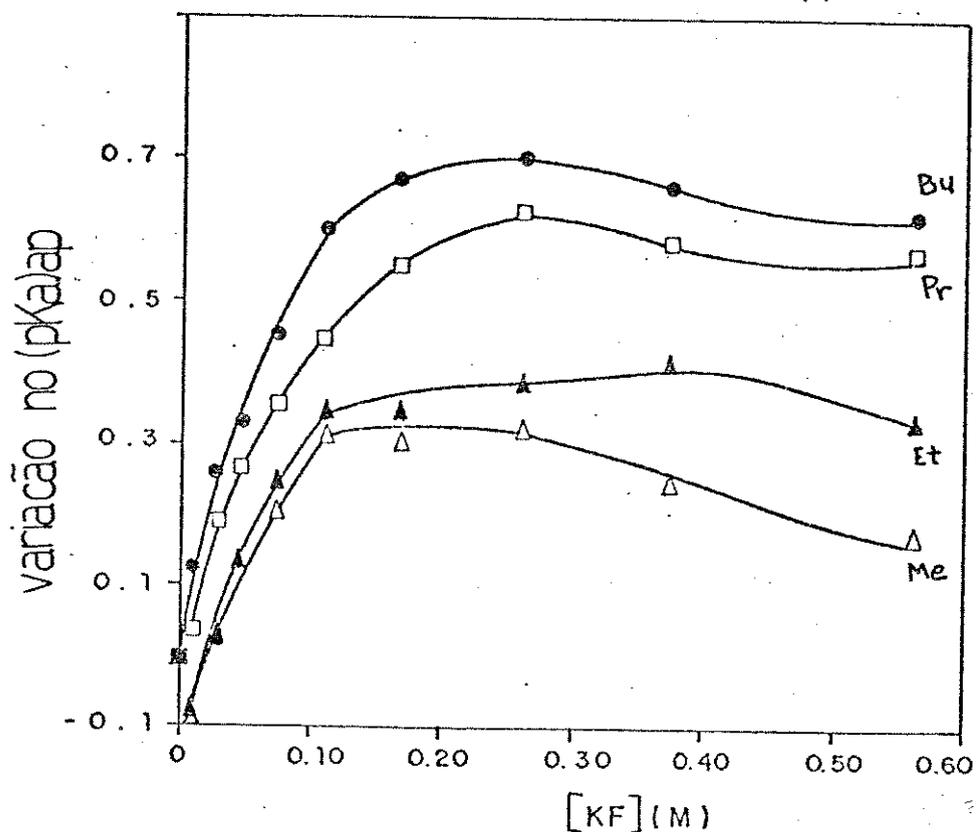


Figura 3.3.5. Efeito da adição de KF sobre o pKa aparente dos parabens, em solução de CTAB 1,3 mM.

Estes resultados indicam que os compostos mais hidrofóbicos são mais influenciados pela competição com os ânions adicionados. Isto parece razoável uma vez que os solutos mais hidrofóbicos estão presentes em maior quantidade na fase micelar. Este resultado é semelhante ao observado para a ionização dos parabens em função da concentração de CTAB, em que, a concentrações mais altas de surfatante, o  $\Delta pK_a$  começava a diminuir e este efeito era maior para os homólogos maiores. No caso da adição de álcoois e Genapol, não existe a competição pela superfície ionizada da micela.

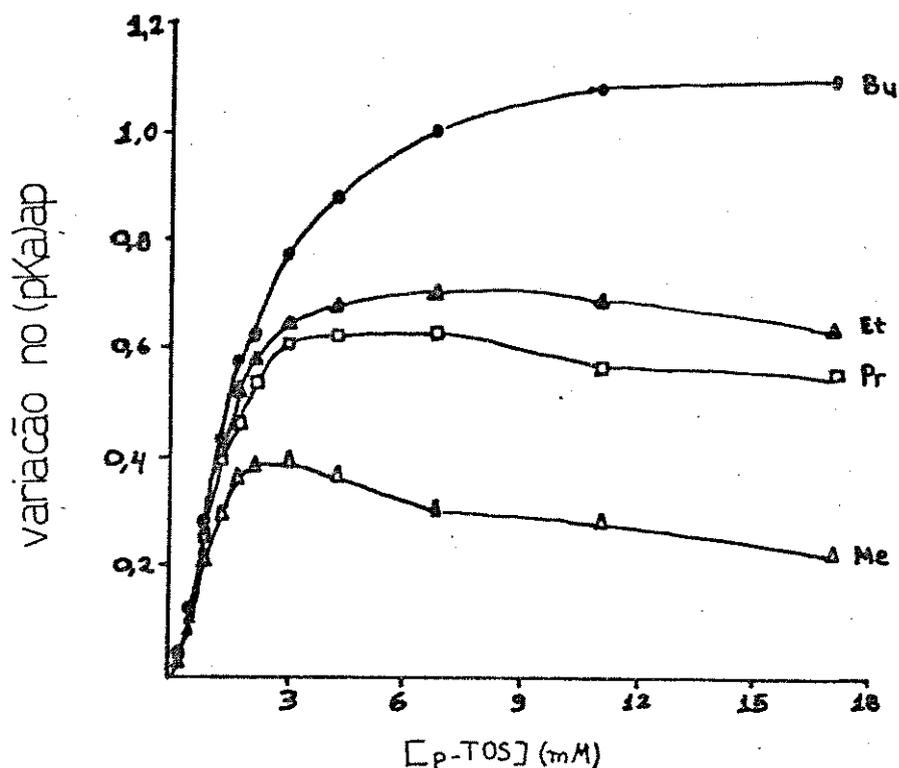


Figura 3.3.6. Efeito da adição de p-toluenossulfonato de sódio sobre o pKa aparente dos parabens, em solução de CTAB 1,3 mM

As variações no pKa aparente com a concentração dos aditivos são mostradas para metil e propilparaben, respectivamente, nas figuras 3.3.9 e 3.3.10. Com a adição de p-toluenossulfonato, na concentração em torno de 2 mM, aproximadamente na proporção 1:1 em relação ao CTAB, observou-se um grande aumento na viscosidade aparente das soluções. Esta mudança indica que ocorreu uma transição de fase nas micelas de CTAB, formando micelas cilíndricas e conferindo propriedades viscoelásticas à solução. Este tipo de micelas vem sendo bastante estudado (por exemplo,

167,220), inclusive a sua formação devido à interação de CTAB com p-toluenossulfonato <sup>221,222</sup>. Com nenhum dos outros ânions estudados observou-se modificação na viscosidade detectável visualmente que indicasse a ocorrência de formação de outros tipos de micelas.

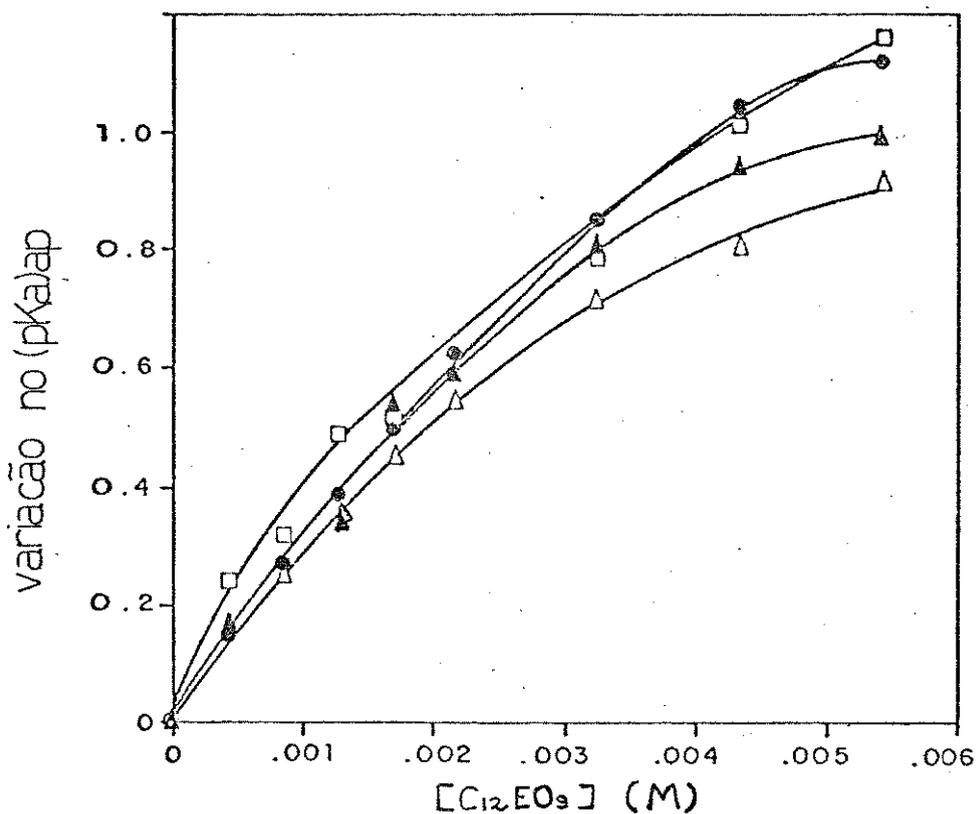


Figura 3.3.7. Efeito da adição de C<sub>12</sub>EO<sub>9</sub> sobre o pKa aparente dos parabens, em solução de CTAB 1,3 mM

No caso da adição de p-toluenossulfonato observa-se que ocorre uma estabilização no ΔpKa para uma concentração do sal em torno de 3 mM, com este valor mantendo-se constante com posteriores adições do sal. Esta invariância com posteriores adições de sal pode ser atribuída a modificações causadas pela formação das micelas cilíndricas. Estas micelas caracterizam-se

por uma estrutura mais organizada e um menor grau de dissociação, se comparadas às micelas esféricas.

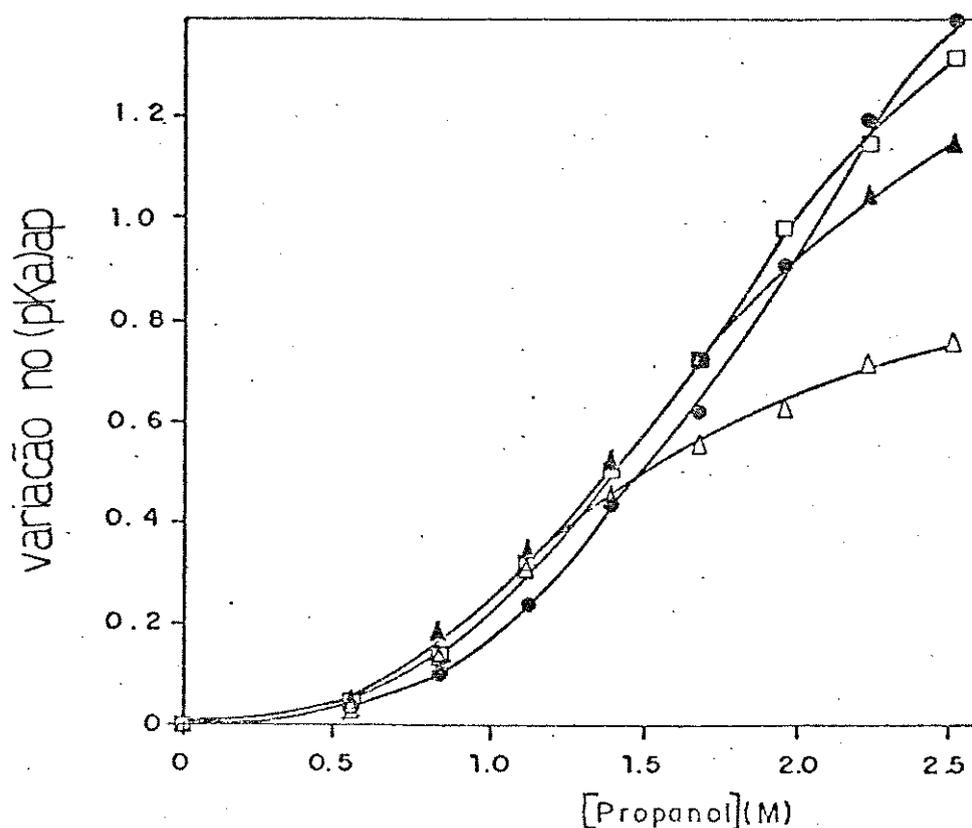


Figura 3.3.8. Efeito da adição de propanol sobre o pKa aparente dos parabens, em solução de CTAB 1,3 mM

Com a adição de sulfato, também se observa um patamar, em concentrações próximas de 5 mM de sal. Neste caso não se observou nenhuma variação na viscosidade das soluções, mas estudos de polarização da fluorescência de pireno em micelas de CTAB <sup>223</sup> indicaram que a adição de sulfato provoca um aumento na rigidez da interface micelar. Outro comportamento anômalo causado pela interação de sulfato com estas micelas, foi relatado por Biresaw *et al.* <sup>224</sup>. Estes autores determinaram que micelas de  $CTA_2SO_4$  possuem um grau de dissociação muito baixo, cerca de 0,06, e que a tamanho das micelas não varia significativamente com a adição de

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  até 0,6 M. Assim, estes efeitos de sulfato sobre a ordenação e o grau de dissociação de micelas de CTAB devem ser os responsáveis pelo comportamento peculiar mostrado nas figuras 3.3.9 e 3.3.10.

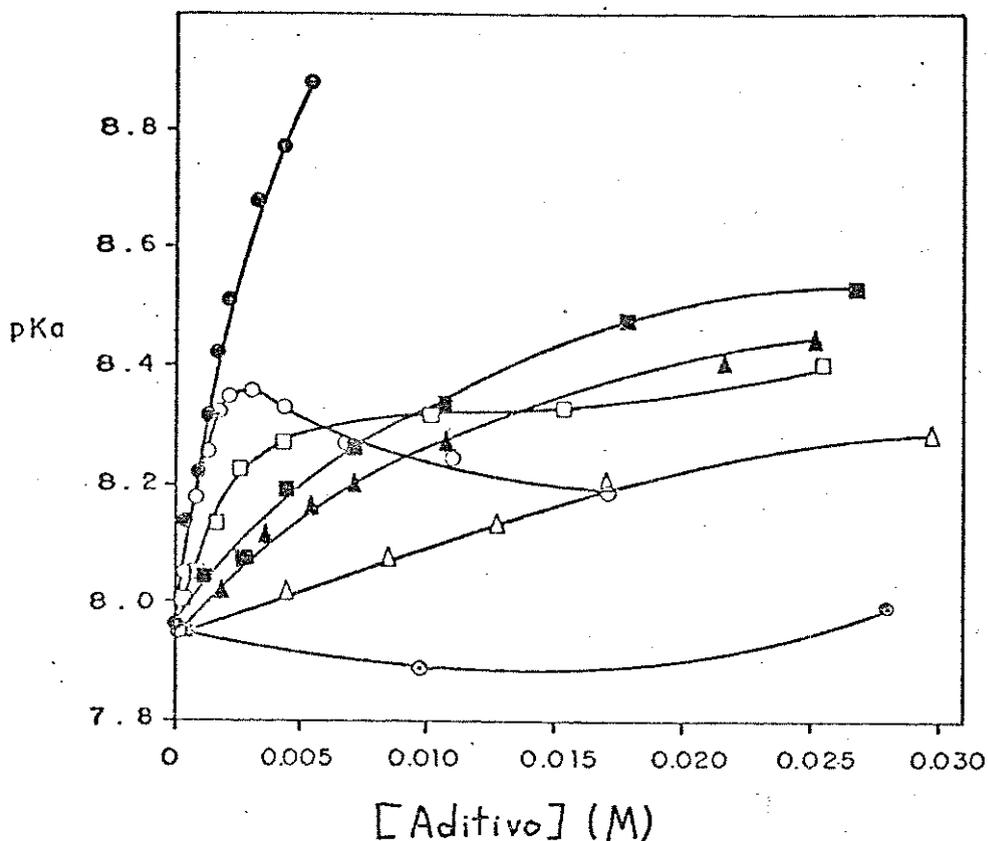
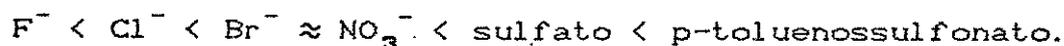


Figura 3.3.9. pKa aparente de metilparaben em solução de CTAB 1,3 mM, em função da concentração de aditivos :  $\circ$  -  $\text{F}^-$ ,  $\blacktriangle$  -  $\text{Br}^-$ ,  $\triangle$  -  $\text{Cl}^-$ ,  $\blacksquare$  -  $\text{NO}_3^-$ ,  $\odot$  - p-toluenossulfonato,  $\square$  -  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\bullet$  -  $\text{C}_{12}\text{EO}_9$

Comparando-se os efeitos de cada aditivo para um mesmo homólogo, é possível obter a seguinte série :



Na Tabela 3.3.4, a série obtida nesta tese é comparada com outros estudos da interação de ânions com micelas de CTAB. Esta

tabela mostra que, apesar da utilização de métodos, diretos e indiretos, bastante variados, os resultados são concordantes. Uma das discordâncias é a posição do íon sulfato na série obtida por Callahan e Cook <sup>228</sup>, em que este ânion aparece como o de menor interação. Naquele trabalho, a concentração de ânions utilizada foi de 0,1 M. Extrapolando o comportamento mostrado nas figuras 3.3.9 e 3.3.10 vemos que, devido ao patamar do pKa aparente que ocorre com a adição de sulfato, este deveria apresentar um efeito menor que os outros ânions a concentrações maiores.

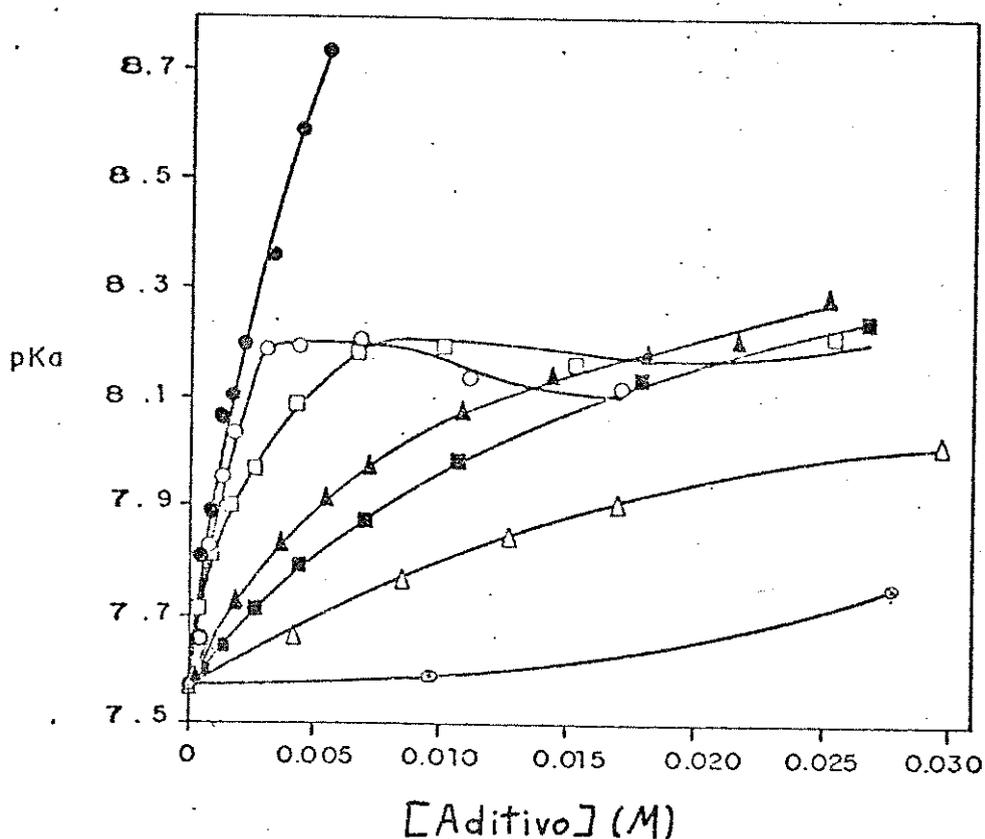


Figura 3.3.10. pKa aparente do propilparaben em solução de CTAB 1,3 mM em função da concentração de aditivos (mesmos símbolos da figura 3.3.9).

Sepúlveda e colaboradores investigaram extensivamente a interação de ânions com micelas de CTAB (24,25,27,28). Com este

objetivo, aqueles autores tentaram correlacionar as variações de potencial químico dos ânions para a transferência da água para as micelas de CTAB com várias propriedades dos ânions.

Tabela 3.3.4. Interação de ânions com micelas de CTAB

Método Utilizado	Intensidade da Interação	ref
medidas de pKa de sonda	$F^- < Cl^- < Br^-$	203
Ultrafiltração e variação na absorbância de um complexo metálico	$F^- < B_4O_7^{2-} < HPO_4^{2-} < Cl^- < SO_4^{2-}$ $< Br^- < NO_3^-$	225
solubilização de sondas	$F^- < OH^- < CO_3^{2-} < OAc^- < B_4O_7^{2-}$ $< HPO_4^{2-} < Cl^- < SO_4^{2-} < Br^-$ $< NO_3^-$	226
cinética de penetração de sondas em micelas e medidas de c.m.c	$OAc^- \approx F^- < Cl^- < Br^- < NO_3^-$ $< SO_4^{2-} < OBz^-$	227
aumento da absorbância de um complexo metálico	$SO_4^{2-} < Cl^- < Br^- \approx NO_3^-$	228
supressão de fluorescência	$F^- < Cl^- < Br^- \approx NO_3^-$	229
transição de micelas esféricas para cilíndricas	$Cl^- < Br^- < NO_3^- < p-TOS^-$	221

$OAc^-$  - acetato,  $OBz^-$  - benzoato e  $p-TOS^-$  - p-toluenossulfonato

Apesar dos estudos de Larsen e Magid<sup>230</sup>, em que foi observada uma relação quase linear entre  $\Delta_{trs}H$  para o processo de associação e o raio hidratado dos ânions, Sepúlveda et al.<sup>187</sup> não observaram uma correlação significativa entre  $\Delta_{trs}\mu$  dos por eles estudados, e seu respectivo raio hidratado. Outra tentativa foi a

comparação das  $\Delta_{\text{trs}}\mu$  dos ânions com as suas entropias de hidratação, que também não forneceu correlação significativa. As melhores correlações foram obtidas entre os valores de  $\Delta_{\text{trs}}\mu$  e as polarizabilidades e equivalentes-grama, este último considerado como uma medida do número de elétrons, de cada ânion. Neste caso, ânions mais polarizáveis, ou maiores, apresentaram uma maior interação com as micelas de CTAB.

Interpretando estes resultados em termos da teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson <sup>186</sup>, o cátion amônio comporta-se como um ácido mole. Os valores das equivalentes-grama dos ânions estudados nesta tese são (expressos em gramas por equivalente): fluoreto, 19; cloreto, 36; sulfato, 48; nitrato, 62 e brometo, 80. Assim, se considerarmos que o equivalente-grama pode ser usado como uma estimativa da polarizabilidade de cada ânion, a série obtida neste trabalho confirma as observações de Sepúlveda *et al.* <sup>187</sup>, confirmando a validade da utilização do modelo de ácidos e bases duros e moles de Pearson para a interação de ânions com micelas de hexadeciltrimetilamônio (CTA<sup>+</sup>).

Analisando as figuras 3.3.9 e 3.3.10, pode-se observar que, apesar de não possuir carga negativa, o surfatante não iônico tem um efeito sobre o pKa aparente maior do que os outros ânions. Além disto, a variação no pKa aparente é a mesma para os 4 homólogos estudados, ocorrendo uma pequena diferenciação a concentrações maiores de C<sub>12</sub>EO<sub>9</sub>. De fato, devido a suas características hidrofóbicas, espera-se que a interação do C<sub>12</sub>EO<sub>9</sub> com a micela seja bastante intensa. A formação de micelas mistas de CTAB e C<sub>12</sub>EO<sub>9</sub>, diminui a densidade de carga superficial em relação às micelas de CTAB puras e, conseqüentemente, o potencial eletrostático da superfície micelar. Entretanto, a concentrações maiores de C<sub>12</sub>EO<sub>9</sub>, entre 2 e 3 mM, os pKa aparentes dos parabens tornam-se maiores que os pKa em água. Isto indica que as micelas mistas passam a se comportar como micelas não iônicas, diminuindo a ionização dos parabens.

Meyer e Sepúlveda <sup>231</sup>, estudando a associação de contra-ions

a micelas mistas de CTAB e Brij 35, constataram que, a frações molares de CTAB menores que 0,2, a micela mista tinha características de micela não iônica. Com base neste comportamento, aqueles autores propuseram que é necessária uma densidade de carga superficial mínima para que haja a formação da camada de Stern em uma micela mista. Entretanto, este comportamento não foi observado em estudos de Yokoyama e colaboradores em micelas mistas de prostaglandina<sup>232</sup> e SDS e DTAC<sup>233</sup> com um surfatante não iônico. Aqueles autores estudaram a solubilização de anilinaftalenossulfonato (ANS) e acetilcolina naquelas micelas mistas e observaram uma redução gradual do coeficiente de partição das sondas para misturas com frações de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1. A ausência de variações bruscas indica que, pelo menos na faixa estudada, não ocorria mudança no comportamento da micela. A observação, a partir dos resultados desta tese, de que em soluções com concentrações próximas de CTAB e  $C_{12}EO_9$  as micelas mistas diminuíam a ionização dos parabens concorda com os resultados de Meyer e Sepúlveda<sup>231</sup>.

A adição dos álcoois mostra um comportamento semelhante ao observado com o surfatante não iônico, embora bem menos intenso. Quando analisado em função da quantidade de álcool adicionada, o efeito sobre o pKa aparente é maior para os álcoois mais hidrofóbicos, conforme mostra a figura 3.3.11. Os coeficientes de partição para álcoois em micelas de CTAB podem ser estimados a partir dos resultados de Gettings *et al.*<sup>234</sup>, extrapolando os valores para o etanol e propanol considerando um aumento linear de  $\ln K_{mv}$  com o número de átomos de carbono do álcool. A partir destes valores, é possível obter a figura 3.3.12, em que se expressa a variação no pKa aparente do propilparaben em função da fração de álcool na micela. Neste caso, observa-se uma tendência contrária à da figura 3.3.11 : para uma dada fração de álcool incorporada na micela, o efeito é maior para os álcoois menores.

Esta figura mostra uma tendência oposta à relatada por Miyashita e Hayano<sup>227</sup> estudando o efeito de álcoois sobre a velocidade de penetração de uma sonda em micelas de CTAB. Naquele

trabalho os efeitos de todos os álcoois estudados, do butanol ao heptanol, eram semelhantes, quando padronizados para a fração de álcool incorporada à micela. Esta aparente discrepância pode ser atribuída às diferentes faixas de concentrações de álcool utilizadas nesta tese e no trabalho de Miyashita e Hayano. Enquanto aqueles autores trabalharam com concentrações de álcool menores que 10 mM, nesta tese, devido ao menor efeito causado pela adição dos álcoois, trabalhou-se com concentrações variando de 0,5 até 4 M.

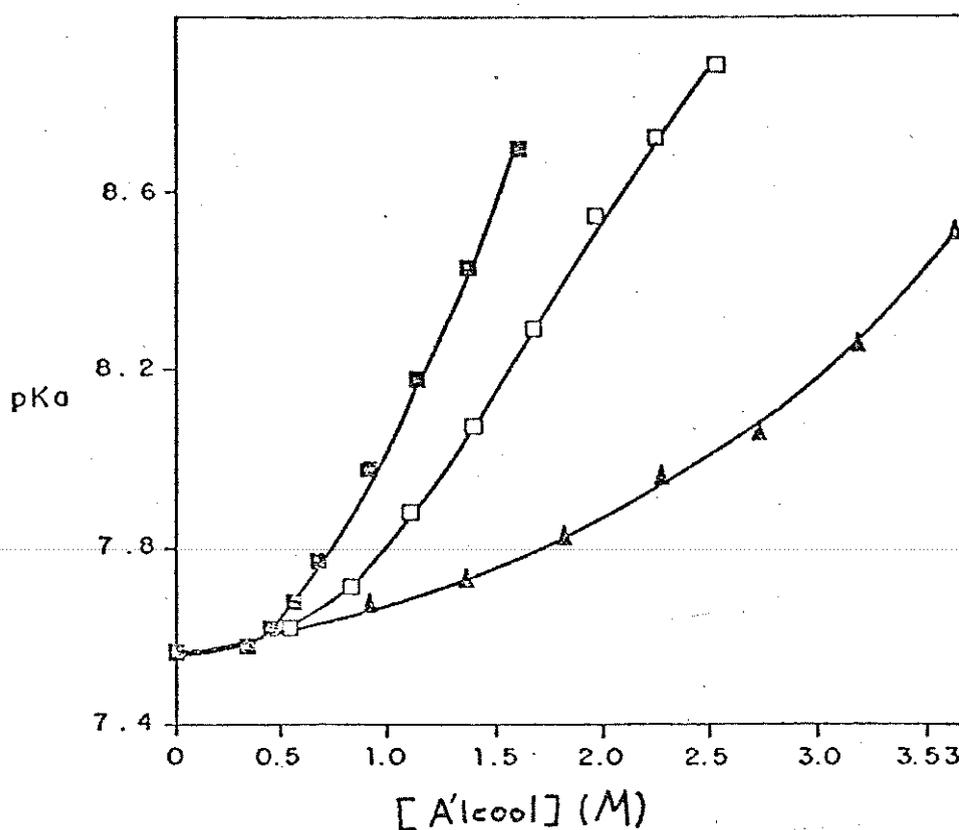


Figura 3.3.11. pKa aparente de propilparaben em função da concentração total de álcool adicionada.  $\Delta$  - etanol,  $\square$  - propanol e  $\blacksquare$  - butanol.

Estudos da formação de micelas em solventes mistos <sup>235,236</sup> mostram que a adição de álcoois de cadeia curta tem um efeito bifásico : a baixas concentrações, facilita a micelização;

enquanto a concentrações maiores, dificulta este processo, chegando mesmo a inibi-lo a concentrações maiores <sup>235</sup>. Recentemente, Oroni e colaboradores <sup>236</sup> mostraram que outras propriedades do sistema água/álcool têm uma variação brusca na mesma região em que ocorre a mudança na ação do álcool sobre a micelização. Baseados nestes resultados, foi proposto que o efeito dos álcoois sobre a micelização pode ser atribuído à ruptura das estruturas formadas pela água para acomodar pequenas quantidades de álcool na estrutura por ela formada no estado líquido. Assim, o efeito de álcoois nas propriedades micelares é devido principalmente a seu efeito sobre o solvente.

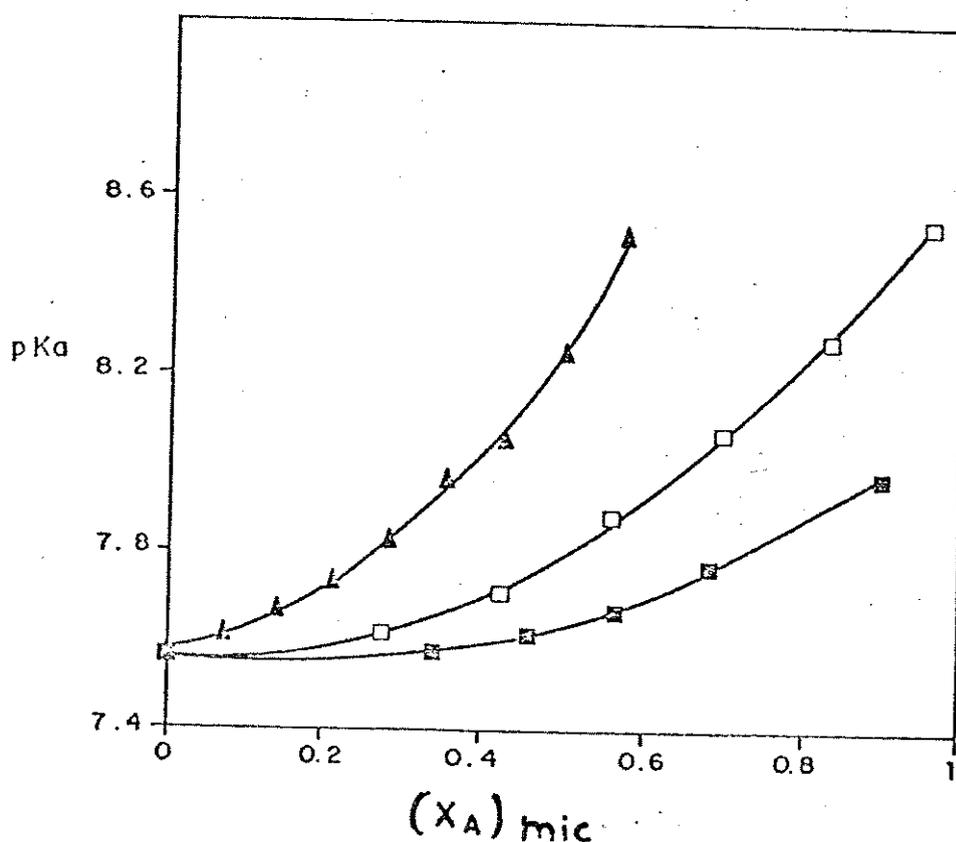


Figura 3.3.12. pKa aparente de propilparaben em função da fração molar de álcool na micela (ver texto). Δ - etanol, □ -propanol e ■ - butanol.

Assim, devido às altas concentrações do álcool utilizadas em nossos estudos, seu efeito predominante é o de modificar as propriedades do sistema solvente, dificultando a formação de micelas. Este comportamento é diferente do observado por Miyashita e Hayano, a concentrações menores de aditivo, em que havia um aumento da velocidade de incorporação da sonda na micela com a adição dos álcoois. Com o aumento na c.m.c. do CTAB causado pelos álcoois, diminuiria a quantidade de micelas e, conseqüentemente, o efeito destas sobre o pKa aparente dos parabens. Entretanto, Lianos e Zana<sup>237</sup> relataram que a adição de butanol a micelas de CTAB provocava uma diminuição do número de agregação de 80 para 20, para uma concentração de butanol de 0,85 M, formando micelas mistas com até 70 moléculas de butanol.

Além disto, observa-se que a concentrações maiores de álcool o pKa aparente é maior do que o pKa em água, do mesmo modo que observado com a adição de Genapol. Este efeito pode ser atribuído à inibição da formação de micelas ou à formação de micelas mistas de comportamento semelhante ao das não iônicas. Segundo Ionescu e colaboradores<sup>235</sup>, esta inibição ocorre em frações volumétricas em torno de 10 a 15% em álcool. De fato, analisando a figura 3.3.11., observa-se que valores de pKa aparente maiores que o pKa em água,  $(pK_a)_w = 8,40$ , ocorrem em frações volumétricas dos álcoois entre 16-18%, em concordância com as observações de Ionescu *et al.*<sup>235</sup>.

### 3.4. Interação dos Parabens com Polieletrólitos, Eritrócitos e Lipossomas

Nesta seção apresentamos os resultados obtidos no estudo da interação dos parabens com outros sistemas biomiméticos, como polieletrólitos e lipossomas preparados com surfatantes sintéticos, e com membranas de eritrócitos de rato. O objetivo destes estudos foi estender, de maneira exploratória, os estudos realizados com micelas a outros sistemas de características semelhantes, como os polieletrólitos. O estudo envolvendo eritrócitos foi desenvolvido com o objetivo de estudar a interação dos parabens com um sistema biológico real. A interação destes compostos com lipossomas foi estudada por calorimetria diferencial de varredura (DSC), com o objetivo de relacionar o efeito protetor dos parabens contra hemólise hipotônica com possíveis variações causadas sobre a temperatura de transição de fase dos lipossomas.

#### 3.4.1. Efeito de Polieletrólito sobre o Equilíbrio de Ionização dos Parabens

Quando em solução aquosa, os polieletrólitos assumem uma conformação de modo a balancear a solvatação dos grupos ionizados com a menor exposição de suas regiões hidrofóbicas. O mesmo comportamento é observado para proteínas em solução aquosa. Assim, esta conformação depende do tipo de polieletrólito e do número de grupos dissociados, que pode ser afetado pela presença de outros eletrólitos e pela constante dielétrica do meio. Dependendo destes parâmetros, alguns polieletrólitos assumem conformações em que existem domínios hidrofóbicos, menos acessíveis à água <sup>238, 239</sup>. Estas características assemelham-se às de micelas iônicas, em que existe uma região de características hidrofóbicas com os grupos eletricamente carregados fazendo a interface com o solvente. Estas semelhanças explicam o efeito de polieletrólitos catalisando reações químicas <sup>240, 241</sup> e alterando os valores de pKa aparente de alguns solutos <sup>242</sup>.

Utilizando-se desta semelhança, Morishima e colaboradores <sup>243</sup> aplicaram o método de medidas de pKa aparente e variação do  $\lambda$  máximo de absorção de sondas quimicamente ligadas à estrutura do polímero para determinar o potencial eletrostático e a constante dielétrica efetiva de polieletrólitos. Comparando-se estes resultados com os obtidos por Drummond et al. <sup>204</sup>, com micelas, observa-se que os potenciais eletrostáticos são próximos, enquanto as constantes dielétricas efetivas são maiores. Estes valores indicam que, no caso dos polieletrólitos a estrutura é mais aberta e mais acessível à água do que as micelas. Ainda segundo aquele estudo, com a adição de eletrólitos os valores de  $\Psi$  e a polaridade diminuem, indicando que, com a neutralização da carga elétrica do polímero, este assume uma conformação mais compacta. Determinações de pKa aparente de fenóis substituídos na presença de polications <sup>242</sup> mostraram deslocamentos no pKa, em relação ao valor em água, de até 3 unidades, um efeito semelhante ao registrado com micelas, conforme descrito na seção 3.3.

O polieletrólito utilizado foi a polietilenoimina (PEI), um polímero obtido pela polimerização da etilenimina (aziridina). Uma descrição detalhada da síntese, caracterização e de algumas propriedades desta família de polieletrólitos foi apresentada recentemente por Kobayashi <sup>244</sup>. Este polímero foi escolhido porque já existe um estudo de efeito sobre o pKa de solutos, com o qual nossos resultados podem ser comparados <sup>242</sup>. Além disto, este polieletrólito possui grupos amônio, do mesmo modo que o CTAB, e não possui grupos cromóforos, permite o estudo da ionização dos parabens por espectrofotometria.

Foi realizada uma tentativa de determinação da massa molar média do polieletrólito através de osmometria de pressão de vapor. As medidas foram realizadas em solução 0,01 M tanto em NaOH quanto em NaCl para reduzir a contribuição da ionização do polication, segundo o procedimento sugerido por van den Berg e colaboradores <sup>245</sup>. Entretanto o polieletrólito apresentou uma diminuição da solubilidade nestas condições, levando a soluções turvas a maiores

concentrações. Além disto, devido à alta massa molecular do polímero, as variações medidas foram muito pequenas para permitir a obtenção de resultados reprodutíveis. O valor fornecido para a massa molecular média do produto vendido pela Aldrich é entre 50000 e 60000 g.mol<sup>-1</sup> 246.

As medidas de pKa aparente foram realizadas espectrofotometricamente utilizando uma solução de PEI neutralizada com HCl até pH aproximadamente 8. Uma solução de PEI 6 g.l<sup>-1</sup> apresentava um pH em torno de 11. Para levar este valor a 8, era necessária a adição de HCl até uma concentração de aproximadamente 0,03 M. A concentração de PEI foi calculada a partir do valor fornecido pelo fabricante, 48% em peso. Foi feita uma tentativa de determinação da concentração do polication através de medidas da variação do índice de refração com a concentração de PEI. Entretanto, esta variação não pôde ser detectada na faixa de concentração até que as soluções começassem a se apresentar turvas.

A relação entre as concentrações das formas neutra e aniônica dos parabens foi medida em 302 nm. Algumas soluções mais concentradas em PEI eram ligeiramente turvas e a absorbância devida a esta turbidez foi descontada do valor medido. O pH após adição do polieletrólito foi medido com eletrodo de vidro. As mesmas medidas foram repetidas em uma solução tampão de Tris.HCl, 10mM em Tris e pH 8,0, e em presença de NaCl 0,05 M. Estas medidas foram realizadas utilizando metil, propil e pentilparaben. Os resultados obtidos para propil e pentilparaben, idênticos aos com metilparaben, são mostrados na figura 3.4.1.

Da análise desta figura, observamos que :

- o polication provoca uma redução no pKa aparente dos parabens a baixas concentrações do polieletrólito, menos de 2 g.l<sup>-1</sup>, atingindo um patamar a partir deste valor, até o limite de concentração estudado, em torno de 6 g.l<sup>-1</sup>;

- o efeito do polication foi o mesmo para todos os homólogos estudados;

- a variação no pKa aparente provocada pelo PEI foi menor nas soluções com tampão, e imperceptível nas soluções em que foi adicionado NaCl na concentração de 0,05 M.

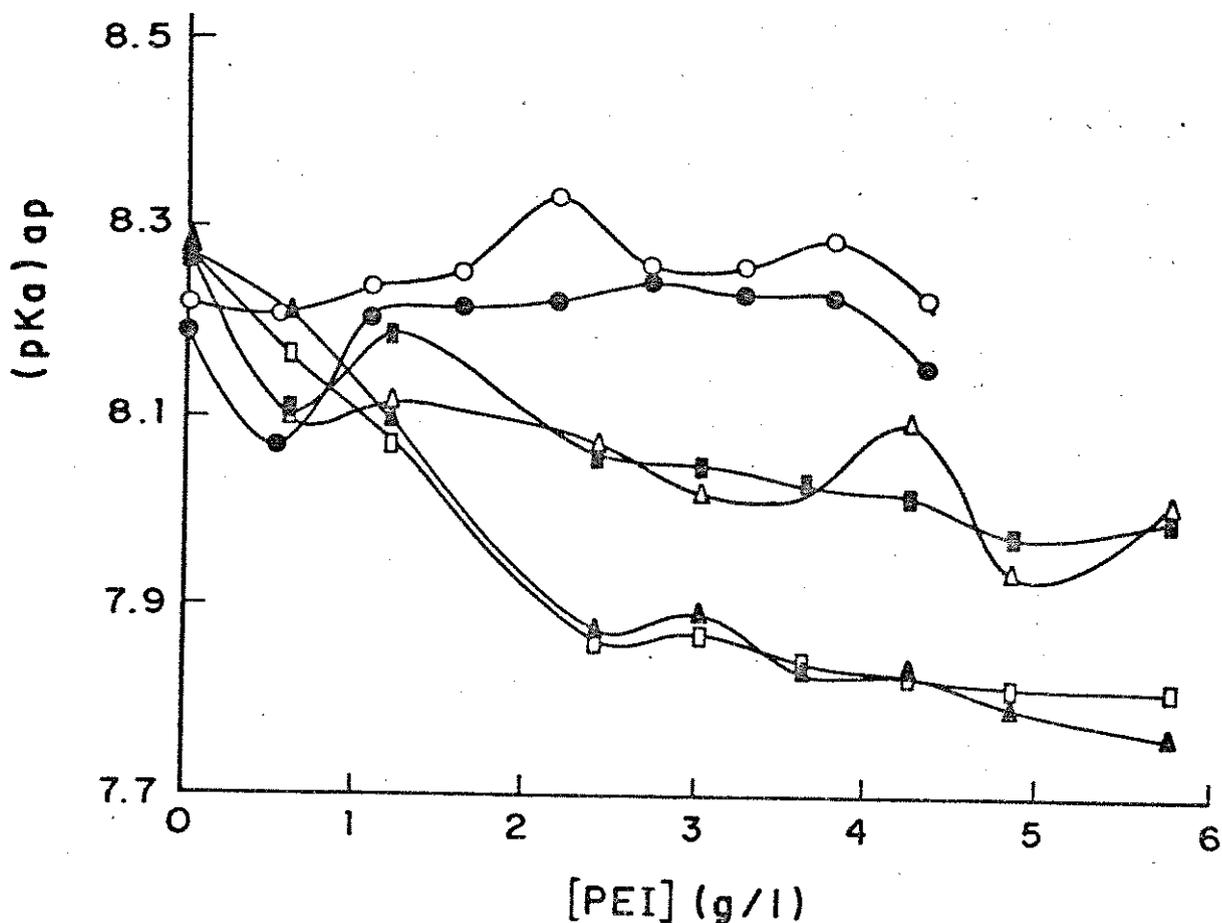


Figura 3.4.1. Ionização dos parabens em função da concentração de PEI. Concentração dos parabens em torno de  $2 \times 10^{-5}$  M. Em meio não tamponado :  $\Delta$  - propil e  $\square$  - pentil; com tampão Tris-HCl :  $\Delta$  - propil e  $\blacksquare$  - pentil; em meio não tamponado, com NaCl 0,05 M :  $\circ$  - propil e  $\circ$  - pentil.

Destes resultados observamos que, diferentemente da interação com micelas, o efeito de PEI sobre a ionização dos parabens não tem caráter hidrofóbico. Se assim fosse, seria esperada uma maior interação dos compostos mais hidrofóbicos. Isto pode ser interpretado como um indicativo de que, nas condições estudadas, a estrutura deste polycation não apresenta sítios hidrofóbicos acessíveis para o soluto. Este comportamento é diferente, por

exemplo, do observado por Yang e Engberts <sup>239</sup> analisando a fluorescência de pireno em soluções de polialquilmetil dialilamônio. Assim, o efeito do polieletrólito sobre a ionização dos parabens pode ser creditado somente à interação eletrostática entre o polícatión e a espécie aniônica do paraben. O caráter eletrostático da interação é comprovado pela redução do efeito em soluções tamponadas, devido à competição com ânions cloreto do tampão, e pela sua supressão em soluções mais concentradas em NaCl.

Observa-se também que os valores de  $\Delta pK_a$  obtidos são menores que os relatados por Arcelli e Concilio <sup>242</sup>, estudando a ionização de fenóis substituídos em presença de PEI. Entretanto, as maiores variações de  $pK_a$  obtidas naquele estudo foram observadas quando o soluto possuía um substituinte aniônico, o que aumentaria a interação com o polícatión. Quando os compostos estudados não tinham carga elétrica, a variação máxima observada foi de 0,7 unidades de  $pK_a$ . Estes valores estão bem próximos dos obtidos com os parabens, cujos  $\Delta pK_a$  máximos estão em torno de 0,5 unidades. Ainda em relação a este estudo, quando o fenol utilizado tinha um substituinte catiónico, como o dimetilanilínio, não foi observada variação significativa do  $pK_a$ , o que pode ser atribuído à repulsão entre os grupos de mesma carga do soluto e do polímero.

#### 3.4.2. Interação dos parabens com eritrócitos

Os eritrócitos são muito utilizados em estudos da interação de drogas com sistemas biológicos por dois motivos principais: sua importante função nos processos vitais dos seres vivos, principalmente o transporte de gases, e sua relativa simplicidade e facilidade de manuseio. Os eritrócitos maduros são células anucleadas abundantemente presentes no sangue. As hemácias humanas, em um meio isotônico, têm um formato discóide com um diâmetro aproximado de 7 a 8  $\mu m$ . Este formato confere ao eritrócito uma área superficial de excesso, em relação a uma

esfera de mesmo volume. Este formato é importante para permitir o deslocamento desta célula por fendas e capilares de tamanho menor que 7  $\mu\text{m}$ . Este comportamento também é possível devido à deformabilidade e resistência à fragmentação de sua membrana <sup>247</sup>.

As características mais importantes das membranas biológicas já foram descritas na Introdução desta tese. Outra característica importante dos eritrócitos é que eles possuem uma assimetria na distribuição dos fosfolipídios entre as camadas externa e interna da membrana, com predominância de carga positiva na externa, e de carga negativa na interna <sup>247</sup>.

A integridade das células é mantida por um ténue equilíbrio entre diversos fatores. Além da já citada interação hidrofóbica, que tem um importante papel na estruturação das membranas, outro fator importante é o equilíbrio osmótico. As células, nos seres vivos, encontram-se em um meio isotônico a uma concentração de 0,9% em peso de NaCl. Certos compostos químicos, ao interagirem com as células, podem afetar este equilíbrio, facilitando ou dificultando o extravasamento do material contido pela membrana. No caso dos eritrócitos, este processo é chamado de hemólise.

Desta maneira, a avaliação do tipo e da extensão do efeito causado pela droga fornece informações sobre a interação da droga com a membrana da hemácia. Vários estudos vêm avaliando o efeito hemolítico ou eritroprotetor de drogas. Hammarlund e colaboradores <sup>248</sup>, por exemplo, vêm apresentando uma extensa compilação do efeito hemolítico de várias drogas. Hansch e Glave <sup>249</sup> aplicaram correlações do tipo QSAR para analisar o efeito hemolítico de uma série de compostos e observaram uma semelhança com as relações obtidas para os seus efeitos antibacterial e narcótico. Seeman e colaboradores <sup>250,251</sup> também observaram uma correlação entre o efeito hemolítico de álcoois e fenóis e sua incorporação na membrana dos eritrócitos, como suporte à teoria que relaciona efeito sobre a membrana com atividade anestésica. Esta correlação também foi relatada para derivados catiónicos da fenotiazina, por Harie et al. <sup>252</sup>.

Osorio e Castro *et al.* <sup>253</sup> observaram que a atividade hemolítica de álcoois, glicóis e acetais variava em função do número de grupos metileno de cada composto, atingindo um efeito máximo para compostos que possuíam entre 10 e 12 grupos CH<sub>2</sub>. Estudos com compostos anfifílicos como detergentes não iônicos <sup>254, 255</sup> e ácidos graxos <sup>256</sup> revelaram um comportamento bifásico frente à hemólise. A concentrações baixas, estes compostos apresentaram um efeito protetor, enquanto a concentrações maiores, causaram um aumento na hemólise.

Aki e Yamamoto <sup>257</sup> estudaram calorimetricamente a hemólise causada por fenotiazinas e drogas anti-inflamatórias. Eles observaram que a hemólise é um processo endotérmico, e que a quantidade de calor liberada está diretamente relacionada à quantidade de hemoglobina liberada das células. Observaram também que no caso dos anti-inflamatórios, drogas aniônicas, o processo era composto por duas fases : a primeira, exotérmica, que predominava até 30 minutos, atribuída à interação da droga com as membranas, e a segunda, endotérmica, acompanhada por liberação de hemoglobina. No caso das fenotiazinas, catiônicas, a interação era sempre endotérmica e acompanhada de liberação de hemoglobina.

Uma importante contribuição foi a fornecida por Ogiso e colaboradores <sup>258</sup>, que realizaram um extenso estudo da interação de drogas com eritrócitos. Uma das principais observações, a partir de estudos de microscopia eletrônica foi a de que, com a adição das drogas hemolíticas ocorriam mudanças morfológicas nos eritrócitos. A concentrações em que se iniciava a hemólise, havia um inchamento das hemácias e, a concentrações maiores, o aparecimento de espículas que estavam associadas a um extravasamento total da hemoglobina contida em cada célula. Assim, estes estudos evidenciaram que uma determinada percentagem de hemólise significa a liberação de uma fração da hemoglobina contida na célula devido à fragilização das membranas, e não a ruptura de uma determinada fração das hemácias.

### 3.4.2.1. Ensaio Hemolíticos com os Parabens

A interação dos parabens com eritrócitos foi avaliada a partir do efeito destes compostos sobre a resistência de hemácias à hemólise hipotônica. Nestes experimentos, verifica-se o efeito de um determinado composto sobre a quantidade de hemoglobina liberada em uma suspensão de hemácias em um meio hipotônico. Estes ensaios foram realizados utilizando eritrócitos de rato, preparados segundo procedimento descrito no capítulo Experimental.

Uma quantidade fixa de hemácias foi suspensa em soluções de parabens de concentração em torno de  $6 \times 10^{-4}$  M e concentrações variáveis de NaCl. Após 15 minutos de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , a quantidade de hemoglobina liberada foi determinada espectrofotometricamente a 548 nm. A percentagem de hemólise foi calculada em relação a controles de hemólise nula e total. De modo a levar em consideração possíveis variações em cada amostra, inerentes ao uso de amostras coletadas de diferentes cobaias, os resultados obtidos expressam experimentos em duplicata e utilizando sangue de, pelo menos, dois animais diferentes. Estes resultados são mostrados na figura 3.4.2.

O efeito dos parabens sobre a resistência à hemólise hipotônica pode ser verificado em comparação com a curva hemolítica controle. Desta maneira, verifica-se que estes compostos apresentam um efeito eritroprotetor. Um parâmetro de medida desta proteção é o deslocamento em relação à curva controle. Assim, em um determinado nível de hemólise, esta distância pode ser interpretada como a variação na concentração de NaCl, ou na pressão osmótica, que a hemácia suporta, devido à interação com o paraben, mantendo o mesmo nível de hemólise de uma solução sem o composto. Com base neste parâmetro, observa-se que, na faixa de concentrações utilizadas, o metilparaben não apresenta efeito significativo e que, para os demais homólogos, a proteção aumenta com a cadeia carbônica. Este efeito protetor já havia sido relatado por Machleidt et al. <sup>251</sup> para o metilparaben, utilizando

sangue humano. No caso de bactérias, especificamente *Serratia Marcescens*<sup>60</sup>, entretanto, foi observado que a interação com os parabens aumentava a liberação de material intracelular como íons inorgânicos e nucleotídeos. Este efeito foi proposto como uma das causas de sua atividade bactericida.

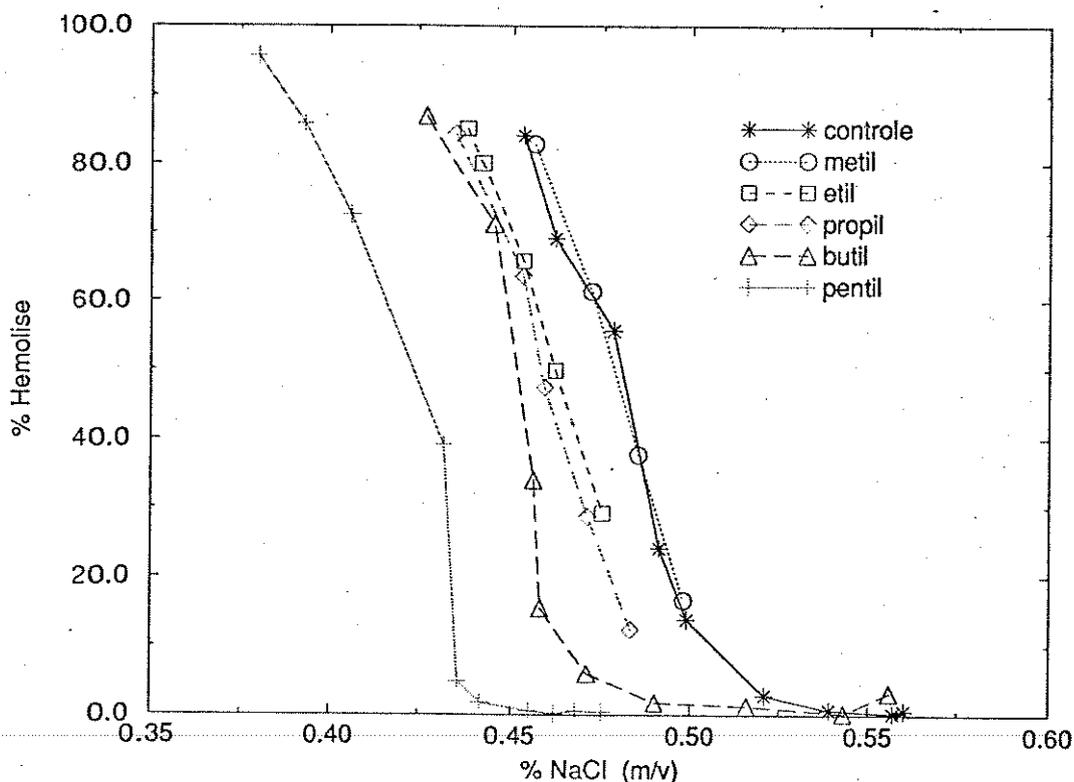


Figura 3.4.2. Efeito dos parabens sobre a resistência de eritrócitos de rato à hemólise hiposmótica. [Paraben] =  $6 \times 10^{-4}$  M.

Machleidt et al.<sup>251</sup> estudaram o efeito protetor contra hemólise de uma grande quantidade de fenóis substituídos. Aqueles autores verificaram que o efeito protetor, expresso como o logaritmo da concentração de droga em que a hemólise é de 50%, apresenta uma relação linear com o logaritmo do seu coeficiente de partição entre água e octanol. Este resultado indicou que, apesar das diferenças entre os substituintes dos fenóis, que levam a diferentes parâmetros estéricos e eletrônicos, os seus efeitos

diferentes parâmetros estéricos e eletrônicos, os seus efeitos eritroprotetores eram comparáveis quando normalizados através dos seus coeficientes de partição entre água e octanol. Assim, esta proteção parece não ter caráter específico, dependendo apenas da quantidade de composto incorporado na membrana. Também foi sugerido que a incorporação de drogas provoca uma fluidização da membrana de eritrócitos<sup>258</sup>, que levaria a uma maior resistência contra o estresse hipo-osmótico. Estes mecanismos devem estar envolvidos na interação dos parabens com os eritrócitos.

#### 3.4.2.2. Determinação do Coeficiente de Partição dos Parabens entre Água e Membrana de Eritrócitos

Para verificar a observação feita por Machleidt e colaboradores<sup>251</sup>, citada acima, estudamos a interação dos parabens com membranas de eritrócitos, "ghosts". Soluções de paraben de concentração em torno de  $10^{-5}$  M foram deixadas em contato com aproximadamente 1 mg de "ghosts". Após centrifugação, e adição de uma solução diluída de NaOH, a quantidade de soluto livre foi determinada espectrofotometricamente em 310 nm. Este comprimento de onda foi escolhido para diminuir eventuais interferências de, por exemplo, proteínas extraídas das membranas. O método colorimétrico sugerido por Machleidt *et al.*<sup>251</sup> não foi sensível o bastante para as concentrações de paraben utilizadas.

Entretanto, os resultados obtidos, como médias de 4 determinações para cada homólogo, apresentaram uma grande dispersão com estimativas de desvio padrão em torno de 15%. Os coeficientes de partição foram calculados como

$$K_p = C_{memb} / C_v \quad [a]$$

onde  $C_{memb}$  é o número de moles de soluto por kg de membrana, e  $C_v$ , a concentração molar do soluto na fase aquosa.

Os valores médios obtidos foram : 477, 520, 460, 762 e 1573, respectivamente para os cinco primeiro homólogos, com um desvio padrão estimado de até 15%. Os valores para os dois primeiros compostos encontram-se fora da tendência de aumento de  $K_p$  com o aumento da cadeia alifática. Isto pode ser atribuído à baixa incorporação destes compostos nos fragmentos da membrana. Machleidt *et al.* <sup>251</sup> propuseram que o coeficiente de partição entre água e "ghosts" de sangue humano seria  $1/5$  do valor do coeficiente de partição entre água e octanol. Segundo esta avaliação, os valores esperados para os cinco primeiro homólogos desta família seriam : 18, 59, 219, 743 e 2578 <sup>16</sup>. Comparando-se estes valores com os por nós obtidos, verifica-se que os valores são semelhantes apenas para o butilparaben, e que o incremento por grupo metileno é bem maior que o estimado a partir dos nossos resultados.

### 3.4.3. Efeito dos parabens sobre a transição de fase de lipossomas

Conforme discutido anteriormente, uma das propostas para explicar o efeito de drogas sobre a resistência hemolítica envolve um aumento na fluidez da membrana devido à incorporação da droga <sup>258</sup>. Um modelo mais simples que pode ser utilizado para estudar o efeito de drogas sobre a estabilidade e organização de biomembranas são os lipossomas. Estes também são arranjos fechados de surfatantes organizados em bicamada. A ordenação da estrutura depende do tipo de surfatante que a compõe, e de outros fatores como a temperatura em que os sistema se encontra. Com o aumento da temperatura, este arranjo passa de uma estrutura mais ordenada, na fase de gel, para um arranjo em que as moléculas do surfatante e os grupos adquirem maior mobilidade das cadeias e de rotação das ligações químicas, na fase de cristal líquido <sup>259</sup>. Esta temperatura é chamada temperatura de transição de fase,  $T_c$ .

Inoue e colaboradores <sup>260</sup>, determinaram que surfatantes

catiônicos de cadeias carbônicas  $C_{10}$  e  $C_{12}$  tinham um efeito bifásico sobre a temperatura de transição de lipossomas, enquanto os de cadeia  $C_8$  e  $C_{14}$ , respectivamente, diminuíam e aumentavam  $T_c$ . Um comportamento bifásico semelhante foi relatado para o efeito de surfatantes sobre a resistência hemolítica de eritrócitos <sup>254-256</sup>. Outro paralelo entre lise e transição de fase em lipossomas pode ser feito a partir dos resultados obtidos por Jaeger e colaboradores <sup>261</sup>. Estudando lipossomas formados por surfatantes catiônicos aqueles autores observaram que a ordenação e o empacotamento dos surfatantes aumenta na mesma sequência que as temperaturas de transição de fase. Assim,  $T_c$  poderia ser utilizada como parâmetro de avaliação do efeito de drogas sobre a ordenação dos lipossomas.

Além disto, a variação de  $T_c$  provocada pela incorporação de uma droga pode ser utilizada para determinar o coeficiente de partição deste composto entre a fase aquosa e a hidrofóbica, conforme descrito por Kaminoh *et al.* <sup>262</sup>. Variações na temperatura de transição de fase também foram utilizadas para detectar fusão de lipossomas induzida por derivados de polietilenoglicol <sup>263</sup>.

Por estes motivos, nos propusemos a estudar a transição de fase de lipossomas de cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC) em água e em presença dos parabens. Para preparação dos lipossomas, uma certa quantidade de DODAC foi dissolvida em  $CHCl_3$  e depois seca, em fluxo de nitrogênio e deixada por 1 hora ligada a uma bomba de vácuo. A seguir, foi adicionada a quantidade necessária de água ou solução de paraben e a amostra deixada em um banho de ultra-som por 40 minutos, entre 45 e 50°C. As concentrações de DODAC utilizadas foram entre 10 a 20 mM. As amostras assim preparadas apresentavam-se levemente turvas e foram utilizadas, no máximo, 4 dias após a preparação. Os lipossomas preparados desta maneira são unilamelares e de diâmetro médio em torno de 500 Å <sup>264</sup>.

As temperaturas e entalpias de transição de fase foram determinadas através da calorimetria diferencial de varredura

(DSC). As análises empregavam tipicamente 20 mg de amostra e 15 mg de água como referência. As varreduras foram efetuadas em duas velocidades diferentes, a 3 e 5 graus/minuto, entre 0 e 70°C. Neste caso, confirmou-se que velocidades maiores proporcionavam sinais mais intensos detectados pelo aparelho. Usualmente, este tipo de medidas é feito utilizando um aparelho de DSC de alta sensibilidade, também chamado micro-DSC. Nestes casos, as velocidades de varredura empregadas são menores que 1 grau/minuto <sup>263, 265, 266</sup>. Velocidades de varredura mais altas podem levar a problemas como gradientes de temperatura no interior da amostra que afastariam a transição das condições de equilíbrio. Neste sentido, Benoist <sup>267</sup> mostrou que, mesmo a velocidades de varredura muito baixas, os termogramas obtidos para estas transições em mesofases apresentavam diferenças.

Alguns termogramas obtidos são mostrados nas figuras 3.4.3 a 3.4.5. Devido às baixas energias envolvidas nesta transição, e às baixas concentrações das amostras, os resultados obtidos encontravam-se perto dos limites de detecção do aparelho, um DSC convencional. Por isto, com amostras de concentração menor que 10 mM ou utilizando velocidades de varredura menor que 4 graus/minuto não foi possível detectar o pico relativa à transição. Um aumento na concentração do surfatante poderia levar à formação de mesofases, que também apresentam transições de fase na região entre 38 e 42°C <sup>268, 269</sup>. Na tentativa de aumentar a intensidade do sinal observado, evitando a formação de mesofases, concentramos uma amostra de lipossomas, de concentração original próxima a 10mM. Estas amostras foram colocadas em sacos de diálise, e o solvente retirado por evaporação até que a amostra tivesse 1/5 de seu volume inicial. Entretanto, a amostra final tinha aparência bastante turva e alta viscosidade, indicando a formação de outras fases.

Como resumo dos resultados obtidos, citamos :

- para amostras de DODAC, com concentração entre 10 e 20mM, as temperaturas de transição observadas variaram entre 36 e 40°C, e as entalpias de transição, entre 17 e 25 kJ.mol<sup>-1</sup>;

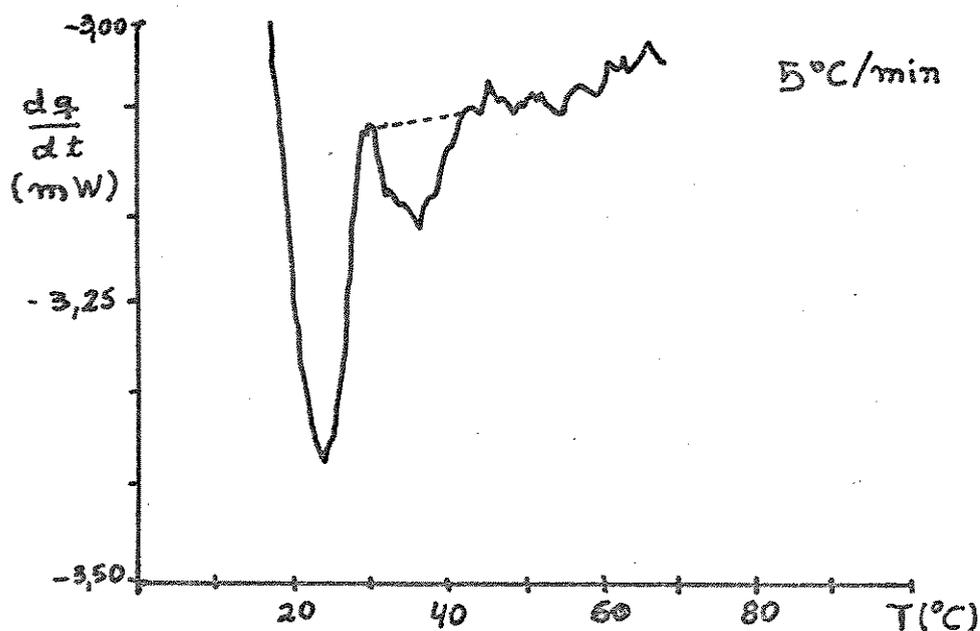


Figura 3.4.3. Termograma obtido por DSC para lipossomas de DODAC 19 mM, em água.

- com a adição de pentilparaben, na concentração de  $6 \times 10^{-4}$  M,  $T_c$  variou entre 36 e 39 °C, e  $\Delta H$ , entre 13 e 45  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Os experimentos realizados com propilparaben, na mesma concentração forneceram valores de  $T_c$  entre 39 e 40°C e  $\Delta H$  entre 33 e 42  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Com metilparaben, também  $6 \times 10^{-4}$  M, a  $T_c$  medida foi 38°C e o  $\Delta H$ , 25  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

- a adição de pentilparaben a concentrações maiores, na proporção 1:2 em relação ao DODAC, produziu soluções bem mais turvas, embora sem precipitação no intervalo de 4 dias após a preparação. Os termogramas destas amostras, preparadas e analisadas em duplicata, não apresentaram nenhum pico na região de 20 a 70°C. As amostras com menor concentração dos solutos apresentavam uma razão entre as concentrações de paraben e DODAC na faixa de 0,03:1 a 0,06:1. Estes resultados indicam que uma maior concentração de paraben, com razão de concentrações 0,5:1 impede a formação dos lipossomas.

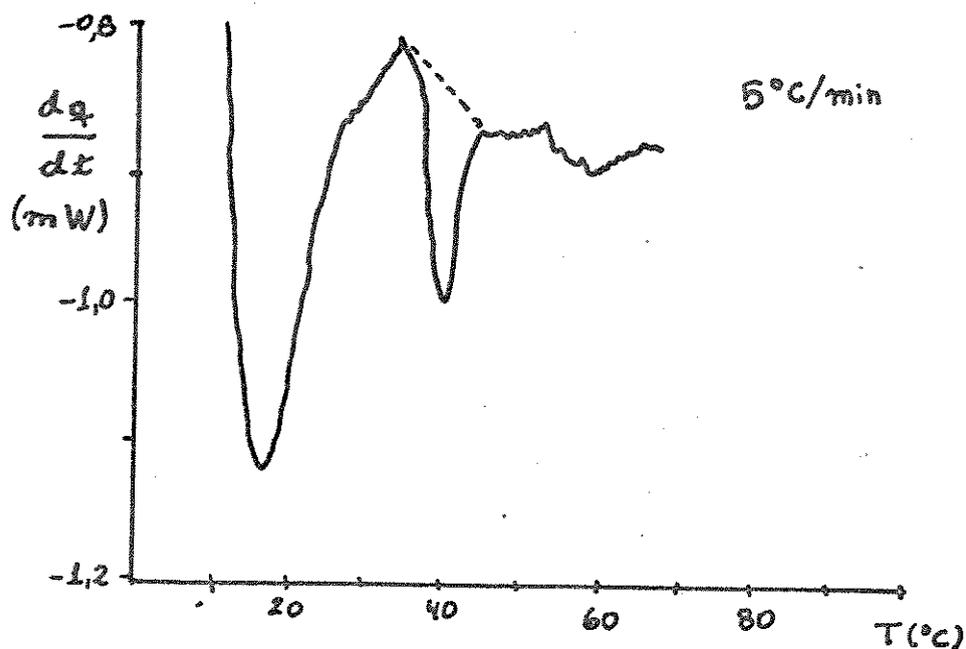


Figura 3.4.4. Termograma obtido por DSC para lipossomas de DODAC 18 mM, em presença de pentilparaben  $6 \times 10^{-4}$  M.

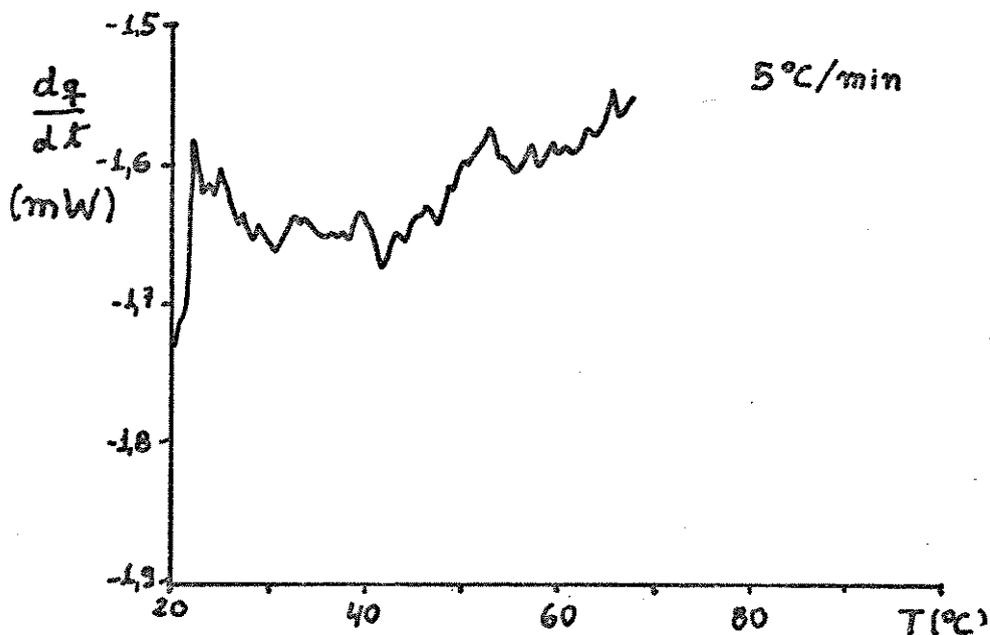


Figura 3.4.5. Termograma obtido por DSC para solução de DODAC 21 mM em presença de pentilparaben 11 mM.

Apesar dos problemas com a sensibilidade do aparelho para este tipo de estudo, levando a valores pouco reprodutíveis, os resultados obtidos estão próximos dos descritos para sistemas semelhantes. Okahata e colaboradores<sup>270</sup> estudaram calorimetricamente lipossomas de DODAB, brometo de dioctadecildimetilamônio em concentrações em torno de 20 mM. Os lipossomas preparados por ultra-sonificação apresentaram um pico largo devido à transição de fase, entre 40 e 50°C, com uma entalpia de transição estimada, para o pico principal, 45°C, de 27 kJ.mol<sup>-1</sup>.

Outro estudo envolvendo vesículas de DODAB foi o realizado por Jaeger e colaboradores<sup>261</sup>. Os termogramas obtidos por DSC para estes lipossomas confirmaram a dependência dos resultados com o método de preparação. Os lipossomas preparados por ultra-sonificação apresentaram duas populações com diâmetros médios de 200 e 600 Å, e um pico largo devido à transição de fase, com picos em 32 e 57°C. Quando a mostra foi preparada por agitação vigorosa, aqueles autores observaram três populações de lipossomas, com diâmetros médios de 570, 1900 e 12000 Å. A última população foi atribuída à agregação das vesículas. A análise por DSC destas amostras revelou três picos em 33, 46 e 52°C.

Através destes estudos de DSC observamos que foi possível detectar a transição de fase de lipossomas de DODAC, embora trabalhando nos limites de detecção do aparelho e em altas velocidades de varredura. Apesar da pouca reprodutibilidade dos resultados, os valores de Tc e energias de transição obtidos são próximos dos relatados para sistemas semelhantes. Entretanto, estes problemas não possibilitaram verificar a hipótese inicial deste estudo : de que a incorporação dos parabens nos lipossomas modificaria a temperatura de transição de fase e que esta variação seria um reflexo de mudanças na ordenação dos lipossomas, comprovando o efeito eritropotetor destes compostos.

#### 4. CONCLUSÃO

Os estudos de difusão foram realizados na tentativa de estimar os raios hidrodinâmicos dos parabens em solução. Durante o andamento destes estudos, verificamos a ocorrência de adsorção dos parabens sobre o Teflon nos experimentos utilizando o método de Taylor. Posteriormente, esta adsorção foi confirmada em experimentos em batelada. Como o método de Taylor é o mais utilizado para estudos de difusão, algumas vezes com tubos de Teflon, esta constatação foi importante no sentido de alertar sobre erros sistemáticos que podem ocorrer nesta técnica decorrentes da adsorção do soluto. Além disto, estes resultados confirmaram o caráter hidrofóbico desta adsorção.

Para calcular os raios hidrodinâmicos a partir dos coeficientes de difusão, utilizamos a relação de Stokes-Einstein. Para testar a validade desta equação, realizamos uma compilação de vários estudos de difusão. Através destes resultados, foi possível determinar que esta equação apresenta dois comportamentos distintos para difusão em água e em solventes orgânicos, provavelmente como reflexo de uma maior estruturação da água. Além disto, mostramos que, através desta equação simples e do cálculo dos volumes de van de Waals usando as contribuições atômicas, é possível obter boas estimativas do coeficiente de difusão de moléculas.

Os raios hidrodinâmicos obtidos experimentalmente são menores que os calculados através das contribuições atômicas e utilizando a geometria molecular otimizada e os raios atômicos de van der Waals. Entretanto, devido às incertezas sobre o valor da constante  $C$  a ser utilizado nesta equação, não foi possível concluir sobre a variação destes raios com a adição de etanol ao solvente.

Os resultados obtidos nos estudos de partição em micelas enfatizaram a necessidade de um rigoroso controle de pH em experimentos com solutos ionizáveis e micelas. Este parece ser o

motivo da discordância entre os coeficientes de partição por nós obtidos e os descritos na literatura. A análise das variações de energia livre para o processo de interação com micelas foi feita analisando-se as contribuições de grupos das moléculas. Os modelos propostos para a interpretação da contribuição das estruturas base não forneceram bons resultados. Entretanto, este tipo de análise parece promissor, tendo sido aplicada com sucesso para interpretar a adsorção de moléculas aromáticas sobre eletrodos de mercúrio.

Foi observada uma correlação entre as contribuições da estrutura base e hidrofóbica, sugerindo que uma forte interação da estrutura base com os grupos iônicos do detergente mantém o soluto numa região mais externa da micela. O valor obtido para a contribuição eletrostática ao processo de interação é muito semelhante ao relatado para interação com macrociclos e ciclodextrinas modificadas, embora seja menor que o estimado supondo uma interação puramente eletrostática com a superfície micelar.

As medidas do pKa aparente dos parabens com micelas confirmou a previsão qualitativa feita através das regras de Hartley, em função da carga das micelas. A análise quantitativa do efeito de micelas de CTAB sobre a ionização dos parabens comprovou a validade do modelo de troca iônica de pseudofase.

A variação do pKa aparente causada por micelas de CTAB foi utilizada para detectar o aparecimento de micelas, possibilitando a determinação da c.m.c.. Além disto, através destas medidas foi possível estudar o efeito de aditivos sobre as micelas de CTAB. No caso de ânions, foi possível obter uma ordenação destes de acordo com a intensidade de interação com as micelas, que concorda com outras descritas a partir de outros métodos. O efeito de álcoois de cadeia curta pode ser atribuído a mudanças nas propriedades do solvente ou à formação de micelas mistas com excesso de moléculas de álcool, em relação ao CTAB. A adição de  $C_{12}EO_9$  provocou a maior redução no  $\Delta pK_a$ , que foi atribuída à formação de micelas mistas. Para maiores frações de  $C_{12}EO_9$  adicionado, estas micelas mistas

comportam-se como micelas não iônicas.

A adição do polycation PEI provoca um aumento na ionização dos parabens. Entretanto, diferentemente do que foi observado com CTAB, este efeito não tem caráter hidrofóbico. A adição de NaCl na concentração de 0,05 M inibiu a variação de pKa causada pelo polieletrólito.

Os ensaios hemolíticos mostraram que os parabens aumentam a resistência das hemácias ao meio hipotônico. Este efeito aumenta com a hidrofobicidade do paraben, do mesmo modo que os seus coeficientes de partição na biomembrana.

O estudo da transição de fase dos lipossomas por DSC mostrou que, utilizando um aparelho de DSC convencional é possível detectar esta transição. Entretanto, a reprodutibilidade das temperaturas e energias de transição assim obtidas é muito pequena para permitir a detecção dos efeitos da incorporação dos parabens.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. C. Hansch, R.M. Muir, T. Fujita, P. Maloney, E. Geiger e M. Streich *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 85, 2817
2. H. Kubinyi *J. Med. Chem.* 1977, 20, 625
3. S. M. Free, J.W. Wilson *J. Med. Chem.* 1964, 7, 395
4. R. W. Taft, M.H. Abraham, R.M. Doherty, M.J. Kamlet *Nature* 1985, 313, 384
5. M.H. Abraham, G.S. Whiting, R. Fuchs, E.J. Chambers *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1990, 291
6. M. H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty e W.J. Shuely *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1990, 1451
7. M.J. Kamlet, D.J. Abraham, R.M. Doherty, R.W. Taft e M.H. Abraham *J. Pharm. Sci.* 1986, 75, 350
8. S.S. Isied, M. Y. Ogawa e J.F. Wishart *Chem. Rev.* 1992, 92, 381
9. S. Cabani, N. Ceccanti e M.R. Tiné *Pure Appl. Chem.* 1991, 63, 1455
10. P.L. Luisi e F.J. Varela *Origins Life Evol. Biosphere* 1989, 19, 633
11. J.H. Fendler, "Membrane Mimetic Chemistry", Wiley, N. York, 1982
12. J.N. Israelachvili, "Intermolecular and Surface Forces", Academic Press, London, 1985, p. 260
13. C. Tanford, "The Hydrophobic Effect", Wiley, N. York, 1980, p. 200
14. S.J. Singer e G.L. Nicholson *Science* 1972, 175, 720
15. A.E. Beezer, P.L.O. Volpe e W.H. Hunter *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1* 1986, 82, 2863
16. A. Leo, C. Hansch e D. Elkins *Chem. Rev.* 1970, 71, 525
17. J. Sangster *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1989, 18, 1111
18. Y. Marcus *J. Solution Chem.* 1990, 19, 507
19. R. Preston Mason, D.G. Rhodes e L.G. Herbette *J. Pharm. Sci.* 1991, 34, 869
20. J. H. Fendler, ref 11, cap. 4

21. J.H. Fendler, ref 11, cap. 5 e 6
22. I. Abe, H. Kamaya e I. Ueda *J. Pharm. Sci.* 1988, 77, 166
23. I. Abe, H. Kamaya e I. Ueda *J. Pharm. Sci.* 1990, 79, 354
24. C. A. Tonegutti, "Transferência de Fase de m-Alcoxifenóis da Água para Carvão Ativo e Micelas de CTAB", Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, 1990
25. J. H. Fendler, ref. 11, p. 23
26. D.W. Armstrong *Sep. Purif. Methods* 1985, 14, 213
27. H. Chaimovich, R.M.V. Aleixo, I.M. Cuccovia, D. Zanette e F.H. Quina, em "Solution Behavior of Surfactants - Theoretical and Applied Aspects", K.L. Mittal e E.J. Fendler, Eds., vol. 2, Plenum Press, N. York, 1982, p. 949
28. W. L. Hinze, em "Ordered Media in Chemical Separations", W.L. Hinze e D.W. Armstrong, Eds. , ACS Symp. Ser., ACS, N. York, 1986, p. 2
29. J. Lang e R. Zana, em "Surfactant Solutions", R. Zana, Ed., M. Dekker, N. York, 1987, cap. 8
30. F. M. Menger *Nature* 1985, 315, 603 e K.A. Dill, *Nature* 1985, 315, 603
31. F.M. Menger *Acc. Chem. Res.* 1979, 12, 111
32. T. Matsumoto *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1990, 94, 827
33. K.A. Dill, D.E. Koppel, R.S. Cantor, J.D. Dill, D. Bendelouch, S-H. Chen *Nature* 1984, 309, 42
34. D.W. Gruen *J. Phys. Chem.* 1985, 89, 146 e 153
35. J. Shelley, K. Watanabe e M.L. Klein *Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.* 1990, 17, 103
36. R. Bacaloglu, A. Blaskó, C.A. Bunton, G. Cerichelli e A. Shirezi *Langmuir* 1991, 7, 1107
37. B. Halle e G. Carlström *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 2142
38. C.J. Drummond, F. Grieser e T. Healy *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 1986, 81, 95
39. A.W. Adamsom, "Physical Chemistry of Surfaces", Wiley, N. York, 1982, 4a. ed., p. 215
40. C.A. Bunton, F. Nome, F.H. Quina e L.S. Romsted *Acc. Chem. Res.* 1991, 24, 357
41. C.J. Drummond e F. Grieser *Photochem. Photobiol.* 1987,

45, 19

42. W.L. Hinze, em "Solution Chemistry of Surfactants", K.L. Mittal (ed.), Plenum Press, N. York, 1979, vol. 1, p. 79
43. G.L. McIntire *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1990, 21, 257
44. L. C. Dias Jr., "Implementação de Técnicas de Luminescência em Química Analítica", Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, 1991
45. W. L. Hinze e D.W. Armstrong, Eds., "Ordered Media in Chemical Separations", ACS Symp. Ser., ACS, N. York, 1986
46. D. Atwood e A.T. Florence, "Surfactant Systems : Their Chemistry, Pharmacy and Biology", Chapman and Hall, Londres, 1983
47. V.K. Kelkar, B.S. Valaulikar, J.T. Kunjappu e C. Manohar *Photochem. Photobiol.* 1990, 52, 717
48. J.K. Thomas *Chem. Rev.* 1980, 80, 283
49. Y. Zhang e W. Li *Synth. Commun.* 1988, 18, 1685
50. D.G. Chapman *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser.* 1987, 22, 177
51. P.M. Davidson, em "Antimicrobials in Foods", A.L. Branen e P.M. Davidson, Eds., Marcel Dekker, N. York, 1983, cap. 3
52. D.F. Chichester e F.W. Tanner Jr., em "Handbook of Food Additives", T.E. Furia, Ed., CRC Press, Cleveland, 1968, cap. 4
53. M. Fondu, H.v.G-Z. de Beyl, G. Bronkers e P. Carton, "Food Additives Tables", Elsevier, Amsterdam, 1980
54. M. Dimicky e C.N. Huhtanen *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 798
55. A.E. Beezer, P.L.O. Volpe, C.A. Gooch, W.H. Hunter e R.J. Miles *Int. J. Pharm.* 1986, 29, 237
56. S. Mizuba e W. Sheikh *J. Ind. Microbiol.* 1987, 1, 363
57. M. M. Joy e D. J. Cutler *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 266
58. S. P. Denyer *Int. Biodeterioration* 1990, 26, 89
59. T. Eklund *J. Gen. Microbiol.* 1985, 131, 73
60. J.R. Furr e A.D. Russel *Microbios* 1972, 5, 189 - citado na ref. 58

61. T. Eklund *J. Appl. Bacteriol.* 1980, 48, 423
62. I. F. Nes e T. Eklund *J. Appl. Bacteriol.* 1983, 54, 237
63. K. S. Alexander, H. Petersen Jr., J. G. Turcotte e A. J. Paruta *J. Pharm Sci.* 1976, 65, 851
64. G. Buckton, A. E. Beezer, S. P. Denyer e S. J. Russel *Int. J. Pharm.* 1991, 73, 1
65. A. E. Beezer, S. Forster, W-B. Park e G. J. Rimmer *Thermochim. Acta* 1991, 178, 59
66. J. N. Twist e J. L. Zatz *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1986, 37, 429
67. J. N. Twist e J. L. Zatz *J. Pharm. Sci.* 1988, 77, 536
68. H. Komatsu e M. Suzuki *J. Pharm. Sci.* 1979, 68, 596
69. H. Komatsu *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32, 3739
70. H. Komatsu, K. Higaki, H. Okamoto, K. Miyagawa, M. Hashida e H. Sezaki *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 3415
71. H. Komatsu, H. Okamoto, K. Miyagawa, M. Hashida e H. Sezaki *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 3423
72. T. Shimamoto e Y. Ogawa *Chem. Pharm Bull.* 1975, 23, 3038
73. T. Shimamoto, H. Mima e M. Nakagaki *Chem. Pharm. Bull.* 1979, 27, 1995
74. A. Goto, M. Nihei e F. Endo *J. Phys. Chem.* 1980, 84, 2268
75. A. Goto, F. Endo e T. Higashino *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1985, 58, 773
76. A. Goto, F. Endo e K. Ito *Chem. Pharm. Bull.* 1977, 25, 1165
77. A. Goto e F. Endo *J. Colloid Interface Sci.* 1978, 66, 26
78. A. Goto e F. Endo *J. Colloid Interface Sci.* 1979, 68, 163
79. A. Goto, R. Sakura e F. Endo *Chem. Pharm. Bull.* 1980, 28, 14
80. M. Iwatsuru e K. Shimizu *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 3348
81. M. Iwatsuru e K. Shimizu *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 4862
82. K. Shimizu e M. Iwatsuru *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 726
83. K. Shimizu e M. Iwatsuru *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 4055
84. K. Shimizu e M. Iwatsuru *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 744

85. K. Shimizu, C. Imada e M. Iwatsuru *Chem. Pharm. Bull.* 1991, 39, 2750
86. I. M. Cuccovia, F.H. Quina e H. Chaimovich *Tetrahedron* 1982, 38, 917
87. E. A. Silva Filho, "Termodinâmica da Contribuição de Grupos CH<sub>2</sub> no Processo de Transferência de Fase : I. Álcool / Micelas, II. Álcool / Microorganismo", Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, 1988
88. J.R.C. Dodge, R.H. Mitchell e D.J. Hanahan *Arch. Biochem. Biophys.* 1963, 100, 119
89. W.E. Price, R.A. Trickett e K.R. Harris *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 1989, 85, 3281
90. D.W. Armstrong, T.J. Ward e A. Berthod *Anal. Chem.* 1986, 58, 579
91. D.G. Leaist e L. Hui *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 8741
92. A.J. Easteal e L.A. Woolf *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 1984, 80, 1287
93. C. Erkey, K.A. Alhamid e A. Akgerman *J. Chem. Phys.* 1991, 94, 3867
94. W.E. Price *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 1989, 85, 415
95. D.G. Leaist *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1991, 95, 113
96. T.J. Burkey, D. Griller, D.A. Lindsay e J.C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 1983
97. D.W. Armstrong, R.A. Menges e S.M. Han *J. Colloid Interface Sci.* 1986, 126, 239
98. M.A. Ajufo, A. Burke, M.J. Perkins, A.E. Beezer, J.C. Mitchell e P.L.O. Volpe *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1991, 87, 2741
99. L. Paduano, R. Sartorio, V. Vitagliano e L. Constantino *J. Solution Chem.* 1990, 19, 31
100. A.J. Easteal *Can. J. Chem.* 1990, 68, 1611
101. P. Stilbs *Progr. NMR Spectrosc.* 1987, 19, 1
102. G.I. Taylor *Proc. Royal Soc. London Ser. A* 1953, 219, 186 e 1954, 223, 446
103. R. Aris *Proc. Royal Soc. London Ser. A* 1956, 235, 67
104. A. Alizadeth, C.A. Nieto de Castro e W.A. Wakeham *Int. J. Thermophys.* 1980, 1, 243

105. T. Tominaga, S. Yamamoto e J. Takanaka *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 1984, 80, 941
106. T. Tominaga, S. Matsumoto e T. Ishii *J. Phys. Chem.* 1986, 90, 139
107. T. Tominaga e S. Matsumoto *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1990, 63, 533
108. D.D. Frey e C.J. King *J. Chem. Eng. Data* 1982, 27, 419
109. K. Shinoda, T. Nakagawa, B. Tamamushi e T. Isemura, "Colloidal Surfactants", Academic Press, N. York, 1963, p. 68
110. L. Kozerski e P.E. Hansen *J. Phys. Org. Chem.* 1991, 4, 58
111. R.C. Castillo, H.C. Domínguez e M. Costas *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 8731
112. R.C. Castillo, C. Garza e J. Orozco *J. Phys. Chem.* 1992, 96, 1475
113. W.A. Wakeham *Discuss. Faraday Soc.* 1980, 40, 643
114. D.G. Leaist *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1991, 95, 117
115. J. Aracil, R.G. Rubio, M.D. Peña e J.A.R. Renuncio *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1* 1988, 84, 539
116. I. Johnson e G. Olofsson *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 1988, 84, 551
117. H.E. Bee, R.H. Otewil, D.G. Rance e R.A. Richardson, em "Adsorption from Solution", R.H. Otewil, C.H. Rochester e A.L. Smith, Eds., Academic Press, Londres, 1983, p. 155
118. E. Fisicaro, E. Pelizzetti, R. Bongiovanni e E. Borgarello *Colloid Surf.* 1990, 48, 259
119. K.C. Lowe *Adv. Materials* 1991, 3, 87
120. F. Galembeck *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 1978, 16, 1315
121. I.C.S.F. Jardim, M. Sartoratto, P.R. Saliba, C. Archundia e K.E. Collins *Appl. Radiat. Isot.* 1989, 40, 643
122. J. Yao e G. Strauss *Langmuir* 1991, 7, 2353
123. D.G. Leaist *J. Solution Chem.* 1991, 20, 187
124. R.M. Silverstein, C.C. Bassler e T.C. Morrill, "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos",

- Guanabara, Rio de Janeiro, 1979, 3a. ed., p. 110
125. H.W. Starkweather *Macromolecules* 1977, 10, 1161
  126. A.F.M. Barton, "Handbook of Solubility Parameters", CRC Press, Boca Raton, 1985
  127. S.J. Gregg e K.S.W. Sing, "Adsorption, Surface Area and Porosity", Academic Press, Londres, 1982, cap. 5
  128. K. Kakemi, H. Sezaki, E. Arakawa, K. Kimura e K. Ikeda *Chem. Pharm. Bull.* 1971, 19, 2523
  129. N.A. Lill e H. Ruprecht *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 714
  130. A.W. Adamson, "Physical Chemistry of Surfaces", Wiley, N. York, 1982, 4a. ed., p. 373
  131. M.J.E. Golay, em "Gas Chromatography 1958", D.H. Desty Ed., Butterworth, Londres, 1959, p. 36, citado por J.H. Knox em *Discuss. Faraday Soc.* 1980, 15, 189
  132. C.H. Collins e G.L. Braga. "Introdução a Métodos Cromatográficos", Ed. Unicamp, Campinas, 1987, p. 26
  133. W. Loh, C.A. Tonegutti e P.L.O. Volpe, submetido para publicação no *J. Chem Soc. Faraday Trans*
  134. J.T. Edward *J. Chem. Educ.* 1970, 47, 261
  135. J. Higo e N. Go *J. Comput. Chem.* 1989, 10, 376
  136. A. Martin, P.L. Wu e A. Beerbower *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 188
  137. R.K. Ghai, H. Ertl e F.A.L. Dullien *AIChE J.* 1973, 19, 881
  138. H. Morawetz, "Macromolecules in Solution", Wiley, N. York, 1975, p. 292
  139. P.J. Bratt, D.G. Gillies, L.H. Sutcliffe e A.J. Williams *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 2727
  140. S.J. Candau, em "Surfactant Solutions", R. Zana Ed., Marcel Dekker, N. York, 1987, cap. 3
  141. D.F. Evans, C. Chan e B.C. Lamartine *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 6492
  142. D.F. Evans, T. Tominaga e H.T. Davis *J. Chem. Phys.* 1981, 74, 1298
  143. H. Ertl, R.K. Ghai e F.A.L. Dullien *AIChE J.* 1974, 20, 1
  144. P.J. Espinosa e J.G. de la Torre *J. Phys. Chem.* 1987,

- 91, 3612
145. P.C.F. Pau, J.O. Berg e W.G. McMillan *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 261
  146. E. Hawlicka e R. Grabowski *J. Phys. Chem.* 1992, 96, 1554
  147. M. Iwashi, Y. Ohbu, T. Kato, Y. Suzuki, K. Yamaguchi, Y. Yamaguchi e M. Muramatsu *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1986, 59, 3771
  148. M. Iwashi, Y. Yamaguchi, Y. Ogura e M. Suzuki *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1990, 63, 2154
  149. T.C. Chan *J. Chem. Phys.* 1984, 80, 5862
  150. "Handbook of Chemistry and Physics", R.C. Weast, Ed., CRC Press, Boca Raton, 67a. ed., 1986, p. D 221
  151. P.W. Atkins, ref. 130, p. 156
  152. M. Landgren, D. McEachern, G. Olofsson, S. Randzio e S. Sunner *J. Chem. Thermodyn.* 1978, 10, 847
  153. L. Sepúlveda, E. Lissi e F. Quina *Adv. Colloid Interface Sci.* 1986, 25, 1
  154. K. Kalyanasundaram, "Photochemistry in Microheterogeneous Systems", Academic Press, Orlando, 1987, p. 29
  155. M.L. McGlashan *Thermochim. Acta* 1991, 175, 59
  156. C. Treiner, A.A. Khodja e M. Fromon *Langmuir* 1987, 3, 729
  157. A. Ben-Naim *J. Phys. Chem.* 1978, 82, 792
  158. I. Johnson e G. Olofsson *J. Colloid Interface Sci.* 1987, 115, 56
  159. C. Gamboa, H. Rios e L. Sepúlveda *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 5540
  160. D.E. Güvelli, J.B. Keyes e S.S. Davis *J. Colloid Interface Sci.* 1981, 82, 307
  161. C.A. Bunton e L. Sepúlveda *J. Phys. Chem.* 1979, 83, 680
  162. M. Abu-Hamdiyyah *J. Phys. Chem.* 1986, 90, 1345
  163. C. Hirose e L. Sepúlveda *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 3689
  164. F.P. Tomasella e L.J. Cline-Love *Anal. Chem.* 1990, 62, 1315
  165. A.E. Beezer, R. Miles e .F. Perry, em "Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems", A.M. James, Ed., Wright, Bristol, 1987, p. 172

166. J.W. Larsen e L. Magid *J. Phys. Chem.* 1974, 78, 836
167. Y. Sakaiguchi, T. Shikata, H. Urami, A. Tamura, H. Hirata *J. Electron Microsc.* 1987, 36, 168
168. C. Tanford, ref. 13, cap. 1
169. P.L. Privalov e S.J. Gill *Pure Appl. Chem.* 1989, 61, 1097
170. C. La Mesa *Colloids Surf.* 1989, 35, 329
171. I. Langmuir *J. Am. Chem. Soc.* 1917, 39, 1848
172. P.D. Cratin *Ind. Eng. Chem.* 1968, 60, 14
173. B.-H. Lee, S.D. Christian, E.E. Tucker e J.F. Schameron *J. Phys. Chem.* 1991, 95, 360
174. C. Gitler e A. Ochoa-Solano *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 5004
175. A.E. Beezer, W.H. Hunter e D. Storey *J. Pharm. Pharmacol.* 1980, 32, 815
176. H.L. Casal *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 5203
177. F.M. Menger e D.W. Doll *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 1109
178. K. Viane, A. Verbeeck, E. Geladé e F.C. de Shryver *Langmuir* 1986, 2, 456
179. P. Lianos, M-L. Viriot e R. Zana *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 1098
180. M. Almgren, B. Medhage e E. Mukhtar *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1991, 59, 323
181. C.A. Bunton e C.P. Powell *J. Colloid Interface Sci.* 1988, 122, 154
182. S.J. Bachofer, U. Simonis, T.A. Nowicki *J. Phys. Chem.* 1991, 95, 480
183. A.V. Bunge, "Introdução à Química Quântica", Edgar Blücher, São Paulo, 1977, p. 257
184. M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy e J.J.P. Stewart *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 3902
185. I. Fleming, "Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions", Wiley, Londres, 1976
186. J.E. Huheey, "Inorganic Chemistry", Harper and Row, Londres, 1975, p. 225
187. C. Gamboa, H. Rios e L. Sepúlveda *J. Phys. Chem.* 1981,

- 85, 1429
188. R.G. Parr e R. Pearson *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 7512
189. L. Benedetti, G. B. Gavioli e C. Fontanesi *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1992, 88, 843
190. L. Asbrink, E. Lindholm e C. Fridh *Chem. Phys. Lett.* 1977, 52, 63
191. A.W. Adamsom, ref. 130, p. 373
192. E.A. Collander *Acta Chem. Scand.* 1951, 5, 774
193. S.K. Poole, B.R. Kersten e C.F. Poole *J. Chromatogr.* 1989, 471, 19
194. M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty e W.J. Shuely *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1990, 1451
195. J.C. Mata-Segreda *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6224
196. R. De Lisi e S. Milioto *J. Solution Chem.* 1988, 17, 245
197. P. Stilbs *J. Colloid Interface Sci.* 1982, 87, 245
198. B. Jönsson, O. Edholm e O. Teleman *J. Chem. Phys.* 1986, 85, 2259
199. H.J. Schneider e I. Theis *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 753
200. A.Y. Yatsimirsky e A. Eliseev *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1991, 1769
201. C. Treiner *J. Colloid Interface Sci.* 1982, 90, 444
202. G.S. Hartley *Trans. Faraday Soc.* 1939, 30, 44
203. M.S. Fernández e P. Fromherz *J. Phys. Chem.* 1977, 81, 1755
204. C.J. Drummond, F. Grieser e T.W. Healy *Discuss. Faraday Soc.* 1986, 81, 95
205. C.J. Drummond, F. Grieser e T.W. Healy *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1* 1989, 85, 521
206. M.B. Lay, C.J. Drummond, P.J. Thistlethwaite e F. Grieser *J. Colloid Interface Sci.* 1989, 128, 602
207. P-A. Bonnet, V. Roman, M. Fatôme e F. Berleur *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1* 1989, 85, 3587
208. O.A. El Seoud *Adv. Colloid Interface Sci.* 1989, 30, 1
209. B. Ehrenberg, T.G. Ebrey, N. Friedman e M. Sheves *FEBS Lett.* 1989, 250, 179

210. K. Martinek, A.K. Yatsimirski, A.V. Levashov e I.V. Berezin, e "Micellization, Solubilization and Microemulsions", K.L. Mittal, Ed., vol. 2, Plenum Press, N. York, 1977, p.489
211. F.H. Quina e H. Chaimovich *J. Phys. Chem.* 1979, 83, 1844
212. C.W. Davies, "Ion Association", Butterworths, Londres, 1962, p.41
213. E.E. Sager, M.R. Schooley, A.S. Carr e S.F. Acree *J. NBS Res.* 1945, 35, 521
214. A. Berthod e C. Saliba *Analisis* 1985, 13, 437
215. T. Shikahata, H. Hirata e T. Kotaka *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 3702
216. P-A. Bonnet, V. Roman, M. Fatôme e F. Berleur *Chem. Phys. Lipids* 1990, 55, 133
217. S. Harada, T. Sano, Y. Yamashita, H. Yano, T. Inoue e T. Yasunaga *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1988, 61, 1045
218. C.A. Bunton e L. Sepúlveda *Israel J. Chem.* 1979, 18, 298
219. L.R. Romsted, Tese PhD, Indiana University, 1975 - citado na ref. 27
220. H. Hoffman e G. Ebert *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 902
221. C. Gamboa e L. Sepúlveda *J. Colloid Interface Sci.* 1989, 113, 566
222. C. Gamboa, H. Rios e L. Sepúlveda *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 5540
223. J. K. Thomas *Chem. Rev.* 1980, 80, 283
224. G. Biresaw, D.C. McKenzie, C.A. Bunton e D.F. Nicoli *J. Phys. Chem.* 1985, 89, 5144
225. C. Gamboa, L. Sepúlveda e R. Soto *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 1429
226. D. Bartet, C. Gamboa e L. Sepúlveda *J. Phys. Chem.* 1980, 84, 272
227. Y. Miyashita e S. Hayano *J. Colloid Interface Sci.* 1982, 86, 344
228. J.H. Callahan e K.D. Cook *Anal. Chem.* 1982, 54, 59
229. E. Abuin, E.A. Lissi, P.S. Araujo, R.M.V. Aleixo, H. Chaimovich, N. Bianchi, L. Miola e F.H. Quina *J. Colloid*

- Interface Sci.* 1983, 96, 293
230. J.W. Larsen e L.J. Magid *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, 5774
231. M. Meyer e L. Sepúlveda *J. Colloid Interface Sci.* 1984, 99, 2
232. S. Yokoyama, A. Kaneko e T. Fujie *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1988, 61, 3451
233. N. Nakagaki e S. Yokoyama *Chem. Pharm. Bull.* 1985, 33, 2654
234. Getings, J. *J. Chem. Soc. Faraday Trans 2* 1977, 74, 1957
235. L.G. Ionescu, L.S. Romanesco e F. Nome, em "Surfactants in Solution", K.L. Mittal e B. Lindman, Eds., vol. 2, Plenum Press, N. York, 1984, p. 789
236. G. Ortoni e A. Santucci *Chem. Phys. Lett.* 1992, 189, 598 e referências ali citadas
237. P. Lianos e R. Zana *Chem. Phys. Lett.* 1980, 72, 171
238. Y.-L. Hsu e U.P. Strauss *J. Phys. Chem.* 1987, 97, 6238
239. Y.J. Yang e J.B.F.N. Engberts *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* 1991, 110, 384
240. N. Ise, T. Okubo e S. Kunigi *Acc. Chem. Res.* 1982, 15, 171
241. V. Soldi, N.M. Erismann e F.H. Quina *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 5137
242. A. Arcelli e C. Concilio *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1989, 887
243. Y. Morishima, T. Kobayashi e S. Nakazura *Macromolecules* 1988, 21, 101
244. S. Kobayashi *Progr. Polym. Sci.* 1990, 15, 751
245. J.W.A. van den Berg, C.J.B. van Treslong e A. Polderman *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1973, 92, 3
246. Aldrich Chemical Company, "Catalog Handbook of Fine Chemicals", 1992-1993, p. 1034
247. S.L. Schrier *Clin. Haematol.* 1985, 14, 1
248. E. R. Hammarlund *J. Pharm. Sci.* 1989, 78, 520 e referências ali citadas
249. C. Hansch e W.R. Glave *Molec. Pharmacol.* 1971, 7, 337
250. P. Seeman, S. Roth e H. Scheneider *Biochim. Biophys.*

- Acta*. 1971, 225, 171
251. H. Machleidt, S. Roth e P. Seeman *Biochim. Biophys. Acta* 1972, 255, 178
252. T. Horie, Y. Sugiyama, S. Awazu e M. Hanano *J. Pharm. Dyn.* 1981, 4, 116
253. V.R. Osorio e Castro, E.A. Ashwood, S.G. Wood e L.P. Vernon *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1029, 252
254. D. Trägner e A. Csordas *Biochem. J.* 1987, 244, 605
255. L. S. Ramos, "Interação de Detergentes Não-Iônicos com a Membrana Eritrocitária: Estudo sobre a Ação dos Detergentes da Série Tween", Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1991
256. M. Rybczynska e A. Csordas *Life Sci.* 1989, 44, 625
257. H. Aki e M. Yamamoto *Biochem. Pharmacol.* 1990, 39, 396
258. T. Ogiso, Y. Ito, M. Iwaki, K. Nakanishi e H. Saito *Chem. Pharm. Bull.* 1989, 37, 430 e referências ali citadas
259. J.H. Fendler, ref. 11, p. 133
260. T. Inoue, T. Iwanaga, K. Fukushima e R. Shimosawa *Chem. Lett.* 1988, 277
261. D.A. Jaeger, W. Subotkowski, J. Mohebalian, Y.M. Sayed, B.J. Sanyal, J. Heath e E.M. Arnett *Langmuir* 1991, 7, 1935
262. Y. Kaminoh, H. Kamaya e I. Ueda *Biochim. Biophys. Acta* 1989, 987, 63
263. M. Kodama, S. Tsuchiya, N. Nakayama, Y. Takaichi, M. Sakiyama, K. Akiyoshi, K. Tanaka e J. Sunamoto *Thermochim. Acta* 1990, 163, 81
264. I.M. Cuccovia, E. Feitosa, H. Chaimovich, L. Sepúlveda e W. Reed *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 3722
265. C.-H. Chen *J. Phys. Chem.* 1980, 85, 603
266. C.H. Spink, V. Lieto, E. Mereand e C. Pruden *Biochemistry* 1991, 30, 5104
267. L. Benoist *Thermochim. Acta* 1990, 163, 111
268. M. Kodama, T. Kunitake e S. Seki *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 1550
269. R.G. Laughlin, R.L. Munyon, Y.-C. Fu e A.J. Fehl *J.*

- Phys. Chem.* 1991, 95, 3852
270. Y. Okahata, R. Ando, T. Kunitake *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1981, 85, 789
271. L.G. Longsworth *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75, 5705
272. D.G. Leaist *J. Solution Chem.* 1991, 20, 175
273. R.A. Noulty e D.G. Leaist *J. Chem. Eng. Data* 1987, 32, 418
274. S.K. Sanyal e S.K. Mandal *Ind. J. Chem.* 1985, 24A, 603
275. S.A. Nowinski e D.M. Anjo *J. Chem. Eng. Data* 1989, 34, 265
276. W. Hayduk e H. Laudie *AIChE J.* 1974, 20, 611
277. J.H. Dymond e L.A. Woolf *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 1982, 78, 991
278. C. Erkey, K.A. Alhamid e A. Akgerman *J. Chem. Phys.* 1991, 94, 3867
279. J.H. Dymond *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 3291
280. E. Grushka e E.J. Kikta Jr. *J. Phys. Chem.* 1974, 78, 2297
281. J.H. Knox e H.P. Scott *J. Chromatogr.* 1983, 282, 297
282. D.F. Evans, C. Chan e B.C. Lamartine *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 6492

APÊNDICE

Tabela A.1 Coeficientes de difusão em água, volumes de van der Waals moleculares (calculado segundo contribuições atômicas). Valores medidos a 25°C, exceto quando indicada outra temperatura.

composto	$V_m (\text{Å}^3)$	$D (10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	ref
1. 1,2-butanodiol	94,8	9,27	107
2. 1,4-butanodiol	94,8	9,13	107
3. meso-eritrol	104,2	8,13	107
4. xilitol	127,4	7,58	107
5. manitol	150,6	6,78	107
6. inositol	139,2	6,95	107
7. benzeno	80,4	11,0	105
8. n-butilbenzeno	148,8	7,80	105
9. bifenil	150,2	8,33	105
10. naftaleno	123,4	8,80	96
11. etilnaftaleno	157,8	7,80	105
12. fenol	88,5	9,4	111
13. glicina	67,2	10,6	271
14. diglicina	123,2	7,91	271
15. triglicina	184,8	6,65	271
16. glicose	146,7	6,73	271
17. sacarose	267,1	5,21	271
18. rafinose	399,0	4,34	271
19. alanina	84,4	9,10	271
20. serina	92,1	8,80	271
21. treonina	109,1	7,98	271
22. valina	118,4	7,73	271
23. leucina	135,4	7,26	271

Tabela A.1. Continuação

composto	$V_m$ ( $\text{\AA}^3$ )	$D$ ( $10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	ref
24. aspargina	104,3	8,30	271
25. glutamina	121,3	7,62	271
26. prolina	107,0	8,79	271
27. histidina	135,2	7,33	271
28. fenilalanina	153,8	7,05	271
29. ác. m-aminobenzóico	171	7,74	271
30. ác. p-aminobenzóico	171	8,43	271
31. formamida	42,7	15,7	92
32. tolueno	97,8	9,5	92
33. ciclohexano	102	9,0	92
34. hexafluorbenzeno	108	8,6	105
35. cafeína	171,3	7,72	89
36. etanol	53,1	12,2	272
37. propanol	70,1	9,9	92
38. n-butanol	87,1	9,72	272
39. n-hexanol	121,1	8,26	272
40. n-octanol	155,1	5,9	272
41. ác. benzóico	107,9	9,0	273
42. p-cresol	105,9	9,5 <sup>a</sup>	274
43. alc. benzílico	105,5	9,0 <sup>a</sup>	274
44. 2-butoxi-etanol	127,3	7,89	112
45. 2,6-dimetoxifenol	135,7	7,27 <sup>b</sup>	274
46. o-etoxifenol	129,1	7,18 <sup>b</sup>	274
47. p-fenetidina	133,3	6,61 <sup>b</sup>	274
48. dopamina	159	6,69 <sup>a</sup>	275
49. norepinefrina	166	6,11 <sup>a</sup>	275
50. L-DOPA	187	7,35 <sup>a</sup>	275
51. etilbenzeno	114,8	9,0	276
52. furfural	80,8	11,2	276
53. cistina	193,2	7,80	96

Tabela A.1. Continuação

composto	$V_m$ ( $\text{\AA}^3$ )	$D$ ( $10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	ref.
54. $\beta$ -naftol	131,5	6,10 <sup>a</sup>	90
55. p-nitroanilina	119	7,46 <sup>a</sup>	90
56. p-nitrofenol	114,8	6,92 <sup>a</sup>	90
57. glicerol	85,5	9,3	276
58. ác. succínico	99,6	8,6	276
59. metilparaben	131,5	7,38	tese
60. metóxi fenol	112,1	8,59	24

a - 30°C , b - solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M

**Tabela A.2.** Coeficientes de difusão em solventes orgânicos apróticos, volumes de van der Waals (calculados através das contribuições atômicas). Valores medidos a 25°C, exceto quando outra temperatura for indicada.

composto	solvente	$V_m$ (Å <sup>3</sup> )	$D$ ( $10^{-10}$ m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	ref.
1. benzeno	hexano	80,4	47,3	277
2. tolueno	hexano	97,8	43,7	277
3. CS <sub>2</sub>	hexano	51,8	58,7	277
4. acetonitrila	AN	47,1	43,4	92
5. dicloroetano	AN	73,6	34,6	92
6. dicloroetano	tolueno	73,6	24,9	92
7. dicloroetano	hexano	73,6	46,4	92
8. dimetilformamida	AN	77,7	34,1	92
9. dimetilformamida	tolueno	77,7	24,3	92
10. benzeno	AN	80,4	38,1	92
11. benzeno	tolueno	80,4	24,0	92
12. tolueno	AN	97,8	33,8	92
13. tolueno	tolueno	97,8	22,4	92
14. bromobenzeno	AN	99,6	31,4	92
15. bromobenzeno	tolueno	99,6	20,5	92
16. bromobenzeno	hexano	99,6	38,6	92
17. cicloexano	AN	102	32,3	92
18. cicloexano	tolueno	102	21,0	92
19. cicloexano	hexano	102	36,9	92
20. ciclo-octano	tolueno	136	19,4	92
21. ciclo-octano	hexano	136	33,8	92
22. p-xileno	acetona	115,2	35,2	149
23. p-cloroxileno	acetona	112,3	35,0	149
24. p-diclorobenzeno	acetona	109,4	34,6	149
25. m-xileno	acetona	115,2	34,2	149
26. m-diclorobenzeno	acetona	109,4	33,8	149
27. o-xileno	acetona	115,2	33,9	149

Tabela A.2. Continuação

composto	solvente	$V_m$ ( $\text{\AA}^3$ )	$D$ ( $10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	ref.
28. o-diclorobenzeno	acetona	109,4	33,5	149
29. tetrametilestano	acetona	114,9	33,8	149
30. metanol	$\text{CCl}_4$	35,9	26,1	144
31. benzeno	acetona	80,4	41,7	144
32. fenol	$\text{CCl}_4$	88,5	13,7	144
33. naftaleno	$\text{CCl}_4$	123,4 <sup>a</sup>	12,0	144
34. dimetilacetamida	$\text{CCl}_4$	94,7 <sup>a</sup>	12,3	144
35. bifenil	$\text{CCl}_4$	150,2 <sup>a</sup>	10,7	144
36. bifenil	benzeno	150,2 <sup>a</sup>	15,6	144
37. antraceno	$\text{CCl}_4$	177,0 <sup>a</sup>	10,3	144
38. hexaclorobenzeno	$\text{CCl}_4$	167,4 <sup>a</sup>	9,2	144
39. 1-propanol	octano	70,1 <sup>b</sup>	35,4	278
40. 1-pentanol	octano	104,1 <sup>b</sup>	25,8	278
41. benzeno	$\text{CHCl}_3$	80,4 <sup>c</sup>	21,0	280
42. tolueno	$\text{CHCl}_3$	97,8 <sup>c</sup>	20,1	280
43. etilbenzeno	$\text{CHCl}_3$	114,8 <sup>c</sup>	18,0	280
44. i-propilbenzeno	$\text{CHCl}_3$	131,8 <sup>c</sup>	16,6	280
45. i-butilbenzeno	$\text{CHCl}_3$	148,8 <sup>c</sup>	15,1	280

AN - acetonitrila, a - 20° C, b - 27° C, c - 23° C