



**“Estudo Físico-químico do Transporte
de Espécies Químicas Através de
Membranas Líquidas Hidrofóbicas
em Tempo Real”**

Alexandre Martinez Antunes

Tese de Doutorado

UNICAMP - 2000

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrío Volpe

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Márcia Miguel Castro Ferreira



*À minha mãe, Duília,
que sempre esteve ao meu lado e sempre
estará, mesmo não fazendo mais parte
do mundo material;*

*Ao meu pai, Nereu,
que também me acompanhou e
acompanha, sempre me incentivando.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, por ter me dado saúde e perseverança para concluir este trabalho,
- ✓ Ao Prof. Dr. **Pedro Volpe**, pela orientação, amizade, apoio constante, dedicação e paciência em todos os momentos,
- ✓ À Prof^a Dr^a **Márcia Ferreira**, também pela amizade, dedicação e paciência nas inúmeras explicações dos métodos matemáticos,
- ✓ À Chris, por ter estado ao meu lado mesmo nos momentos mais críticos deste doutorado,
- ✓ Aos colegas de grupo Denise, José Mauro, Ricardo Belchior, André, Ricardo Cachichi e Vera,
- ✓ Àqueles que, com seu trabalho de iniciação científica, me ajudaram na obtenção de dados: Marisa, Vanessa e Renner,
- ✓ À Fabiana, pela ajuda nas mais diversas situações no laboratório e principalmente pela amizade e companhia nestes últimos dois anos,
- ✓ Ao Luís, pelo companheirismo e amizade nestes anos todos,
- ✓ Aos professores Sebastião Fonseca, Carlos Roque, Ronei J. Poppi, Fernando Coelho, Celso Davanzo, Fernando Faigle, Hiroshi Aoyama, por sua amizade, pelas discussões e empréstimo de reagentes e permissão para o uso de laboratórios,
- ✓ Aos amigos do laboratório B200: Sílvia, Neife, Débora, Lauro, Pessine, Ana Lúcia, Érica, Carol, Artur, Gustavo, Daniel, Vanderlei, Lolly, Maurício, Marcelo, Antônio, Kai, Silvana, Tereza, Karina, Nancy, Rita, Ferrão, Marilene e Ivan,
- ✓ Aos amigos Lucila, Noemi, Patrício, Helena, Bell Bueno, Ana Luísa e Pilha, Paula, Nelson e Lúcia (BIQ), Maria Eugênia, Deborah (“Pobre”), Danielle, Madalena,
- ✓ Aos funcionários do setor de xerox: Iara (*in memoriam*), Paula e Samuel,
- ✓ Aos funcionários da vidraria: Fontana, Roque e Marcos,
- ✓ Ao Sr. Nelson Espinazo e equipe da oficina de manutenção,
- ✓ Ao Sr. Valter e equipe da oficina mecânica,
- ✓ Ao Sr. Alípio e equipe da marcenaria,
- ✓ Ao Iveraldo e à Eliane, pela enorme ajuda com os desenhos,
- ✓ Ao Miguel Morel, pela amizade e pelos serviços de digitação,
- ✓ À Cláudia Martelli, pela grande ajuda com os espectros UV-Vis no início deste trabalho e pela amizade de sempre,
- ✓ Ao pessoal do setor de compras, especialmente ao Marcos, por sua dedicação na importação de equipamentos,
- ✓ À Joecy e ao Divino, sempre dispostos a ajudar com o empréstimo de reagentes e equipamentos,
- ✓ Aos funcionários da CPG/IQ, Bel, André e Celi, pela resolução eficiente dos vários problemas que sempre surgem,
- ✓ Ao CNPq, pelo auxílio financeiro,

RESUMO

O processo de transporte de espécies químicas variadas – íons potássio, aminoácidos e vitaminas – através de membranas líquidas hidrofóbicas contendo carregadores foi estudado empregando o método BLM (“bulk liquid membrane”).

Para o transporte do íon K^+ foi usado como carregador o éter coroa 18C6, em séries de experimentos com membranas de CH_2Cl_2 , $CHCl_3$ e CCl_4 , em alguns casos variando a temperatura e a concentração inicial dos compostos a serem transportados. Como contra-íon foram usados os íons orgânicos salicilato, benzoato, vários nitrofenolatos e séries homólogas de compostos bactericidas (do derivado metílico ao pentílico de parabens, 3-alcoxifenóis e 4-alcoxifenóis). Os resultados em geral puderam ser explicados pela equação de Born. Foram feitos também alguns experimentos com calorimetria para relacionar a redução da resposta biológica com as taxas de transporte.

Para o estudo do transporte dos aminoácidos Fenilalanina, Triptofano e Tirosina, usando micelas reversas, foram usados o surfatante aniônico AOT (aerosol OT) em CH_2Cl_2 e $CHCl_3$ e os surfatantes catiônicos TOMAC e DODAC em $CHCl_3$. O pH das fases fonte e de recebimento do sistema BLM foi variado de acordo com o tipo de surfatante utilizado. Somente foi notada eficiência no transporte nos casos onde o AOT foi usado.

Com membranas de CH_2Cl_2 e $CHCl_3$ contendo como carregador o ácido fenilborônico foi estudado o transporte de ácido ascórbico, verificando a influência de concentração do carregador, concentração inicial de vitamina, temperatura, efeito da glutatona na fase de recebimento e tipo do solvente sobre a taxa de transferência através das membranas. Usando os mesmos solventes foi feito um estudo do transporte simultâneo de vitamina C e riboflavina (vitamina B_2), variando a concentração do carregador entre zero e $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Foi notado aumento das taxas somente até a concentração de $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ para o carregador, em todos os casos. Não foi verificada competição entre as duas vitaminas no transporte. Também nesta etapa foram feitos experimentos com calorimetria, para auxiliar o entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

Em todos os casos a quantificação das espécies foi feita através de espectroscopia na região UV – Vis. Nos estudos de transporte simultâneo a superposição espectral impediu o uso de técnicas comuns de calibração. Foram empregados, então, os métodos quimiométricos OLS (“ordinary least squares”), PLS (“partial least squares”) e TLD (“trilinear decomposition”), além de terem sido feitos estudos usando planejamentos fatoriais de dois níveis.

ABSTRACT

Transport processes of varied chemical species – potassium ions, amino acids and vitamins – through hydrophobic liquid membranes was studied using BLM (bulk liquid membrane) method.

UV – Vis spectroscopy was used in all cases to quantify the transported species. It was not possible to use univariate calibration in cases of simultaneous transport because their spectral overlap. Chemometric methods as OLS (ordinary least squares), PLS (partial least squares) and TLD (trilinear decomposition) were employed. In addition, two levels factorial design was performed.

For the K^+ ion was used as carrier the crown ether 18C6, in series of experiments with membranes of CH_2Cl_2 , $CHCl_3$ and CCl_4 , as function of temperature and initial concentration of compounds to be transported. Salicylate, benzoate, several kinds of nitrophenolates and homologous series of bactericides (parabens and acoxyphenols) were employed as contra-ions. In general, results could be explained by using the Born equation. Some calorimetric experiments were done to relate biological response with transport rates.

Amino acids as Phenylalanine, Tryptophane and Tyrosine were used to perform the transport by reversed micelles of AOT (an anionic surfactant) in CH_2Cl_2 and $CHCl_3$, and two other reversed micelles of TOMAC and DODAC (cationic surfactants) in $CHCl_3$. According to the nature of the used surfactant, pH was changed in receiving and source phases. Transport process was efficient only in cases where AOT was employed.

Ascorbic acid transport was studied by using CH_2Cl_2 and $CHCl_3$ membranes containing phenylboronic acid as carrier. Parameters like carrier concentration influence, vitamin initial concentration, temperature, glutathione effect in the receiving phase and solvent effect were used to investigate the transfer rates through liquid membranes. Simultaneous transport of ascorbic acid and riboflavin was studied using the same solvents and changing carrier concentration from zero to $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. In all cases, an increasing of transport rates was observed only until carrier concentration of $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Competition between vitamins was not verified. Calorimetric experiments were performed in the system ascorbic acid – riboflavin, with the aim of elucidate the transport mechanisms involved.

ALEXANDRE MARTINEZ ANTUNES

*Endereço: Rua Lopes Trovão, 178
Taquaral
Campinas - S/P
Fones: (019) 251-7149
(019) 788-3017*

*Brasileiro
29 anos
Solteiro*

Formação Acadêmica

Bacharel em Química Tecnológica pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas
Período: 03 / 1989 – 06 / 1993

Mestre em Química, na área de Físico-Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas
Período: 08 / 1993 – 12 / 1995

Doutor em Ciências, na área de Físico-Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.
Período: 03/1996 – 02/2000

Participações em Congressos

- 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Caxambu, MG (05/1994)
- 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Caxambu, MG (06/1995)
- 19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Caxambu, MG (05/1996)
- 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, MG (05/1997)

- 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, MG (05/1998)
- 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, MG (05/1999)
- IX ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica – São Carlos, SP (09/1997)
- International Symposium on Calorimetry and Chemical Thermodynamics - Campinas, SP (04/1998)
"Heat of Complexation of Potassium Nitrophenolates with Crown Ethers and its Transport Rate in a Bulk Liquid Membrane System".
- International Symposium on Calorimetry and Chemical Thermodynamics - Campinas, SP (04/1998)
"Thermodynamic Parameters of Guanosine - Low-Molecular-Mass Protein Tyrosine Phosphatase Interaction. Determination of Binding Constant and Enthalpy of Interaction"
- 14th International Conference on Physical Organic Chemistry and 4th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry - Florianópolis, SC (08/1998)
"Transport of Organic Potassium Salts Through a Chloroform Membrane Using a Crown Ether Type Carrier".
- XXXIV European Congress on Molecular Spectroscopy - Praga República Tcheca (08/1998), apresentado pela Prof.^a Dr.^a Márcia M. C. Ferreira.
"Potassium transport through liquid membranes using spectral and chemometric methods"
- V Conferencia Latinoamericana de Fisicoquímica Orgánica – Viña del Mar – Chile (11/1998).
"Estudo Cinético do Transporte Simultâneo de Aminoácidos através de Membranas Líquidas Hidrofóbicas contendo Aerosol OT, com aplicação de um método de calibração multivariada"
- 6th Scandinavian Symposium on Chemometrics, SSC6; "A study of aminoacid transport through liquid membranes using uv-vis spectroscopy ", Porsgrunn, NORUEGA (08/1999), apresentado pela Prof.^a Dr.^a Márcia M. C. Ferreira.

Trabalhos publicados

Potassium Cation Extraction of a Sodium Chloride saturated solution using the Liquid Membrane Method - Antunes, A. M. , Volpe, P. L. O. ; QUIMICA NOVA **18** (1995) 440.

Utilization of multivariate calibration methods for the study of K⁺ transport through hydrophobic liquid membranes by using isomeric anions - Antunes, A.M. ; Volpe, P. L. O. e Poppi, R. J. ; SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY **34** (1999) 289.

Calibração Multivariada, Um Tutorial Ferreira, M.M.C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; QUIMICA NOVA, **22** (1999), 724.

Potassium transport Through Liquid Membranes using Spectral and Chemometric Methods - Antunes, A. M.; Ferreira, M. M. C.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. ; J. Molec. Struc., **480** (1999), 563.

Outras Atividades

- ♦ Participação nos processos de vestibular da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) desde 1992, atuando como fiscal.
- ♦ Co – orientação de quatro alunos de iniciação científica do curso de química na Universidade Estadual de Campinas.
- ♦ Colaboração em projetos para aquisição de equipamentos para a Universidade.
 - ♦ Colaboração em trabalhos de Mestrado de vários membros do grupo de pesquisa do laboratório de Biotermodinâmica – UNICAMP.

ÍNDICE

Introdução	1
Um pouco da história das membranas	1
Membranas biológicas	2
Membranas artificiais	3
Alguns aspectos energéticos	6
O transporte através de membranas artificiais	7
Os tipos fundamentais de transporte	10
Éteres coroa como carregadores para cátions alcalinos e alcalino-terrosos	14
Efeito dos solventes	15
Os bactericidas	17
Ionóforos	20
Micelas reversas como carregadores	21
Descrição da micela reversa	22
O transporte de substâncias neutras através das membranas líquidas	25
Os métodos de quantificação do transporte de espécies químicas	27
A calibração multivariada	28
Aspectos gerais	28
Calibração	30
Entendendo o PCA	33
A decomposição de valores singulares	35
Analisando um gráfico de "loadings"	36
Analisando um gráfico de "scores"	37
A construção de modelos	37
Etapas finais	42
O método OLS ("Ordinary Least Squares")	43
Objetivos	44
Parte Experimental	45
Parte A - Experimentos com o éter coroa 18C6 como carregador: o transporte de K^+	45
A1: Transporte individual e simultâneo	46
A2: Estudos comparativos do transporte	49
A3: Estudos com Sali - 2,4DNP - 2,5DNP	49
A4: Estudos com PIC - 2,4DNP - 2,5DNP	50
A5: Estudos com 2NP - 2,4DNP - 2,5DNP	51
Estudos com bactericidas	52
Parte B - Transporte de aminoácidos: experimentos usando micelas reversas	53
B1: Transporte com micelas de AOT quantificado por TLD	53
B2: Outros experimentos com Aerosol-OT	54
Determinação da Quantidade de água nas micelas reversas de AOT por Karl Fischer	55
B3: Experimentos com TOMAC	57
B4: Experimentos com DODAC	57

Parte C -Experimentos usando ácido fenilborônico como carregador:	58
Transporte de vitaminas	
C1: Transporte de vitamina C	58
C2: Experimentos com misturas das vitaminas B₂ e C	59
Calorimetria: quebra de ampolas	61
Resultados e Discussão	62
Parte A	62
Considerações sobre o transporte de potássio	62
A1: Transporte individual e simultâneo	65
A2: Estudos comparativos do transporte	73
A3: Estudos com Sali – 2,4DNP – 2,5DNP	77
A4: Estudos com PIC – 2,4DNP – 2,5DNP	80
Calibração usando o método PLS	82
A5: Estudos com 2NP – 2,4DNP – 2,5DNP	86
A6: Estudos com bactericidas	91
Parte B Micelas reversas como carregadores:	98
O sistema de transporte: exemplificando com o Aerosol-OT	99
B1: Transporte com micelas de AOT quantificado por TLD	101
B2: Outros experimentos com Aerosol-OT	106
B3: Experimentos com TOMAC	108
B4: Experimentos com DODAC	109
Parte C – Ácido fenilborônico como carregador: o transporte de vitaminas	111
C1: Transporte de vitamina C	113
C2: Experimentos com misturas das vitaminas B₂ e C	124
Conclusões	132
Bibliografia	134
Apêndice I	139
Apêndice II	142
Apêndice III	156
Apêndice IV	158
Apêndice V	162
Apêndice VI	165
Apêndice VII	167
Apêndice VIII	169
Apêndice IX	170
Apêndice X	172
Apêndice XI	176
Apêndice XII	178

INTRODUÇÃO

Um pouco da história das membranas

Os primeiros estudos sistemáticos dos fenômenos de transporte em membranas datam de antes de 1748, quando Abbé Nollet descobriu que depois de ter mergulhado uma bexiga animal preenchida com vinho em água pura esta permeava para dentro da bexiga, causando seu inchamento e até mesmo seu rompimento [1].

A história das membranas sintéticas começou com o desenvolvimento do nitrato de celulose, o primeiro polímero semi-sintético, em 1846. Em 1855 Fick usou este composto para preparar as membranas para seu experimento clássico de difusão [2]. Poucos anos mais tarde, Traube preparou membranas por precipitação de ferricianeto cúprico numa fina camada de porcelana não vitrificada. Estas membranas foram usadas por Pfeffer, van't Hoff e outros para o estudo de fenômenos osmóticos. Ao mesmo tempo, Graham descobriu que a borracha exibe diferentes permeabilidades para diferentes gases [2] e também que certos componentes de uma solução aquosa, como colóides, se difundem muito mais lentamente através de membranas preparadas com intestinos de animais do que componentes de baixo peso molecular, como açúcar e certos sais.

O desenvolvimento de membranas com diferentes propriedades e sua aplicação em diferentes problemas de separação começou efetivamente no início do século XX, com os trabalhos de Bechhold [2], que também introduziu o termo "ultrafiltração", em 1908. Posteriormente vieram os estudos de Bachmann, Zsigmondy e Elford, principalmente com membranas de nitrato de celulose. Membranas para diálise feitas com celofane foram estudadas primeiramente por McBain [3]. Nesta época apareceram os trabalhos de Meyer e Sievers [4] e Meyer e Strauss [5] sobre o desenvolvimento da eletrodiálise.

A utilização das membranas em escala industrial se iniciou depois da II Guerra Mundial, com o desenvolvimento do primeiro rim artificial, por Kolff [*in Reid et al.*, 6], impulsionando a demanda por grandes quantidades destas membranas que foram, desde então, produzidas pelas companhias Sartorius e Millipore.

Reid [6] conseguiu produzir membranas eficientes para processos de osmose reversa. Anos mais tarde, Riley e Cadotte [2] conduziram o aperfeiçoamento destes materiais,

produzindo as primeiras membranas compósitas. Michaels e outros estudaram o mecanismo de formação de membranas assimétricas e criaram a base para o desenvolvimento de séries de membranas para ultra- e microfiltração com diferentes propriedades [2].

Membranas líquidas, o objeto deste estudo, não têm tantas aplicações em processos industriais como as membranas sólidas, mas são importantes no desenvolvimento de processos que futuramente serão empregados em larga escala. Vários exemplos de aplicação deste tipo de membrana são encontrados na literatura [7,8]; apenas para citar, dois deles são a utilização de carregadores extremamente específicos em membranas líquidas para a separação de isômeros D- e L- de um tipo de pesticida e o emprego de membranas líquidas suportadas para a liberação de heparina no interior de veias durante vários anos, como prevenção de processos de trombose.

Membranas biológicas

Membranas biológicas desempenham um papel importante em vários processos que ocorrem em organismos vivos pois, através de microambientes e compartimentos de formas e tamanhos definidos em muitos casos, organizam a matéria viva nas células, criando uma matriz fluida e bidimensional e permitindo o transporte controlado de diversos tipos de solutos. Funções celulares como reconhecimento, incorporação de nutrientes e liberação de compostos indesejáveis para o meio externo (endocitose e exocitose) [9], interação intercelular, translocação, transporte e osmose são todos processos mediados por membranas [10,11].

Entre as funções das biomembranas uma das mais importantes é o transporte ativo, ou seja, o transporte contra um gradiente de concentração. É esse mecanismo que permite a muitos organismos viver num ambiente pobre em nutrientes. O transporte ativo desempenha papel importante também no corpo humano. Por exemplo, a concentração de íons sódio dentro das células é menor que fora delas, enquanto que para os íons potássio ocorre o contrário. Os íons Na^+ e K^+ podem fluir para dentro ou fora das células de acordo com um gradiente de concentração. Assim, a manutenção de gradientes de concentração através da membrana celular reflete a existência de um sistema de transporte que bombeia Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula [7,9]. Um outro exemplo é o transporte de açúcar e íons sódio (mecanismo “symport”) no intestino delgado e nos rins.

Sabe-se que as membranas celulares são compostas de fosfolípidios. A imagem obtida após a reação entre uma sonda (contrastador) e a cabeça polar dos grupos fosfolipídicos permite estimar a espessura da membrana em um valor entre 5 e 10 nm [7, 12].

Em água os fosfolípidios se organizam facilmente para formar bicamadas. Quando eles são dispersos em solução salina e é feita uma sonificação são formadas vesículas fechadas e a membrana é composta de uma única bicamada (lipossomo). Uma outra membrana lipídica bem conhecida é a bicamada planar, formada pela injeção de fosfatidilcolina em decano, por exemplo, em um pequeno orifício numa partição entre dois meios aquosos; neste caso, uma bicamada de lípidios é formada espontaneamente. Outro método para formação de membranas bastante utilizado é aquele no qual uma monocamada de lípidios é formada em duas soluções separadas por um filme plástico com pequeno orifício [7]. Uma vez que um lípidio é um surfatante natural, pode-se dizer que a membrana celular é um tipo de membrana líquida.

Boa parte do que se conhece sobre a estrutura das membranas deve-se a investigações usando modelos [13]. Surfatantes em monocamadas e bicamadas [9,14] e vesículas de fosfolípidios [15] têm sido muito usados como modelos de membranas. Deve ser observado, entretanto, que *nenhum* modelo é perfeito ou capaz de imitar simultaneamente todos os aspectos de um conjunto mais complexo de membranas.

É conveniente reforçar que não é necessário que se reproduza a natureza de maneira fiel em *todos* os detalhes. Pode-se entender muitos dos mecanismos através de sistemas com micelas, monocamadas, bicamadas, vesículas, sistemas hospedeiro-convidado e outros [16].

Um importante objetivo nos estudos com modelos de membranas é o desenvolvimento de novos processos com aplicações práticas baseando-se naqueles mediados por membranas em sistemas mais simples, como as líquidas [16].

Membranas artificiais

A primeira indicação importante de que uma membrana líquida hidrofóbica artificial poderia mimetizar o processo de reconhecimento específico de uma membrana biológica foi relatada por Cussler [17] em 1971. Ele teve sucesso no transporte de íons de metais alcalinos através de uma fase orgânica (meio de baixa constante dielétrica, que é da mesma ordem da encontrada em membranas biológicas) contendo uma substância macrocíclica recentemente

(naquela época) sintetizada por Pedersen [18] e desenvolvida mais tarde por Pedersen [18] e Dietrich [19]. Desde então, as membranas líquidas têm sido estudadas como modelos de membranas biológicas e como uma ferramenta para efetuar extrações e separações de espécies químicas a partir de soluções bastante diluídas nestas espécies [20].

Nos últimos anos houve um grande avanço tecnológico no uso de membranas semi-permeáveis para separação de misturas complexas [21]. Os processos de separação mais importantes que têm sido estudados e citados são a microfiltração, ultrafiltração, osmose reversa, diálise e eletrodialise. Entretanto, estas membranas poliméricas geralmente apresentam deficiências como baixo fluxo e baixa seletividade nos processos de separação, o que tem restringido bastante seu uso industrial.

Existem dois tipos básicos de membranas sintéticas para separação: líquidas e sólidas. As primeiras normalmente oferecem maior seletividade a um íon que se quer separar, enquanto que as sólidas geralmente oferecem maior estabilidade mecânica para usos práticos, sendo muito mais facilmente empregadas em sistemas industriais [7].

No campo das membranas líquidas têm sido mais frequentemente estudados cinco tipos específicos: "Bulk Liquid Membrane" (BLM), "Liquid Surfactant Membrane" (LSM), "Thin Sheet Supported Liquid Membrane" (TS), "Hollow Fiber Supported Liquid Membrane" (HF) e "Two Module Hollow Fiber Supported Liquid Membrane" (TMHF). A Figura 1 mostra estes sistemas de forma esquematizada [7].

Os sistemas "bulk" (BLM), empregados neste trabalho, requerem pequenas quantidades de material e a razão entre os volumes das fases aquosa e orgânica pode ser tão baixa como 2 : 1. Os resultados obtidos têm desvios padrão às vezes altos, tornando difícil uma boa modelagem do sistema em alguns casos [22].

Usando o método TS pode-se prever o comportamento de sistemas HF que trabalhem em condições idênticas. No entanto existem muitas desvantagens, como a necessidade de usar solventes e carregadores extremamente hidrofóbicos e a taxa de transporte ser muito baixa, o que leva à inviabilidade comercial do processo [22].

Recentemente tem sido estudado o desenvolvimento de processos com maior eficiência e seletividade. Para reduzir os problemas encontrados com as membranas poliméricas muitos grupos têm usado as membranas líquidas, consideradas como uma tecnologia promissora nesta área de extração e separação.

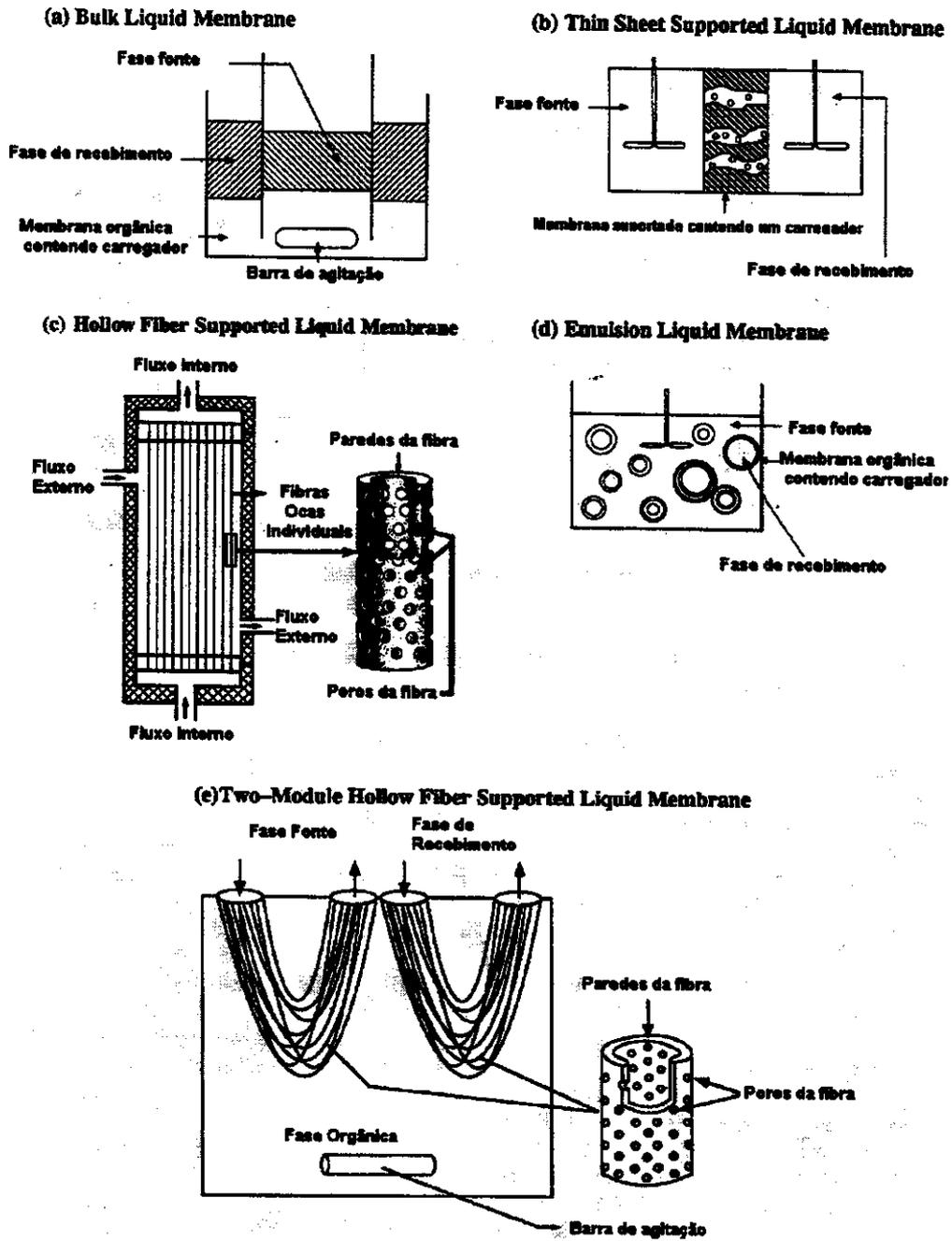


Figura 1: Sistemas de membranas líquidas mais comuns [7]

Com membranas líquidas pode ser alcançada uma separação muito boa devido à existência de mecanismos de transporte facilitado, enquanto separações possíveis com membranas poliméricas são muito menos completas [21]. A tecnologia de membranas líquidas pode ser ainda bastante desenvolvida para aumentar a eficiência de uma grande gama de

processos industriais, tais como a separação de hidrocarbonetos [23] e em remoção de metais em efluentes de metalúrgicas [24].

Alguns aspectos energéticos

Uma bicamada lipídica pode ser vista como sendo um exemplo de membrana líquida sintética; em seu interior o meio tem uma baixa constante dielétrica representando, então, uma barreira energética muito alta para a passagem de pequenos íons como Na^+ e K^+ [25].

A equação de Born define w como sendo a energia requerida para transferir um íon de raio r e carga z de uma fase aquosa semi-infinita (constante dielétrica $\epsilon = 79$) para uma membrana de constante dielétrica ϵ_m :

$$w = \frac{z^2 e_0^2}{8 \kappa T \pi \epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon} \right)$$

onde e_0 = carga elementar = $1,6 \cdot 10^{-19}$ C; z = carga do íon (C); ϵ_0 = permissividade elétrica do vácuo = $8,85 \cdot 10^{-12}$ F m⁻¹; w = energia (J); T = temperatura absoluta (K); κ = constante de Boltzmann = $1,38 \cdot 10^{-23}$ J K⁻¹; r = raio iônico da espécie em estudo (m).

Calculando o valor de w para um íon como potássio não hidratado, ($r = 0,13$ nm) e considerando a constante dielétrica de uma membrana típica $\epsilon_m = 2,1$ encontramos um valor de energia bastante elevado, que deve ser vencido para ocorrer o transporte [25]:

$$w \approx 100 \text{ J}$$

Esta equação é encontrada também na forma

$$\Delta_R G^o = - \frac{z^2 e_0^2 N_A}{8 \pi \epsilon_0 r} \left(1 - \frac{\epsilon}{\epsilon_m} \right)$$

A característica central da maioria dos sistemas de membranas líquidas utilizados atualmente é a taxa da transferência de massa comparada à obtida quando se usa uma membrana sólida. Isto está ligado à permeabilidade da membrana, que depende fortemente da presença de constituintes especializados (geralmente chamados de carregadores, ou ionóforos -

para moléculas de natureza biológica) que possam criar caminhos energeticamente favoráveis para o transporte de íons através de um meio apolar (representado pela membrana) [26].

Para um transporte efetivo de uma espécie química através de uma membrana líquida hidrofóbica, é adequado o uso de um carregador que se una fortemente à espécie de interesse. Além da seletividade, também a permeabilidade através da membrana é melhorada com o carregador e embora existam diversos tipos de carregadores, todos agem baseados no mesmo princípio: acomodam a espécie de interesse (um cátion, um ânion ou uma molécula neutra) em cavidades características em virtude da ligação de grupos polares com a espécie a ser transportada e fazem com que os complexos formados sejam solúveis em membranas líquidas não polares [27]. O transporte através de uma membrana pode ser feito, também, por carregadores não cíclicos que interajam com regiões específicas de uma molécula (mais tarde serão dados exemplos) ou ainda com o uso de micelas de determinadas classes de surfatantes. A Figura 2 mostra esquematicamente as diferenças de energia necessárias nos casos de transporte com e sem carregador.

O Transporte através de Membranas Artificiais

Ainda hoje não são totalmente conhecidos os detalhes mecanísticos e energéticos envolvidos no transporte de espécies químicas neutras e carregadas, embora estes sejam essenciais para o metabolismo celular e manutenção da vida. Têm sido propostos diversos modelos matemáticos, que têm sido tratados teoricamente, para elucidar os sistemas de transporte variados [28-31].

As teorias desenvolvidas têm se mostrado eficazes na tarefa de auxiliar o entendimento dos sistemas existentes e o planejamento de outros ainda mais eficientes e seletivos.

É importante lembrar que as equações fundamentais da fisico-química são aplicáveis a uma grande variedade de processos, especialmente as equações de difusão. De maneira geral, a difusão pode ser entendida como sendo um processo fisico-químico no qual as moléculas de um líquido ou de um soluto se misturam ou se dispersam, em virtude de sua energia térmica ou de gradientes de concentração. Este é um processo espontâneo que leva o sistema ao equilíbrio termodinâmico, e é acompanhado por um aumento na entropia total ou, no caso de ocorrer isotermicamente, por um decréscimo na energia livre total [32].

Num sistema qualquer, o movimento das partículas e moléculas está constantemente sendo alterado de forma aleatória, tanto em velocidade como em direção.

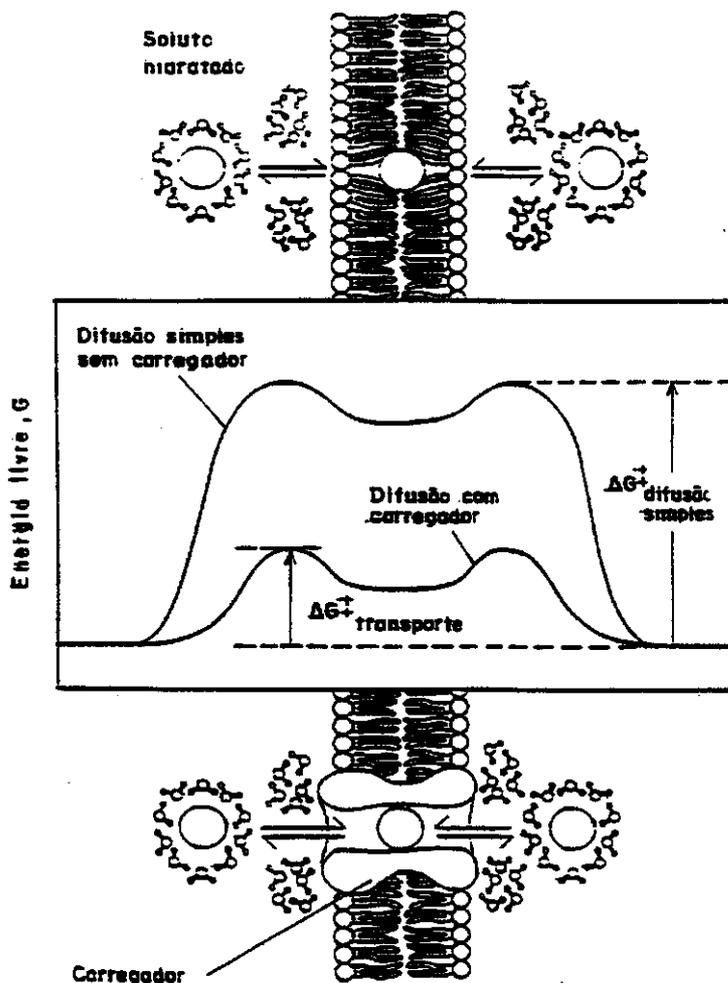


Figura 2: Comparação de energias envolvidas em dois tipos de transporte [28].

A equação de Maxwell-Boltzmann descreve a distribuição das velocidades das espécies [33].

$$f(v) = (m / 2 \pi k T)^{1/2} e^{-m v^2 / 2 k T}$$

sendo m a massa da partícula, k a constante de Boltzmann, v a velocidade da partícula e T a temperatura absoluta.

Fowler estimou em cerca de 10^{20} o número de mudanças de direção por segundo para uma molécula. Tal movimento forneceu as primeiras evidências para o desenvolvimento da

teoria cinética molecular e foi interpretado como proveniente de choques das partículas com as paredes do recipiente, com outras partículas em suspensão e, ainda, com moléculas presentes [32]. Hoje é sabido que no processo de difusão em líquidos devem ser considerados os movimentos rotacional (o processo de dispersão de espécies devido apenas ao movimento Browniano) e translacional (processo de dispersão de espécies associado a gradientes de concentração).

Para espécies neutras, numa analogia formal com a lei de Ohm para correntes elétricas e com a lei de Fourier para fluxo de calor, nas quais a força motriz dos processos é uma diferença de potencial ou um gradiente de temperatura, a difusão de partículas é dirigida por uma diferença de potencial químico.

O movimento translacional pode ser explicado pela termodinâmica, segundo a qual o trabalho máximo ocorre quando, a temperatura e pressão constantes, uma espécie se move de uma região onde seu potencial químico é μ para outra região, onde seu potencial é $\mu + d\mu$ ou vice-versa [34].

A teoria clássica de difusão em líquidos [32] estabelece que o gradiente de energia livre de difusão para um componente em solução pode ser considerado equivalente a uma força atuante sobre as moléculas que é responsável pelo seu movimento em sentido oposto ao de uma segunda força, normalmente atribuída à resistência causada pela viscosidade do líquido à difusão.

Para taxas de difusão não muito elevadas, a velocidade média de difusão das moléculas (v) pode ser considerada proporcional à força atuante em sentido oposto (definida como sendo $F = -RT/a (\delta a / \delta x)$), sendo que a constante de proporcionalidade é dada pela mobilidade u ($= v / F$).

Fazendo a substituição na expressão anterior para F , e considerando que atividade e concentração são iguais (verdadeiro para soluções idealmente diluídas ou líquidos puros) chega-se a $c v = -RTu (\delta c / \delta x)$

É mais comum encontrar o produto cv na forma de fluxo molecular, J , expresso em unidades de mol cm^{-2} ; sendo $D = RTu$ o coeficiente de difusão, vem a expressão da primeira lei de Fick:

$$J = -D \delta c / \delta x$$

Freqüentemente se faz a medida de J através da medida da taxa de variação da concentração com o tempo, ou seja, dJ/dx é representado por dc/dt . Assim temos a segunda lei de Fick

$$\delta c / \delta t = - D \delta^2 c / \delta x^2$$

Os tipos fundamentais de transporte

O transporte de espécies através de membranas, em geral, é classificado em três tipos fundamentais, mostrados na Figura 3 [9]:

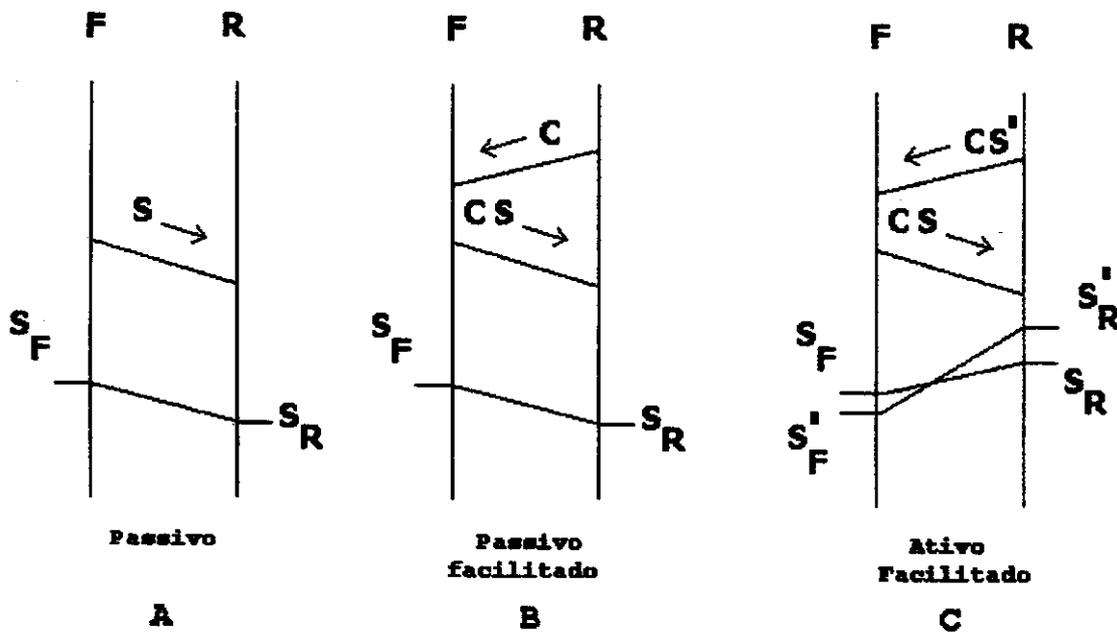


Figura 3: Mecanismos de transporte mais comuns

A Figura 3A mostra um modelo do transporte passivo, segundo o qual há a passagem da espécie S presente inicialmente no lado esquerdo (fase fonte, F), onde está em alta concentração, para o lado direito (fase de recebimento, R) onde sua concentração é muito baixa, de acordo com um gradiente de concentração na membrana. Este gradiente pode ser representado pela equação (1)

$$\frac{[S_i]_F - [S_i]_R}{[l]} = \frac{K_1}{l} ([S]_F - [S]_R) \quad (1)$$

onde $[S_i]_F$ e $[S_i]_R$ são as concentrações de S nas interfaces da membrana com as fases fonte e de recebimento, respectivamente; $[S]_F$ e $[S]_R$ são as concentrações de S na parte externa da membrana nas fases fonte e de recebimento; l é a espessura da membrana e K_1 é a constante de equilíbrio de S dentro e fora da membrana ($K_1 = [S_i] / [S]$).

O fluxo de S do lado esquerdo para o direito é dado pela equação (2)

$$J_S = \frac{D_S K_1}{l} ([S]_F - [S]_R) \quad (2)$$

sendo J_S o fluxo de S e D_S o coeficiente de difusão de S na membrana. Pode-se perceber facilmente que não pode haver transporte se o gradiente de concentração de S na membrana for nulo, ou seja, se $[S]_F = [S]_R$.

O coeficiente de difusão (D) de uma espécie química num solvente com viscosidade η é inversamente proporcional ao seu raio hidrodinâmico, segundo a equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{\kappa T}{6 \pi \eta a} \quad a = \text{raio hidrodinâmico}$$

A Figura 3B mostra outro tipo de transporte, no qual um carregador (C) presente na membrana incorpora a espécie S, formando um complexo CS. Neste sistema de transporte, além do transporte passivo mostrado na Figura 3A, há o transporte facilitado pela formação do complexo. A este sistema se dá o nome de *transporte passivo facilitado*. Quando o carregador puder formar um complexo com uma espécie em particular pode haver seletividade no processo, permitindo maior utilização industrial [9].

Nas duas situações descritas (transporte facilitado ou não-facilitado) a espécie a ser transportada passará do lado onde está em maior concentração para o lado onde tem menor concentração. Nas condições usuais de transporte a concentração de carregador na membrana é muito baixa se comparada à concentração da espécie S a ser carregada. Quando a formação do complexo CS e sua dissociação são etapas muito rápidas o transporte propriamente dito é a etapa limitante da velocidade e assume-se que a concentração do complexo na membrana segue a equação de Michaelis-Menten, como nas reações enzimáticas. De acordo com esta discussão o gradiente de concentração nos processos de transporte facilitado é dado pela equação (3)

$$\frac{[CS_i]_F - [CS_i]_R}{l} = \frac{K_2[C]_0}{l} \left(\frac{[S]_F}{1 + K_2[S]_F} - \frac{[S]_R}{1 + K_2[S]_R} \right) \quad (3)$$

onde $[CS_i]_F$ e $[CS_i]_R$ são as concentrações de CS nas interfaces da membrana com as fases fonte e de recebimento, respectivamente; $[S]_F$ e $[S]_R$ são as concentrações de S na parte externa da membrana no lado das fases fonte e de recebimento; l é a espessura da membrana; K_2 é a constante de formação de CS e $[C]_0$ é a concentração total do carregador ($[C]_0 = [C] + [CS]$).

A expressão para o fluxo de S do lado esquerdo para o direito é dada pela equação (4)

$$J_S = \frac{D_{CS} K_2 [C]_0}{l} \left(\frac{[S]_F}{1 + K_2 [S]_F} - \frac{[S]_R}{1 + K_2 [S]_R} \right) \quad (4)$$

onde D_{CS} é o coeficiente de difusão de CS na membrana. Mais uma vez pode ser notado que o transporte não ocorre a partir do momento em que $[S]_F = [S]_R$.

O transporte facilitado de uma espécie devido à existência de um carregador na membrana pode ser explicada da seguinte maneira [9]:

- as relações entre os fluxos e os gradientes de potencial químico da espécie S, carregador C e complexo CS são dados por

$$-\nabla_{\mu_S} = L_S J_S \quad -\nabla_{\mu_C} = L_C J_C \quad -\nabla_{\mu_{CS}} = L_{CS} J_{CS}$$

sendo J o fluxo da espécie, ∇_{μ} o gradiente de potencial químico e L uma constante

- a formação do complexo na membrana pode ser representada por $C + S = CS$. A potência de interação (I) para este complexo é dada por

$$I = \mu_S + \mu_C - \mu_{CS}$$

- assumindo a condição de estado estacionário pode-se escrever que $J_C + J_{CS} = 0$; uma vez que J é o fluxo da espécie transportada para fora da membrana ele corresponde à soma dos fluxos da espécie em si e do complexo formado, ou seja, $J = J_S + J_{CS}$
- se a formação e a dissociação do complexo são etapas muito rápidas o equilíbrio químico é mantido na membrana e, conseqüentemente, $I = 0$ e então $\nabla I = 0$; desta forma,

$$\nabla_{\mu_S} + \nabla_{\mu_C} - \nabla_{\mu_{CS}} = 0$$

Desenvolvendo algebricamente:

$$\begin{aligned}
-L_S J_S - L_C J_C + L_{CS} J_{CS} &= 0 \\
L_{CS} J_{CS} - L_S J_S &= L_C J_C \\
L_{CS} (J - J_S) &= L_S (J - J_{CS}) + L_C J_C \\
L_{CS} J - L_{CS} J_S &= L_S J - L_S J_{CS} + L_C J_C \\
L_{CS} J - L_S J &= L_{CS} J_S - L_{CS} J_S - L_S J_{CS} + L_C J_C \\
J(L_{CS} - L_S) &= L_{CS} J_S - J_{CS} (L_S + L_C) \\
J(L_{CS} - L_S) &= L_{CS} J_S - (J - J_S)(L_S + L_C) \\
J(L_{CS} - L_S) &= L_{CS} J_S - L_S J - L_C J + L_S J_S + L_C J_S \\
J(L_{CS} - L_S) + L_S J + L_C J &= J_S (L_{CS} + L_C + L_S) \\
L_{CS} J - L_S J + L_S J + L_C J &= J_S (L_{CS} + L_C + L_S) \\
J &= \frac{J_S (L_{CS} + L_C + L_S)}{(L_C + L_{CS})} \\
J &= \frac{-\nabla \mu_S}{L_S} \left(1 + \frac{L_S}{L_C + L_{CS}} \right)
\end{aligned}$$

A primeira parte desta expressão (antes dos parênteses) é o fluxo da espécie S através da membrana nos processos não facilitados, de maneira que a parte entre parênteses é a contribuição do carregador para o aumento da taxa de transporte nos processos facilitados, já que os valores de L são sempre positivos [9].

Um modelo de transporte ativo é mostrado na Figura 3C. Este mecanismo é chamado de *ativo* porque permite que uma ou mais espécies sejam transportadas do lado onde estão mais diluídas para o lado onde estão em maior concentração. Nesta forma de transporte a espécie S é transportada de acordo com o gradiente de concentração do complexo CS na membrana e o transporte é atribuído à energia conjugada para o transporte do complexo CS', entre as espécies S', presente na fase fonte, e o carregador C, presente na membrana, no sentido da direita para a esquerda (contrário ao do transporte de CS). Neste caso o gradiente de concentração é dado pela equação (5)

$$\frac{[CS_i]_F - [CS_i]_R}{[l]} = \frac{K_2 [C]_0}{l} \left(\frac{[S]_F}{1 + K_2 [S]_F + K_3 [S']_F} - \frac{[S]_R}{1 + K_2 [S]_R + K_3 [S']_R} \right) \quad (5)$$

onde K_3 é a constante de formação do complexo CS' e $[S']_F$ e $[S']_R$ são as concentrações de S' nas fases fonte e de recebimento, respectivamente. O fluxo de CS é dado, de maneira análoga aos outros dois casos, pela equação (6)

$$J_{CS} = \frac{D_{CS}K_2[C]_0}{l} \left(\frac{[S]_F}{1 + K_2[S]_F + K_3[S']_F} - \frac{[S]_R}{1 + K_2[S]_R + K_3[S']_R} \right) \quad (6)$$

Mesmo que o processo se inicie com concentrações iguais de S nos dois lados do sistema, usando a equação acima encontra-se que $[S']_F < [S']_R$ e assim $J_s > 0$. O transporte de S ocorre ativamente até que se atinja uma condição em que

$$[S]_F - [S]_R + K_2 \left([S]_F [S']_R - [S]_R [S']_F \right) = 0$$

Associadas a este tipo de transporte existem duas possibilidades, chamadas de simporte (ou co-transporte) e antiporte (ou contra-transporte). No primeiro caso duas espécies estão sendo transportadas ao mesmo tempo e em sentidos iguais; no antiporte, as duas espécies são transportadas simultaneamente em sentidos opostos [7].

Éteres coroa como carregadores para cátions alcalinos e alcalino-terrosos

Os éteres coroa ou poliéteres macrocíclicos foram sintetizados por Pedersen em 1967 [7]. Tais compostos interagem normalmente de maneira seletiva com os cátions de metais alcalinos primeiramente de acordo com os tamanhos da espécie a ser transportada e da cavidade do carregador [35], e este tipo de seletividade é observada em processos de solução homogênea, extração por solvente [36,37] e sistemas de membranas líquidas [37].

O diâmetro da cavidade de poliéteres (Bartsch *et al.*, in Noble *et al.*, [38]) é estimado pelo modelo de Corey-Pauling-Kolton (CPK). Segundo este modelo, um cátion forma um complexo mais estável com um carregador cuja cavidade tenha um tamanho próximo ao seu raio iônico.

Na Tabela 1 são indicados alguns dos tamanhos de cavidades de carregadores e de cátions mais comuns e frequentemente utilizados em estudos envolvendo membranas líquidas.

Tabela 1: Diâmetros de carregadores e cátions mais comuns [39,40]

Éter coroa	Diâmetro (Å)	Cátion	Diâmetro (Å)
12C4	1,20 - 1,50	Li ⁺	1,36
15C5	1,72 - 2,20	Na ⁺	1,94
16C5	2,00 - 2,40	K ⁺	2,66
18C6	2,68 - 3,20	Rb ⁺	2,98
19C6	3,00 - 3,50	Cs ⁺	3,40
21C7	3,40	Ba ⁺²	2,86
24C8	4,00	Ca ⁺²	2,12

O uso de um macrociclo ionizável [41] em sistemas de membranas líquidas evita a necessidade do controle de um ânion quando o complexo $CE^- M^+$ atravessa a membrana. Neste caso, a energia de solvatação do cátion deixa de ter importância fundamental no processo de transferência, que passa a ser dirigido por um gradiente de pH e de concentração de M^+ nas fases fonte e de recebimento.

Características importantes dos carregadores devem ser sua solubilidade no solvente da membrana e sua capacidade de difusão rápida através da membrana. Além disso, deve haver um compromisso entre a energia de complexação do carregador com o íon, que deve ser obrigatoriamente maior que a energia de hidratação do mesmo, porém não tão grande que não permita a liberação do cátion na fase interna [42].

As propriedades de associação de éteres coroa com cátions de metais alcalinos têm sido descritas principalmente em termos da similaridade entre os tamanhos dos cátions e da cavidade destes carregadores [43-46], porém o efeito do solvente não é considerado em muitos casos.

Efeito dos solventes

Compostos bioativos quando adicionados à suspensão de microorganismos ou células são transportados do meio aquoso para o sítio de ação. A resposta biológica envolve a passagem da droga do meio aquoso para o sítio de ação da célula, sendo que nesta transferência de fase, dois processos complexos ocorrem: movimento da droga através da membrana biológica e ocorrência de interação física ou química, limitada pela velocidade, no sítio do receptor [47].

Ambos os processos são frequentemente distantes (em tempo e espaço) da resposta biológica observada, porque a droga, antes de produzir um efeito, deve atravessar uma série de compartimentos essencialmente constituídos de fases aquosas e orgânicas.

Na tentativa de descobrir a etapa mais importante neste processo, o uso do coeficiente de partição P tem se mostrado importante [47]. O coeficiente de partição para uma solução ideal é definido como:

$$P = x_{(o)} / x_{(aq)}$$

onde $x_{(o)}$ e $x_{(aq)}$ são as frações molares do composto bioativo na fase não-aquosa e aquosa respectivamente, as quais estão em equilíbrio e em contato entre si. Na prática, esta equação é frequentemente escrita como:

$$P = C_{(o)} / C_{(aq)}$$

onde C é a concentração molar, desde que a concentração em cada sistema de solvente esteja dentro do intervalo que obedeça à lei de Henry.

Hansch [48] correlacionou a atividade biológica de drogas com a estrutura química e com o coeficiente de partição. O trabalho de Hansch começa com uma substância química de ação biológica conhecida e compara sua atividade com a de compostos de estrutura análoga, diferindo destas apenas nos grupos substituintes. Ele determina o coeficiente de partição do composto pai e dos seus derivados (por exemplo, ácidos carboxílicos) entre água (solvente polar) e *n*-octanol (solvente apolar). A diferença entre os respectivos logaritmos do coeficiente de partição é chamado de constante de hidrofobicidade π .

$$\pi = \log P_{\text{COOH}} - \log P_{\text{H}}$$

A constante de hidrofobicidade é a medida da contribuição do substituinte na solubilidade, numa série de partições; P_{COOH} é o coeficiente de partição do derivado carboxílico; P_{H} é o coeficiente de partição do composto pai. Se $\pi > 0$, significa que o grupo substituinte aumenta a solubilidade do composto no solvente não polar. Se $\pi < 0$, o grupo substituinte aumentará a solubilidade do composto em solventes polares.

O trabalho de Hansch leva também em consideração a equação de Hammett [49]:

$$\log (K / K_o) = \rho \sigma$$

onde K é a constante de equilíbrio para o grupo substituinte COOH e K_o para a estrutura pai. Dois parâmetros são considerados nesta equação: σ (característica somente do substituinte) representa a habilidade do grupo substituinte de atrair ou repelir elétrons através da

combinação de efeitos indutivos e de ressonância; ρ (característica da reação considerada) mede a sensibilidade deste tipo de reação para a substituição no composto pai. Para cada constante de equilíbrio desta equação é possível escrever $\Delta G = -RT \ln K$ e, neste caso, a equação de Hammett é conhecida como Relação Linear de Energia Livre (RLEL).

O valor de σ pode ser obtido medindo o efeito do substituinte na constante de ionização do composto pai, porque:

$$\sigma = \log (K_{\text{COOH}} / K_{\text{H}})$$

onde K_{COOH} e K_{H} são as constantes de ionização dos compostos substituídos e não substituídos respectivamente. Se um substituinte apresenta $\sigma > 0$ significa que ele atrai elétrons e se $\sigma < 0$, doa elétrons.

Usando os parâmetros π , σ e ρ e não considerando fatores estéricos, Hansch modificou a equação de Hammett obtendo a equação:

$$\log (1/C) = -k \pi^2 + k' \pi + \sigma \rho + k''$$

onde C é a concentração necessária da droga para produzir o efeito biológico e k , k' e k'' são constantes para o sistema estudado, determinadas através de análise de regressão.

Os bactericidas

Compostos bioativos podem exercer efeitos bactericidas e / ou bacteriostáticos, sendo que estes dois estão relacionados com a concentração destes compostos. Ações bacteriostáticas normalmente são resultado de formas de inibição metabólica e podem ser revertidas com a eliminação do composto. Por outro lado, a ação bactericida é o resultado de um dano irreversível ou irreparável a uma estrutura da célula, geralmente na membrana citoplasmática. Em geral, os compostos bioativos são um grupo muito heterogêneo de substâncias químicas, bem classificadas segundo seu comportamento frente às diversas situações de aplicação, mas com modo de ação muitas vezes indefinido.

Desde a descoberta do fenol (1834) e sua introdução como antisséptico cirúrgico por Lister (1867), estes e muitos de seus derivados têm sido estudados como sendo agentes antibacterianos. A maioria dos trabalhos com desinfetantes fenólicos tem sido centrada em considerações práticas, como espectro de ação antimicrobiana, aplicações, formulação, etc [50]. O fenol é um agente desnaturante que causa a precipitação de proteínas; este fato tem

sido relacionado à ação antibacteriana destes compostos, especialmente quando aplicados a estruturas vitais e enzimas de microorganismos [50,51]. Os fenóis em geral (usados como bactericidas) podem causar a morte de microorganismos por interferirem em processos de transporte através da membrana celular, por agirem diretamente no citoplasma (processos de coagulação) ou ainda por romperem a membrana celular. O mecanismo de ação de desinfetantes contendo fenóis tem sido bastante estudado, e acredita-se atualmente que eles interrompam o transporte através de membranas celulares, danificando as paredes das células e permitindo a saída de constituintes essenciais para as regiões extra-celulares [52-54]. Alguns fenóis (como por exemplo o 2,4-dinitrofenol) são também desacopladores da cadeia respiratória de vários microorganismos [55].

Nos últimos anos tem havido uma preocupação crescente no sentido de se definir mais precisamente os mecanismos de ação bactericida, pois uma vez que consiga esta definição será possível entender a resistência de alguns microorganismos à ação de determinados compostos. Entendendo a base bioquímica de ação, é possível identificar possíveis efeitos sinérgicos entre biocidas e então desenvolver novos fármacos ou usar misturas de vários deles em um dado tratamento.

Uma vez que não são bem conhecidos os mecanismos de ação de cada um [50], pouco se conhece até hoje sobre as regiões exclusivas de ação para um composto bioativo. Por exemplo, os ésteres alquílicos do ácido p-hidroxibenzóico, comumente chamados de parabens [56] são largamente empregados como preservantes em cosméticos, alimentos e medicamentos [57]. Devido ao seu largo emprego, o potencial tóxico destes compostos tem sido bastante estudado em sistemas *in vivo* e *in vitro*, a fim de se determinar suas propriedades toxicológicas, tais como: toxicidade aguda e crônica, carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, efeitos citogenéticos, irritação e sensibilização [56].

Embora se suponha que os parabens tenham baixa toxicidade, eles exercem comprovadamente ação sobre diversos tecidos e funções celulares. Há relatos de que eles podem inibir a síntese de ácidos nucleicos via inibição de muitos sistemas enzimáticos em microorganismos e fibroblastos de embriões de ratos [56], causar depressão aguda do miocárdio acompanhada de hipotensão em cães [58], inibir a ação ciliar em alguns organismos [59], induzir a hemólise em coelhos e eritrócitos humanos e agir como moduladores em processos celulares de neurônios periféricos [60].

O metabolismo e a eliminação de parabens têm sido muito estudados em diversos animais e no homem [56]. Em geral, após administração oral em ratos, os parabens são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e facilmente hidrolisados a ácido p-hidroxibenzóico, por esterases presentes nos órgãos [61].

É sabido que o ácido p-hidroxibenzóico é um intermediário na seqüência metabólica de ubiquinonas, tirosina e outros componentes celulares *in vivo*. Foi verificada a extrema eficiência das esterases dos pulmões e rins na tarefa de hidrolisar parabens [56]. Os m-alcoxifenóis e os p-hidroxibenzoatos são, reconhecidamente, agentes bactericidas.

Os sais de amônio quaternário são exemplos de uma classe de compostos que age eficazmente contra um tipo de microorganismo mas cujo mecanismo de ação ainda não está bem definido.

Na Figura 4 são mostrados alguns sítios-alvo para a ação de compostos bioativos. As regiões-alvo para a ação de compostos biocidas podem ser classificadas como: parede celular, membrana citoplasmática e citoplasma. Cada classe pode ser ainda subdividida, para que sejam consideradas outras regiões de importância estrutural ou bioquímica. É importante notar que estas classes e subdivisões são representações teóricas, e não há evidências da existência de exclusividade de uma certa área em relação à ação de um tipo de biocida [51].

Os avanços recentes na bioquímica de membranas têm enfatizado somente a importância metabólica e osmorregulatória desta organela, mas não têm destacado sua potencialidade como região muitas vezes sensível ao ataque de compostos biocidas. Alterações fundamentais na estrutura e funções vitais da célula, são geralmente causadas por interações que ocorrem na membrana citoplasmática, levando a distúrbios na respiração e no armazenamento de energia, como também modificação na ação enzimática e nos processos de transporte.

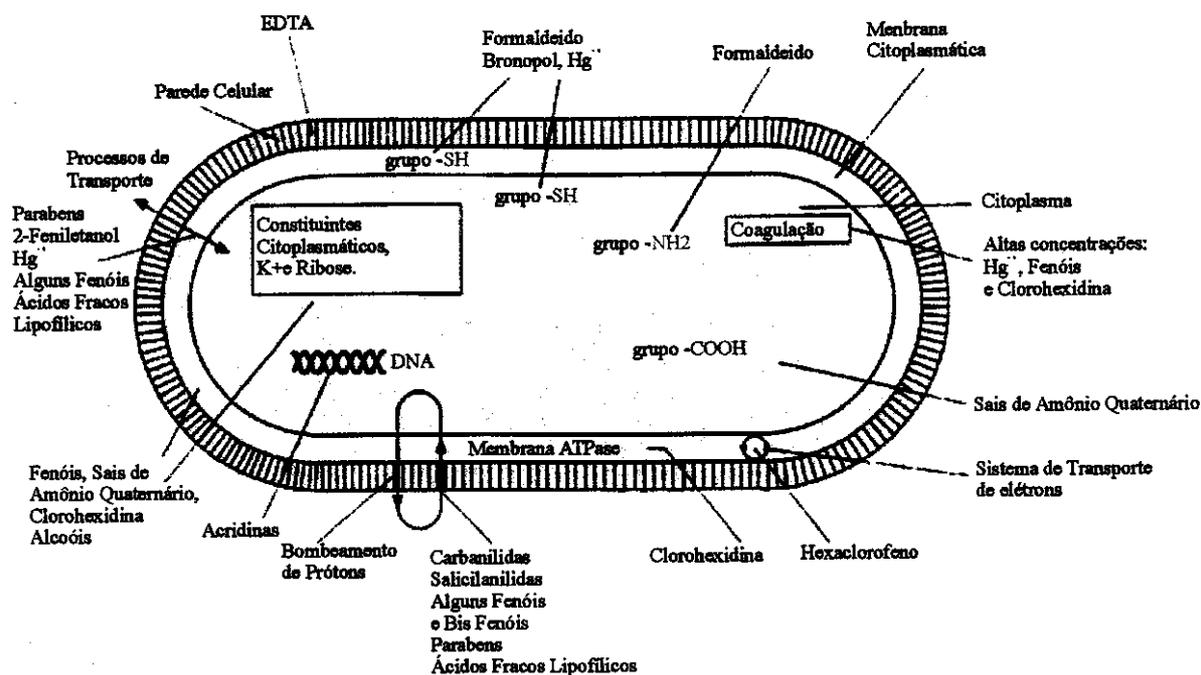


Figura 4: Diagrama esquemático indicando os principais alvos de uma célula de microorganismo para alguns compostos bioativos [51].

Ionóforos

Nos sistemas naturais os carregadores de espécies químicas são conhecidos como ionóforos e podem ser caracterizados como receptores que formam complexos lipofílicos estáveis com espécies hidrofílicas, sendo capazes de transportar tais espécies através de membranas naturais ou artificiais.

A maioria dos ionóforos possui a capacidade de discriminar entre cátions metálicos de diferentes tamanhos (por exemplo, a valinomicina tem uma afinidade 10000 vezes maior para íons potássio que para sódio), sendo necessário um ajuste geométrico e topológico mútuo entre o ionóforo e a espécie convidada para que haja a estabilização do aduto, que é normalmente um complexo 1: 1 [62].

São conhecidos muitos tipos de ionóforos, que variam bastante em composição química e tamanho molecular, mas todos se baseiam nos mesmos princípios de transporte por biomembranas. O monensin, por exemplo, tem várias estruturas moleculares que são comuns em outros ionóforos naturais. Embora seja um antibiótico poliéter acíclico, ele forma complexos lipofílicos altamente estáveis com muitos cátions metálicos. Tal complexação

provém da conformação pseudo-cíclica característica, sugerida por Agtarap e colaboradores [63] na qual grupos $-CO_2-$ e $-OH$ adequadamente dispostos nas extremidades das cadeias são ligados por pontes de hidrogênio intramolecular cabeça-cauda [7].

Micelas reversas como carregadores

Água e óleo não se misturam de maneira espontânea, mas com a adição de algum agente tensoativo é possível formar por exemplo uma microemulsão. Diversos sistemas podem ser formados, na verdade, dependendo das concentrações relativas de água, óleo e surfatante empregados. A Figura 5 mostra um esquema de um diagrama ternário possível [64].

Quando se adiciona quantidade suficiente de surfatante a uma mistura de óleo e água é formada uma fase simples, contendo gotículas como resultado de uma acomodação natural do sistema. Na região mais rica em óleo é mais favorável a existência de emulsões água em óleo (w/o); inversamente, na região com mais água as emulsões serão óleo em água (o/w).

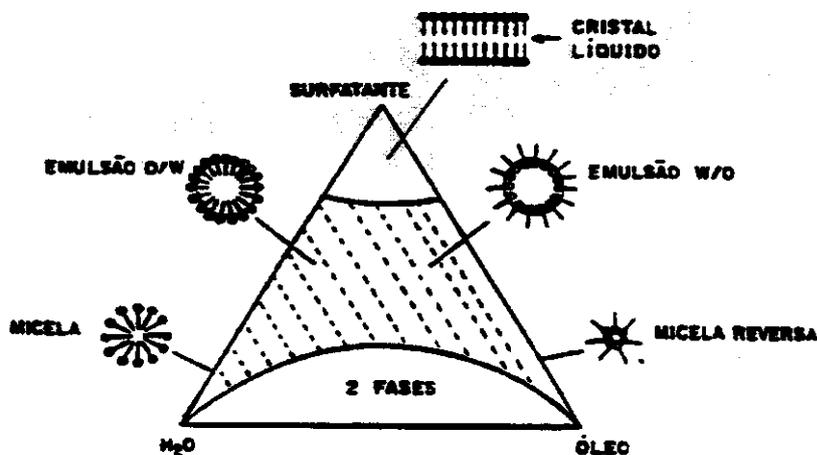


Figura 5: Um diagrama de fases ternário

Nos sistemas w/o as gotículas são menores que nos sistemas o/w e são frequentemente chamadas de micelas reversas. O sistema é termodinamicamente estável e as gotículas estão normalmente monodispersas [64].

A escolha do surfatante é um dos principais fatores na determinação da natureza da dispersão que será formada. Para sistemas o/w a curvatura da interface óleo-água é definida como sendo positiva, sendo as gotículas chamadas de micelas normais. Nos sistemas w/o,

portanto, a curvatura é negativa; as gotículas neste caso são formadas, preferencialmente, por surfatantes em forma de “cunha”, com a parte polar na parte mais “fina” da “cunha”. Mitchell e Ninham [65] interpretaram este fato em termos da geometria molecular do surfatante. Sendo V o volume do surfatante, A a área da cabeça polar e l o comprimento da cauda do tensoativo, se $0 < V / A l < 1$ haverá tendência à formação de sistemas o/w; se $V / A l > 1$ formam-se sistemas w/o e se $V / A l \approx 1$ forma-se uma fase com estruturas bicontínuas flutuantes, geralmente ocorrendo este fenômeno na região mais central do diagrama de fases.

Sendo sistemas auto-organizáveis são facilmente preparadas soluções de água, solvente orgânico e um tensoativo. No caso do Aerosol OT (um dos agentes tensoativos usados neste estudo) basta que se dissolva o mesmo em um solvente orgânico e em seguida se adicione lentamente e com leve agitação uma quantidade definida de água. Rapidamente o sistema torna-se translúcido, ficando límpido em poucos segundos. Na região bifásica do diagrama podem existir três tipos de sistemas, que serão apenas citados aqui: Winsor I, quando um sistema o/w coexiste com excesso de óleo; Winsor II, quando um sistema w/o coexiste com excesso de água e Winsor III, quando o surfatante está concentrado na região central do diagrama, muito provavelmente uma fase bicontínua[66].

Na década de 80, muitos estudos de transporte utilizando membranas líquidas foram publicados, envolvendo micelas ou gotas de microemulsões, que se tornaram um tipo completamente novo de carregadores móveis. Estes carregadores são entidades complexas, consistindo de conjuntos plurimoleculares de moléculas de surfatante, que podem conter ou não uma parte central aquosa ou oleosa [67-72].

Sob condições apropriadas micelas reversas (contendo um núcleo aquoso) dispersas no solvente orgânico estão em equilíbrio com a fase aquosa e podem ser usadas para extrair espécies polares desta fase.

Descrição da Micela Reversa

Geralmente em misturas ternárias surfatante / água / solvente orgânico formam-se agregados que têm forma esférica e são chamados micelas invertidas [73]. Tais micelas compreendem um núcleo interno aquoso envolvido por um filme de surfatante, que protege este núcleo do meio contínuo (solvente orgânico).

Usualmente o solvente orgânico perfaz 80 – 90%, a água 1-10% e o surfatante menos de 10% do volume total da solução. A fase aquosa pode conter também compostos hidrofílicos tais como íons, aminoácidos, peptídeos, proteínas ou mesmo células de microorganismos [16], que desta forma são facilmente incorporadas numa membrana hidrofóbica. Embora as soluções de micelas invertidas devam ser consideradas, em uma escala microscópica, como um sistema heterogêneo bifásico, elas se comportam como sistema homogêneo em uma escala macroscópica.

Soluções de micelas invertidas possuem algumas características gerais importantes [73,74]:

- (a) são termodinamicamente estáveis (não ocorre separação de fase com o tempo) e se formam espontaneamente;
- (b) a tensão interfacial estabelecida entre a água e o solvente orgânico é extremamente baixa ($<10^{-2}$ mN m⁻¹);
- (c) as gotículas de água – núcleo das micelas – são muito pequenas (< 100 nm), isto é, muito menores que o comprimento de onda da luz ou das gotículas de água das emulsões ordinárias (esta é a razão para o aspecto transparente da solução de micelas invertidas e o aspecto turvo de microemulsões normais);
- (d) como uma consequência do pequeno tamanho do agregado, a superfície interna entre os domínios água-solvente orgânico é grande (da ordem de centenas de m² cm⁻³) [75];
- (e) a viscosidade da solução é comparável com a viscosidade do solvente orgânico puro.

A estabilidade termodinâmica das gotículas de água em microemulsões água em óleo provém de um balanço delicado das contribuições opostas da energia livre de formação da microemulsão. Duas contribuições são as mais importantes:

- (a) um termo de energia livre interfacial que inclui a tensão superficial e um termo de energia livre para formar uma superfície curva;
- (b) um termo de entropia de dispersão responsável pela mistura das gotículas de micelas invertidas no solvente orgânico e pelas interações intermicelares.

Uma diminuição do tamanho das gotículas de água dispersas no solvente orgânico causa um aumento na energia interfacial. Entretanto, uma vez que a tensão interfacial em microemulsões é muito baixa, o aumento na energia interfacial pode ser contrabalanceado ou compensado pelo decréscimo de energia livre associado com a entropia de dispersão.

O tamanho micelar dos agregados formados numa mistura surfatante / água / solvente orgânico são determinados pela minimização da energia livre de Gibbs do sistema. Isto é influenciado pelos seguintes parâmetros:

- (a) tipo do surfatante;
- (b) tipo do solvente orgânico;
- (c) quantidade de água, a qual é frequentemente representada pela razão w_0

$$w_0 = \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{SURFATANTE}]}$$

- (d) força iônica, que é importante em sistemas com anfifílicos iônicos.

Se o surfatante e o solvente orgânico são mantidos constantes, o tamanho do agregado é normalmente alterado pela quantidade de água numa microemulsão, isto é, altera-se o valor de w_0 [76].

O tamanho micelar é expresso em termos do raio do núcleo aquoso R_w , definido como o raio médio do núcleo aquoso dos agregados, incluindo somente a cabeça polar do surfatante (Figura 6).

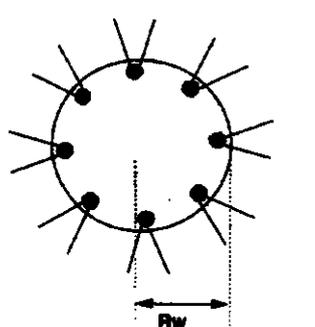
$$R_{w(mm)} = \left(\frac{3v_w}{\Sigma} \right) w_0$$


Figura 6: Raio do núcleo aquoso de uma micela reversa

onde v_w é o volume de uma molécula de água ($0,03 \text{ nm}^3$) e Σ é a área ocupada por uma molécula do surfatante na interface (área por grupo polar).

Tomando como exemplo o surfatante bis-[2-etilhexil(sulfossuccinato)] de sódio, conhecido também por aerosol OT (AOT), $\Sigma \approx 0,55 \text{ nm}^2$ e assumindo que este parâmetro é independente de w_0 encontra-se, para o termo $(3v_w / \Sigma)$, o valor 1,6-1,7. Para o AOT esta

relação foi confirmada experimentalmente por SANS (“Small angle neutron scattering”), NMR (“Nuclear magnetic resonance”), e técnicas envolvendo fluorescência, mostrando que ao aumentar a quantidade de AOT e mantendo água constante, o diâmetro do núcleo aquoso diminui, ao passo que aumentando a quantidade de água, mantendo constante o AOT, o núcleo aquoso aumenta [77].

O transporte de substâncias neutras através das membranas líquidas

Baseados no modelo de transporte artificial de espécies químicas através de membranas líquidas hidrofóbicas, têm sido realizados importantes trabalhos utilizando tubos em U (conhecidos também como celas de Schulmann). No entanto, a relevância do transporte de espécies neutras utilizando este modelo tem sido demonstrada em poucos trabalhos. Assim, o estudo do transporte simultâneo de vitaminas se torna ainda mais importante.

As vitaminas são micronutrientes, ou seja, suas necessidades nutricionais podem ser satisfeitas com quantidades muito pequenas, e sua principal função é atuar como coenzimas nas reações metabólicas [55].

A vitamina B₂ (riboflavina) é um componente de duas coenzimas intimamente relacionadas: flavina-mononucleotídeo (FMN) e flavina-adeninaducleotídeo (FAD), que funcionam como grupos prostéticos firmemente ligados à molécula de desidrogenases e são conhecidas como flavoproteínas ou flavina desidrogenases. Esta vitamina também possui um sistema complexo de anéis de isoaloxazina, que funcionam como transportadores temporários de um par de átomos de hidrogênio removidos da molécula de substrato durante as reações catalisadas por flavoproteínas [55] (Figura 7).

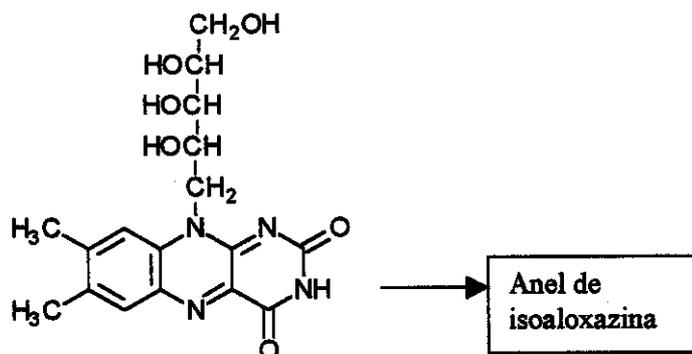


Figura 7: Vitamina B₂ (riboflavina)

A vitamina C (ácido ascórbico) parece agir como co-fator na hidroxilação enzimática de resíduos de prolina do colágeno de tecidos conjuntivos de vertebrados, formando resíduos de 4-hidroxiprolina. Tais resíduos são encontrados apenas no colágeno, e em nenhuma outra proteína animal.

Na Figura 8 é mostrada a estrutura química deste composto [78].

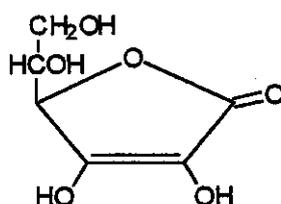
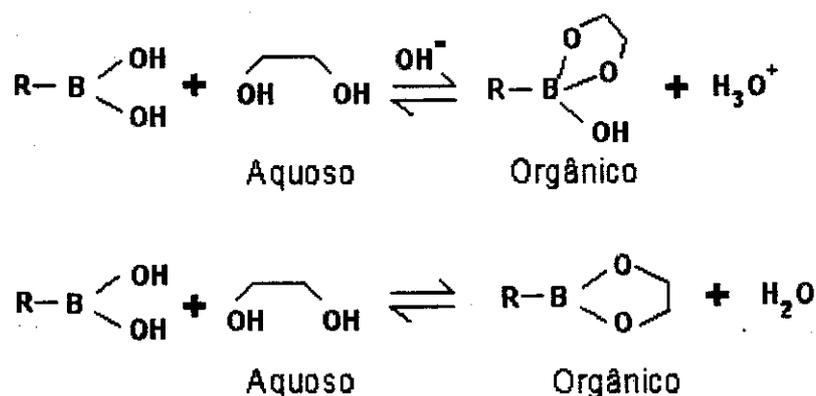


Figura 8: Ácido L-ascórbico

Nos sistemas naturais, o transporte de espécies químicas, iônicas ou neutras, pode ocorrer através de carregadores ligados às membranas celulares, como já citado. Nos sistemas artificiais, tem sido descrita a capacidade de ácidos organobóricos de facilitar o transporte de compostos que apresentam grupos dióis (sacarídeos, vitaminas, etc.) de soluções aquosas através de membranas líquidas orgânicas. Os ácidos borônicos podem carregar grupos dióis, sendo o acoplamento mais estável com os dióis na posição cis- α,β . Os possíveis mecanismos propostos para este transporte podem ser representados pelas equações [79]:



Contudo, não é fácil transportar substâncias muito hidrofílicas (caso da vitamina C) através de membranas líquidas hidrofóbicas, mesmo na presença de carregadores como ácidos borônicos, pois o transporte é muito lento em pH fisiológico (pH=7). Em meio alcalino, íons de amônio quaternário hidrofóbicos têm sido utilizados como co-carregadores catiônicos [20].

Os cátions orgânicos de amônio quaternário (o mais utilizado é o Cloreto de Trioctilmetilamônio – TOMAC) são adicionados para estabilizar a carga negativa da espécie química formada pelo mecanismo mostrado anteriormente, facilitando o transporte.

O Apêndice I traz 109 referências de trabalhos diversos envolvendo os processos de transporte através de membranas entre 1971 e 1993. Trabalhos mais recentes podem ser encontrados em *Recent Developments in Separation Science* [8].

A determinação simultânea de espécies bastante semelhantes entre si tem sido de crescente interesse em química em geral. Alguns métodos cinéticos diferenciais usam as diferentes taxas nas quais duas ou mais espécies reagem com um composto em comum para resolver (obter espectros puros e relações concentração vs tempo) misturas sem haver nenhuma separação prévia. Para tanto, diversas aproximações matemáticas já foram utilizadas para tratar dados de taxas de reação; embora relatadas na literatura, existem poucas aplicações destes métodos [80].

Os métodos de quantificação do transporte das espécies químicas

Os métodos quimiométricos têm sido muito aplicados em vários campos da química com grande sucesso, permitindo a observação e análise de dados que, de alguma forma, contêm informações mascaradas. Entretanto, deve-se ter cuidado para não se tornar redundante na interpretação de resultados. Algumas vezes as informações de um conjunto de dados podem ser facilmente obtidas com procedimentos e cálculos muito simples, sem a necessidade de se usarem os métodos quimiométricos. Seu uso nestes casos poderia causar mais demora e menos eficiência que os métodos mais diretos [81]. A quimiometria somente é realmente útil nos casos onde as informações não podem ser diretamente ou facilmente extraídas do conjunto de dados.

Um outro ponto a se destacar é que a quimiometria não é *mágica*. Ela tenta aumentar a eficiência de um certo processo químico, mas em alguns casos pode ser que estas ferramentas não possam ser aplicadas. Estes métodos devem ser abandonados se num sistema em estudo eles não forem capazes de produzir economia de tempo e trabalho manual. Antes de se iniciar um estudo quimiométrico é necessário considerar bem os objetivos e as possibilidades de tal estudo [81].

Os planejamentos fatoriais, a exemplo da calibração multivariada, têm sido responsáveis pelo aumento da eficiência e economia especialmente em processos industriais, setor no qual vêm sendo cada vez mais empregados.

A calibração multivariada

Neste ponto será dada bastante ênfase aos métodos de calibração multivariada, que foram uma ferramenta indispensável nos cálculos deste trabalho. Esta seção é longa, mas pretende-se com ela dar esclarecimentos suficientes para que se possa compreender satisfatoriamente o que significam os termos mais comuns e como funcionam os métodos mais frequentemente empregados. Alguns conjuntos de dados foram analisados com um método de ordem superior conhecido como TLD; a teoria envolvida não será discutida na Introdução por se tratar de uma metodologia mais complexa, mas os tópicos que se fizerem necessários serão apresentados oportunamente.

Os planejamentos fatoriais, por serem mais simples, serão explicados à medida que forem sendo utilizados.

Aspectos gerais

O uso de computadores para analisar dados químicos cresceu drasticamente nos últimos vinte anos, em parte devido aos recentes avanços em “hardware” e “software”. Por outro lado, a aquisição de dados principalmente na área de química analítica, atingiu um ponto bastante sofisticado com o interfaceamento de instrumentos aos computadores produzindo uma enorme quantidade de informação, muitas vezes complexa e variada.

Uma das características mais interessantes dos modernos instrumentos é o número das variáveis que podem ser medidas em um única amostra. Um exemplo notável é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro (com espectrofotômetros com arranjo de diodos). De posse de tal quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes cresceu muito rapidamente, dando origem à Quimiometria, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada.

A quimiometria não é uma disciplina da matemática, mas sim da química, isto é, os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente da matemática, estatística e computação. Como citado por Vandeginste [82], Kowalski diz que “as ferramentas quimiométricas são veículos que podem auxiliar os químicos a se moverem mais eficientemente na direção do maior conhecimento”. Isto nos leva a uma definição formal de quimiometria : “... uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos” [82].

Experimentos envolvendo a análise espectrofotométrica quantitativa de amostras com muitos compostos químicos cujos espectros sejam superpostos são bastante importantes em disciplinas de química analítica, sejam elas básicas ou mais avançadas. Em geral, as concentrações dos compostos de interesse numa amostra são determinadas através da resolução de um sistema de equações simultâneas obtido pela lei de Beer em tantos comprimentos de onda quantos forem os analitos. Curvas de calibração são construídas em cada comprimento de onda a partir de soluções padrão de cada analito a fim de estabelecer constantes de proporcionalidade individuais entre concentração e intensidade de absorção.

No caso de misturas binárias simples, muitas vezes obtemos bons resultados por este método. Entretanto, quando se passa para amostras reais, podem surgir problemas devido a interferências espectrais e desconhecimento da real identidade dos compostos de interesse. Nestas situações, a resolução simultânea das equações já não fornece resultados precisos e por isso foram buscados novos métodos para resolver este tipo de problema.

Para a análise de dados os métodos multivariados são os mais adequados, porque permitem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados. É possível, também, a identificação de problemas eventuais com linha base ou interferentes nas amostras usadas na calibração e nas novas amostras, de previsão [83].

Com grande frequência, o objetivo de uma análise química é determinar a concentração de um determinado analito em amostras, isto é, um composto químico de interesse presente nas mesmas. Os instrumentos de laboratório não produzem diretamente as

concentrações como resposta. Por exemplo um espectrofotômetro registra absorbâncias que naturalmente dependem das concentrações dos analitos.

Calibração

Calibração é o procedimento para encontrar um algoritmo matemático que produza propriedades de interesse a partir dos resultados registrados pelo instrumento. O resultado de uma calibração pode ser representado pelo diagrama abaixo (Figura 9):

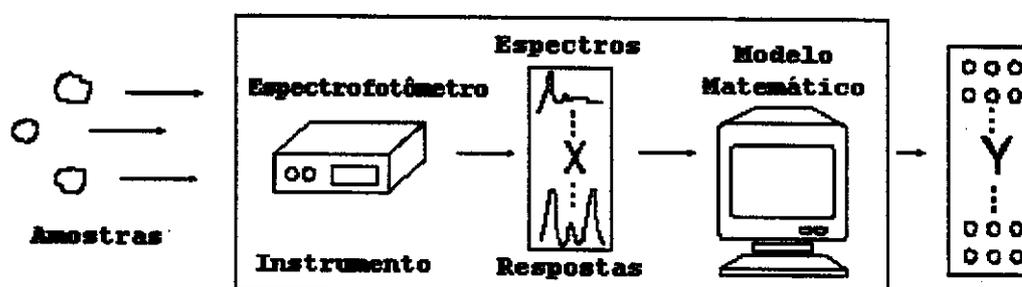


Figura 9: Esquemática de um processo de calibração

onde o instrumento associado ao algoritmo funciona como se fosse um novo “instrumento”. Absorbância e concentração são apenas exemplos das inúmeras possibilidades que este procedimento oferece para obtenção de informações de interesse a partir de sinais instrumentais. Um exemplo importante em outra área - mas que utiliza as mesmas idéias - é a tomografia, onde sinais de radiação são transformados em imagens.

Uma vez encontrado, este algoritmo poderá ser usado para prever a concentração do composto químico de interesse em amostras de composição desconhecida, usando a resposta instrumental das mesmas. Neste trabalho, os termos espectro e concentração serão genericamente utilizados para se referir às medidas instrumentais e a uma propriedade das amostras respectivamente.

Os espectros, um para cada amostra, são organizados numa matriz, X ($n \times m$), de variáveis independentes (p. ex. absorbâncias),

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

onde cada linha representa o espectro de uma amostra em um tempo e contém as absorvâncias registradas. Por exemplo, para a i -ésima amostra, $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{im}$ são as absorvâncias medidas, uma para cada comprimento de onda.

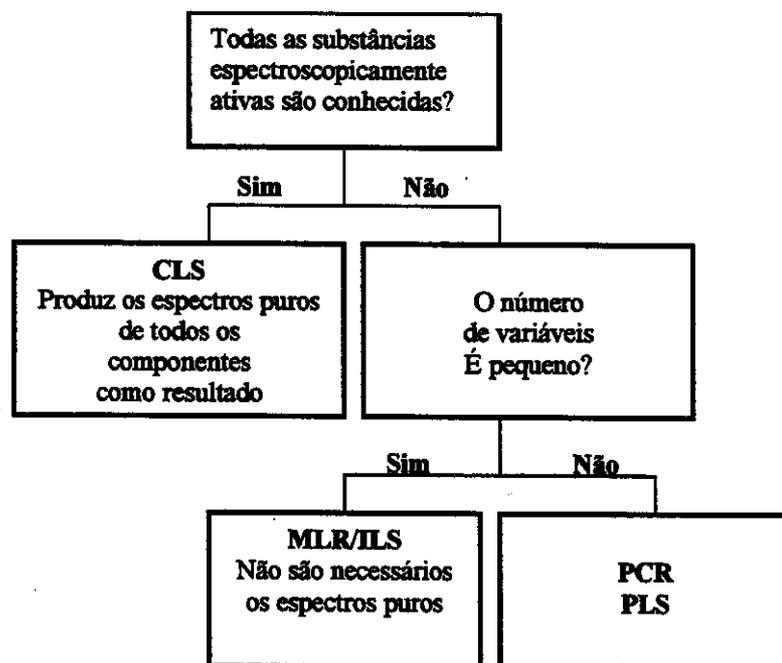
Cada coluna de \mathbf{X} corresponde a um comprimento de onda específico. Desta forma, $x_{1j}, x_{2j}, \dots, x_{nj}$ são as respostas na j -ésima frequência para as amostras 1, 2, ..., n . O outro conjunto de dados é constituído das variáveis dependentes (concentração de cada composto em cada tempo) e organizado na matriz \mathbf{Y} , caso haja mais de uma variável (mais de um analito de interesse), ou pelo vetor \mathbf{y} , no caso de uma única variável. O total de elementos deste vetor é igual a n , isto é, o número de amostras, e corresponde às concentrações de um determinado analito de interesse ou alguma outra propriedade que se espera prever no futuro.

O processo geral de calibração [83,84] consiste de duas etapas: **MODELAGEM**, que estabelece uma relação matemática entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} no conjunto de calibração e **VALIDAÇÃO**, que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do(s) analito(s) de interesse. Uma vez concluída a calibração, o sistema (instrumento físico + modelo matemático) representado esquematicamente na Figura 9 está apto a ser utilizado para previsão em outras amostras.

Os dados experimentais originais podem não ter uma distribuição adequada para a análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação dos mesmos. Nestes casos, um pré-processamento [83,85,86] dos dados originais pode ser de grande valia. Medidas em diferentes unidades e variáveis com diferentes variâncias são algumas das razões que levam a estes problemas. Os métodos de pré-processamento mais utilizados consistem basicamente em centrar na média ou autoescalar os dados. No primeiro caso, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai-se cada intensidade do respectivo valor médio. Autoescalar significa centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio padrão, sendo um para cada comprimento de onda. No caso de calibração de dados espectroscópicos, recomenda-se apenas centrar os dados na média para que não seja dada ao ruído a mesma importância de um sinal desejado.

Os comandos para ambos os preprocessamentos na linguagem do programa MATLAB (mostrados no Apêndice II) são muito simples e utilizam funções previamente definidas. A disponibilidade destas (e inúmeras outras) funções internas otimizadas é que caracteriza um ambiente computacional como sendo de alto nível, tornando conveniente o seu uso.

O fluxograma abaixo mostra um esquema geral dos métodos de calibração menos complexos, que aparecem em um grande número de trabalhos publicados.



Os métodos tradicionais de calibração CLS (método clássico de mínimos quadrados) e MLR (regressão linear múltipla) têm suas vantagens e desvantagens quando aplicados a problemas químicos. Ambos utilizam toda a informação contida na matriz de dados X para modelar a concentração, isto é, toda a informação espectral, incluindo informações irrelevantes (fazem pequena remoção de ruído). O CLS tem como principal problema a necessidade de se conhecer as concentrações de cada espécie espectroscopicamente ativa no conjunto de calibração, o que, em geral, é impossível nos problemas práticos. Já o método MLR sofre do problema de colinearidade: o número de amostras deve exceder o número de variáveis que, por sua vez devem fornecer predominantemente informação única [87].

Há, neste caso, a opção de selecionar um certo número de variáveis que seja menor que o número de amostras e que produzam informação “única”, o que pode ser demorado e tedioso. Mais interessante, então, é a utilização de algum método que, como o CLS, use o espectro inteiro para análise, e como o MLR, requeira somente a concentração do analito de interesse no conjunto de calibração.

Dois métodos que preenchem estes requisitos são PCR (Principal Component Regression) e PLS (Partial Least Squares) [85,87,88], daí a escolha dos mesmos em grande número de trabalhos. Estes dois métodos são consideravelmente mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades. Todas as variáveis relevantes são incluídas nos modelos via PCR ou PLS, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos. Os métodos PCR e PLS são robustos, isto é, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração [85,88]. Em especial o método PLS tem se tornado uma ferramenta extremamente útil e importante em muitos campos da química, como a físico-química, a química analítica, a química medicinal, ambiental e ainda no controle de inúmeros processos industriais. No Apêndice III são fornecidas referências de 80 trabalhos selecionados, envolvendo os diversos métodos de calibração multivariada, publicados entre 1993 e 1999.

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é o PCA (Principal Component Analysis) [88], que consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”. Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões.

Entendendo o PCA

Com o intuito de entender como funciona o método PCA, será usado um exemplo simples (fictício) com apenas duas variáveis. A Figura 10 mostra o gráfico bidimensional de um conjunto de 30 amostras ($n = 30$). A matriz de dados consiste, neste caso, de duas

colunas ($m = 2$) representando as medidas de intensidades registradas para dois comprimentos de onda λ_1 e λ_2 nas 30 amostras.

Cada linha da matriz de dados é representada por um ponto no gráfico. Em termos geométricos a função das componentes principais é descrever a variação ou espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos. Isto é feito definindo novos eixos (componentes principais) que se alinham com os dados. Note que na Figura 10 nem λ_1 nem λ_2 descrevem a maior variação nos dados. No entanto, a primeira componente principal PC1, tem uma direção tal que descreve o máximo espalhamento das amostras, mais que qualquer uma das duas variáveis originais. Além disto, a percentagem da variação total nos dados descrita por qualquer componente principal pode ser previamente calculada.

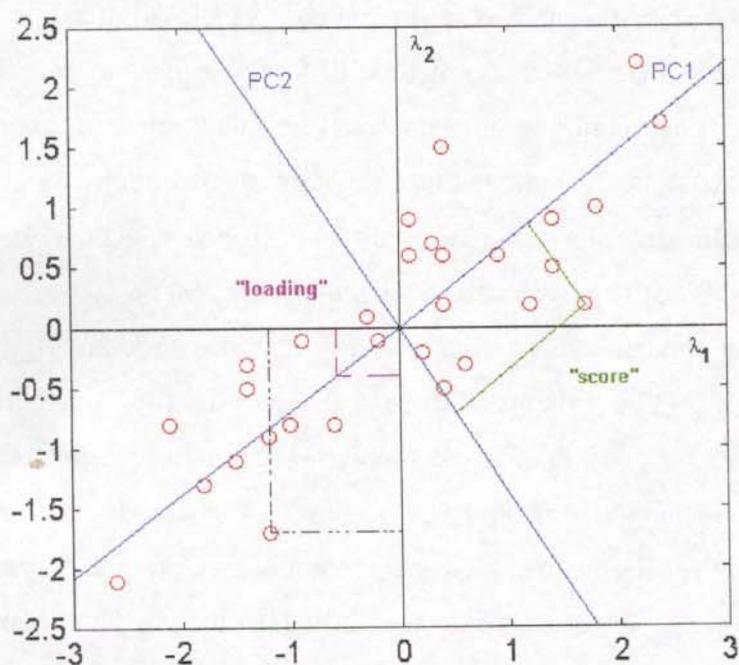


Figura 10: Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais (λ_1 e λ_2) mostrando duas componentes principais (PC₁ e PC₂)

Neste exemplo, PC1 descreve 92,5% da variação e PC2, ortogonal a PC1, é estimada para descrever a máxima variação restante, isto é, 7,5%. As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais mostradas pela linha verde na Figura 10,

são denominadas de “scores”. Cada componente principal é construída pela combinação linear das variáveis originais.

Os coeficientes da combinação linear (o peso, ou quanto cada variável antiga contribui na definição dos novos eixos) são denominados de “loadings” e representados pela linha magenta na Figura 10. Note que eles são, na realidade, os cossenos dos ângulos entre os eixos originais e o novo eixo (PC).

A Decomposição de Valores Singulares

Uma das maneiras mais comuns de se calcular “loadings” e “scores” é usando o algoritmo de decomposição de valor singular, SVD (singular value decomposition). Uma matriz de tamanho qualquer pode ser escrita como sendo o produto de outras três matrizes:

$$\mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^t$$

As colunas de \mathbf{U} e \mathbf{V} são ortonormais, ou seja, $v_i^t = \begin{cases} 0 & \text{para } i \neq j \\ 1 & \text{para } i = j \end{cases}$.

A matriz \mathbf{V} é a matriz dos “loadings”, onde a primeira coluna contém os “loadings” de PC1 e assim por diante. $\mathbf{U}\mathbf{S}$ corresponde à matriz \mathbf{T} dos “scores”. \mathbf{S} é uma matriz diagonal cujos elementos (valores singulares) contêm informação sobre a quantidade de variância que cada componente principal descreve. No Apêndice IV é dado um exemplo do cálculo dos valores singulares, chegando até a determinação dos valores de “scores” e “loadings” para um conjunto de dados em duas dimensões.

A matriz \mathbf{S} é importante na determinação da dimensionalidade intrínseca da matriz de dados \mathbf{X} (posto de \mathbf{X}). Os autovalores que forem pequenos serão excluídos, e as informações relevantes podem de alguma maneira ser separadas, eliminando-se assim os ruídos experimentais. A expressão abaixo mostra a relação entre o valor singular e a variância contida na j -ésima componente principal

$$\text{VAR \% PCj} = \frac{s_{jj}^2}{\sum_{j=1}^p s_{jj}^2} \times 100$$

onde o denominador fornece o valor da variância total e p é o número total de valores singulares do conjunto de dados (o menor valor dentre n e m). Os comandos para o cálculo de

variância percentual em cada componente principal são mostrados no Apêndice II (Rotinas Gerais na linguagem MATLAB).

Analisando um gráfico de “loadings”

Os “loadings” são usados para determinar quais variáveis são importantes para descrever a variação do conjunto de dados originais. Eles são o cosseno do ângulo formado entre os eixos dos componentes principais e as variáveis originais, como citado anteriormente, e descrevem a maneira como as medidas originais das variáveis estão relacionadas com cada novo eixo de componentes principais. Conforme o valor de loading se aproxima de 1 (ou -1), o ângulo entre a componente principal e a variável original se aproxima de 0° (ou 180°). Isto indica que a componente principal é paralela à variável, significando que esta variável contribui muito para a variação da componente principal [89]. Se o cosseno tiver valor próximo de zero, o ângulo citado será próximo de 90° ; neste caso, sendo perpendicular à componente principal, a variável não contribui em nada para descrever a variância daquela componente principal.

Ao interpretar os “loadings” é importante verificar a influência de uma componente principal no modelo final. Uma variável com “loading” próximo de 1 indica, conforme discutido, que esta variável contribui muito para a variância descrita pela componente principal; entretanto, caso esta componente principal não descreva uma grande quantidade de variação dos dados, então a variável não tem uma real importância para o modelo.

Os “loadings” podem também ser usados para auxiliar na determinação da dimensionalidade intrínseca do conjunto de dados. Isto é conseguido examinando um gráfico de “loadings” vs número da variável e determinando o ponto a partir do qual os “loadings” começam a ter uma distribuição aparentemente aleatória. No entanto, este tipo de análise só funciona bem se os dados são provenientes de instrumentos cujas respostas sejam características (por exemplo, espectroscopia, cromatografia). As componentes principais relevantes descrevem variações sistemáticas, e portanto os “loadings” também terão uma característica definida. Quando as respostas instrumentais não têm uma forma esperada bem definida esta análise não é apropriada [85,89].

Analisando um gráfico de “scores”

Os “scores” são as coordenadas das amostras no novo sistema de coordenadas onde os eixos são definidos pelos componentes principais. Estes novos eixos são usados para visualizar as variações relevantes no conjunto de dados, usando um número menor de dimensões. Os gráficos mostram como as amostras estão relacionadas umas às outras, dadas as medidas que tenham sido feitas. Amostras que estão próximas umas das outras num dado gráfico de “scores” são similares com relação às medidas originais, supondo que este gráfico apresente uma quantidade suficiente da variância total dos dados. Esta proximidade matemática se traduz em similaridade química desde que as análises feitas tenham sido significativas [85,89].

Num modelo matemático as incertezas nas concentrações calculadas podem ser estimadas porque as concentrações previstas são coeficientes de regressão de uma regressão linear (são os chamados erros estatísticos de previsão, para diferenciá-los de simples resíduos de concentrações). Estes erros representam as incertezas nas concentrações previstas causadas por desvios do modelo, ruídos experimentais e grau de superposição espectral.

A construção dos modelos

A etapa de construção do modelo de calibração começa com a seleção de um conjunto de amostras (no caso deste trabalho, os espectros na região UV – Vis) cuidadosamente escolhidas para que sejam representativas de toda a região a ser modelada. Estes serão os padrões (conjunto de calibração) utilizados na construção de um modelo apropriado para relacionar as respostas instrumentais com a concentração, na forma

$$y = X \beta$$

onde β é o vetor de regressão, que se deseja calcular. Isto se torna trivial por meio da decomposição de valores singulares, devido às propriedades das matrizes dos “loadings” e “scores”. Neste caso tem-se

$$y = USV^t \beta \quad \Rightarrow \quad \beta = VS^{-1}Uy$$

o que é obtido pelo MATLAB com os comandos colocados no Apêndice II.

A decisão sobre o número k de componentes principais a ser utilizado no modelo será discutida mais adiante.

Um aspecto característico do método PCR é a construção das componentes principais utilizando unicamente as respostas instrumentais (X) sem levar em consideração informações provenientes das concentrações (y). Isto pode se constituir numa fragilidade do método no caso em que o analito de interesse tem um sinal muito fraco e portanto não influencia fortemente nas primeiras componentes principais, fazendo com que um número maior delas seja necessário para a construção do modelo [87].

Outro método de regressão que utiliza a modelagem de componentes principais é o PLS, que contorna a dificuldade característica do PCR descrita acima usando a informação das concentrações na obtenção dos fatores, o que só é justificável se tais concentrações tiverem valores confiáveis. O primeiro fator, neste caso chamado de variável latente, descreve a direção de máxima variância que também se correlaciona com a concentração.

As variáveis latentes são, na realidade, combinações lineares das componentes principais calculadas pelo método PCR. Há vários algoritmos para calcular a decomposição usada em PLS. Os dois mais populares são NIPALS [85,90] e SVD. Kowalski e Seasholtz [90] apresentam um algoritmo simples para PLS que usa a decomposição de valores singulares. Como no caso anterior, o método PLS assume um modelo inverso. A matriz de dados X é decomposta em três matrizes, como no método PCR, embora por outro processo [91].

A preferência de um dentre estes dois métodos não pode ser aconselhada de uma forma genérica uma vez que ambos são, em geral, igualmente eficientes e as pequenas variações dependem de caso para caso.

Antes da aplicação do modelo construído, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva; sem esta etapa não há sentido em prosseguir. A validação consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras (de preferência não usadas na sua construção), para estabelecer se ele de fato irá refletir o comportamento do analito de interesse. Durante a etapa de validação dois fatores devem ser considerados:

- 1- O número de fatores k a ser utilizado no modelo (número de componentes principais ou número de variáveis latentes).
- 2- Detecção de “outliers” (amostras anômalas).

Para a determinação das componentes principais que serão empregadas na modelagem, o ideal seria a utilização de um conjunto-teste de dados. Entretanto, na maioria das vezes isto não é possível pois pode ser um processo demorado e caro. Uma alternativa prática, e que funciona bem, é o método de validação cruzada [92].

A validação cruzada é uma metodologia utilizada para a escolha do número de componentes principais baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Esta avaliação é feita pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas $(c_i \quad i = 1:n)$, e em resumo consiste do seguinte:

1-Remove-se uma ou mais amostras i do conjunto de calibração e constrói-se o modelo como anteriormente.

2-Usa-se o novo modelo para prever os dados removidos \hat{c}_i

3-Calcula-se o erro de previsão $(c_i - \hat{c}_i)$.

4-Calcula-se a soma dos quadrados dos erros de previsão: PRESS (“prediction error

sum of squares”) $\sum_i (c_i - \hat{c}_i)^2$ ou a raiz quadrada, RMSEP (“Root Mean Square Error of

Prediction”), que é na realidade um desvio padrão, $\sqrt{\frac{\sum_i (c_i - \hat{c}_i)^2}{n}}$, onde n é o número de amostras do conjunto de calibração.

O RMSEP determina a precisão e a acurácia da previsão de concentrações. Ele dá o espalhamento dos erros de concentrações num valor similar ao desvio-padrão, com as mesmas unidades dos valores de concentração. Os comandos em linguagem MATLAB são mostrados no Apêndice II.

O processo é repetido para modelos com uma, duas e assim por diante, componentes principais. Para cada sistema em estudo, o número mais adequado de fatores, k , será o correspondente ao menor valor de PRESS [83,90].

A detecção de “outliers” é tão importante quanto a determinação do número de componentes principais que serão empregadas no modelo. Ao verificar a qualidade do conjunto de calibração, deve-se assegurar de que as amostras formam um conjunto homogêneo, removendo-se aquelas amostras que são solitárias. Para a detecção de “outliers”, usam-se duas grandezas complementares: “leverage” e resíduos de Student.

A “leverage” é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de “leverage” pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração. Por outro lado, se as medidas experimentais de uma amostra são diferentes das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma alta influência no modelo, que pode ser negativa. Em geral, estas amostras solitárias estão visíveis no gráfico de “scores”. A “leverage” pode ser interpretada geometricamente como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados e é calculada segundo a equação (7)

$$h_{ii} = \frac{1}{n} + (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})' (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}) \quad (7)$$

onde \mathbf{x}_i é o espectro da i -ésima amostra, $\bar{\mathbf{x}}$ é o espectro médio e $\mathbf{X}'\mathbf{X}$ é a matriz de variância-covariância. Pela expressão acima, vê-se claramente que a “leverage” é uma função da distância da amostra à média e das correlações entre as variáveis.

Outra maneira bastante simples de se calcular “leverage” é medindo a distância de uma amostra ao centro do conjunto através do cálculo da distância Euclideana no espaço das componentes principais

$$\mathbf{H} = \mathbf{T}\mathbf{T}'$$

onde \mathbf{T} é a matriz dos “scores”. Os elementos da diagonal de \mathbf{H} , h_{ii} , estão diretamente relacionados com os valores da “leverage”.

Existe uma regra prática que nos permite distinguir amostras anômalas: as amostras com $h_{ii} > h_{crit}$, onde

$$h_{crit} = \frac{3k}{n},$$

são consideradas suspeitas e devem ser analisadas caso a caso. Aqui, n é o número de amostras do conjunto de calibração e k é o número de componentes principais ou variáveis latentes. Amostras com altas leverages (maior que três vezes a leverage média) devem ser mais cuidadosamente analisadas, mas no entanto elas não são necessariamente outliers ou

amostras ruins; simplesmente têm uma influência maior no modelo. Tais amostras precisam ser investigadas porque amostras com alta concentração têm alta leverage e não necessariamente têm influência adversa no modelo mas um outlier verdadeiro tem alta leverage e causa problemas na modelagem.

É interessante, ainda, analisar os resíduos das concentrações [93] que são calculados, por exemplo, por validação cruzada. Amostras mal modeladas têm resíduos altos. Para obter a influência de cada amostra em particular, temos o resíduo de Student, que, para a amostra i , é dado pela equação (8)

$$L_{resc_i} = \sqrt{\frac{(c_i - \hat{c}_i)^2}{(n-1)(1-h_i)}}$$

$$\text{Resíduo de Student}_i = \frac{(c_i - \hat{c}_i)}{L_{resc} \sqrt{1-h_i}} \quad (8)$$

onde L_{resc_i} é o resíduo da concentração da amostra i corrigido pela “leverage” (veja no Apêndice II os comandos MATLAB para o cálculo da leverage e dos resíduos de Student).

Supondo-se que os resíduos de Student são normalmente distribuídos pode-se aplicar um teste t como indicativo, para verificar se a amostra está ou não dentro da distribuição com um nível de confiança de 95%. Como os resíduos de Student são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de $\pm 2,5$ são considerados altos sob as condições usuais da estatística.

Existem quatro possibilidades quando se analisam gráficos de leverage vs resíduos de Student [85]:

- a) leverage baixa, |resíduos| < 2,5: estas amostras têm medidas que não estão fora do normal quando comparadas com as demais amostras do conjunto de calibração e suas concentrações estão sendo bem previstas pelo modelo;
- b) leverage baixa, resíduos altos: isto indica que as medidas para uma dada amostra são similares às do conjunto de calibração, porém está havendo má previsão das concentrações. Uma vez que a pequena leverage não indica que existem medidas anômalas, o problema geralmente se encontra nos valores de referência das concentrações (concentrações usadas no conjunto de calibração).

- c) leverage alta e $|\text{resíduos}| < 2,5$: indica que as medidas experimentais de uma amostra são diferentes das medidas das outras amostras do conjunto, mas ainda assim as concentrações estão sendo bem previstas. Este caso pode ou não indicar um problema com esta amostra em particular. Relembrando, uma amostra não é necessariamente um outlier só porque tem alta leverage. Ela pode estar no limite do espaço experimental e assim ter alta leverage. Por outro lado, a razão pela qual a amostra tem concentração bem prevista é que esta alta leverage forçou o modelo a ajustar bem esta amostra.
- d) leverage alta, resíduos altos: indica que existem problemas com as medidas experimentais e/ou com os valores das concentrações no conjunto de calibração. Devido à possibilidade de o modelo estar sendo forçado para ajustar estes pontos influentes, há forte recomendação de se reanalisar as medidas e as concentrações das espécies químicas usadas na calibração.

Etapas finais

Uma vez validado e otimizado o modelo está pronto, isto é, o número de fatores k está definido e as amostras anômalas foram detectadas e excluídas. Como resultado, obtém-se o vetor de regressão “beta” (β), que será então usado para a previsão da concentração, c_{prev} , de novas amostras (do conjunto de previsão):

$$c_{prev} = \mathbf{x}_{prev}^t \beta$$

onde \mathbf{x}_{prev} contém o espectro de uma nova amostra.

Entretanto, se o objetivo é prever concentrações de novas amostras, para que os resultados sejam confiáveis, é necessário que todas estas novas amostras estejam na mesma faixa de concentrações daquelas usadas na etapa de calibração.

Um ponto ainda a ser comentado é o vetor de regressão (β). É interessante notar que se a resposta instrumental do analito de interesse é ortogonal às outras respostas, isto é, se não há superposição de bandas no espectro, o vetor de regressão é igual à resposta do analito, a menos de um escalar. Por outro lado, se há alguma superposição o vetor de regressão perde as características individuais do analito, e neste caso uma interpretação qualitativa do vetor de regressão deve ser feita com muita cautela [87].

O método OLS (“ordinary least squares”)

Entre os métodos mais simples de calibração multivariada encontra-se o OLS. Em se tratando de ensaios envolvendo espectroscopia, este método é aplicável nos casos em que estão disponíveis os espectros puros dos compostos (ou seja, se conhece o espectro de cada composto que se quer quantificar).

O problema nos casos estudados neste trabalho sempre foi determinar a quantidade de um ou mais compostos a partir de espectros na região UV-Vis registrados em intervalos curtos e regulares de tempo.

Com o espectro puro (A) de um composto, obtido a partir de uma solução cuja concentração é bem definida (c) é possível determinar os valores de absorvidade molar (ϵ) em todos os comprimentos de onda, usando a lei de Beer ($A = \epsilon c$, se o caminho óptico é unitário). Para isto, basta dividir cada valor de absorvância pelo valor da concentração [94].

Tendo um conjunto de espectros registrados em vários tempos (uma nova matriz A) pode-se calcular a concentração do composto de interesse em cada tempo usando novamente a lei de Beer; trabalhando na forma matricial a expressão é obtida da seguinte maneira:

$$A = \epsilon c \quad (b = 1)$$

É preciso isolar c ; para isso ϵ deve ser eliminado do membro direito, através da multiplicação por ϵ^{-1} . Porém, como ϵ não é uma matriz quadrada, não é possível obter sua inversa. Assim, multiplica-se ϵ pela sua transposta antes de fazer a inversão.

$$\begin{aligned} \epsilon' A &= \epsilon' \epsilon c \\ (\epsilon' \epsilon)^{-1} \epsilon' A &= (\epsilon' \epsilon)^{-1} \epsilon' \epsilon c \\ c &= (\epsilon' \epsilon)^{-1} \epsilon' A \quad (9) \end{aligned}$$

onde c é uma matriz contendo as concentrações do composto em cada tempo, ϵ é a matriz com os valores dos coeficientes de absorvidade molar calculados na etapa anterior e A contém as absorvâncias medidas para cada comprimento de onda e cada tempo num experimento de transporte através de membranas, no caso deste trabalho. Na parte de discussão, com exemplos numéricos, mais detalhes serão dados para auxiliar na compreensão do método e como ele se aplica quando estão presentes mais de um composto além de algumas outras informações a respeito do TLD (“tri linear decomposition”), utilizado em alguns casos.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o estudo dos processos de transporte de espécies químicas através de membranas líquidas hidrofóbicas empregando vários solventes, através do método BLM. Pode-se dividir o estudo em três partes principais, A, B e C. Nas três etapas serão empregados métodos de calibração multivariada nas quantificações, comparando alguns deles entre si e destacando as vantagens em relação aos métodos univariados mais comuns.

Na parte A o que se procura é verificar o efeito do solvente, da temperatura, da concentração inicial e tamanho das espécies sobre as taxas de transporte das mesmas mediado por um carregador macrocíclico do tipo éter coroa, usando métodos de calibração multivariada para as quantificações das espécies na fase de recebimento do sistema. Outro objetivo desta parte é a investigação da relação entre o comportamento do transporte de espécies bioativas através de membranas líquidas hidrofóbicas e a atividade biológica destas espécies sobre microorganismos.

Na parte B o objetivo é o estudo dos processos de transporte de amino ácidos utilizando micelas reversas de surfatantes aniônicos e catiônicos com dois tipos de solvente, avaliando o efeito de interação das espécies nas taxas de transporte.

Na parte C será estudado o transporte de uma vitamina hidrossolúvel (ácido ascórbico), avaliando o efeito da temperatura, concentração de ácido fenilborônico (carregador), de um agente antioxidante, do solvente e da concentração inicial da vitamina sobre sua taxa de transporte.

Para complementar o trabalho é estudada a influência de se colocar uma segunda vitamina (riboflavina), menos solúvel em água que o ácido ascórbico, aplicando planejamentos fatoriais para verificar o efeito do solvente e da concentração do carregador na membrana sobre os valores calculados para as taxas de transporte.

PARTE EXPERIMENTAL

Todas as etapas que envolveram experimentos de acompanhamento cinético do transporte de espécies através de membranas foram realizadas com o mesmo sistema, que será descrito a seguir.

Numa cela de Schulmann (um tubo em U) são colocadas três fases distintas: uma solução de um composto carregador em solvente orgânico (membrana), uma solução aquosa contendo as espécies que se deseja transportar (fase fonte) e uma solução aquosa cuja composição inicial depende do tipo de transporte que se deseja estudar (fase de recebimento). A Figura 11 mostra esquematicamente a cela de Schulmann e as fases enumeradas. Todos os experimentos foram feitos sob agitação magnética, a cerca de 45 rpm, com controle de temperatura.

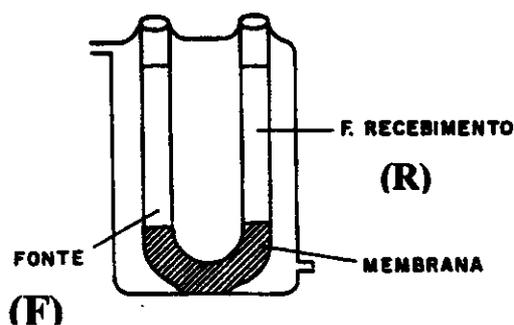


Figura 11: A cela de Schulmann e a posição das fases no sistema

PARTE A

Experimentos com o éter coroa 18C6 como carregador: o transporte de K^+

Nestes experimentos foram usados vários compostos e entre eles há dois pares de isômeros e três séries homólogas (os bactericidas), conforme mostrado na Tabela 2.

Preparação dos sais de potássio:

A massa adequada de cada fenol e cerca de 1,2 g de KOH foram dissolvidos em 1 L de água destilada, sob vigorosa agitação mecânica.

O KOH está sempre em excesso para garantir que todo o fenol tenha sido consumido e que o meio esteja em pH alcalino, a fim de manter o composto formado em sua forma ionizada. A reação que ocorre é exemplificada com o 2-nitrofenol:

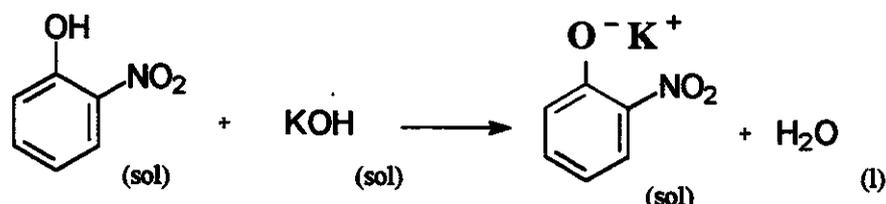


Tabela 2: Compostos empregados no transporte de K^+

Isômeros	
1	2-nitrofenolato (2NP) e 4-nitrofenolato (4NP)
2	2,4-dinitrofenolato (2,4DNP) e 2,5-dinitrofenolato(2,5DNP)
Séries homólogas	
1	3-alcoxifenolatos (n = 0 a 4; 3-metoxi- a 3-propoxifenolato)
2	4-alcoxifenolatos (n = 0 a 4; 4-metoxi- a 4-propoxifenolato)
3	parabens (n = 0 a 4; metil- a propilparaben)
Outros compostos	
2,4,6-trinitrofenolato (picrato, PIC)	
benzoato (Benz)	
salicilato (Sali)	

A1: Transporte individual e simultâneo

Com os compostos 2NP, 4NP, 2,4DNP e 2,5DNP foram feitos experimentos cinéticos de transporte individual e de misturas binárias (2NP + 4NP, 2NP + 2,4DNP e assim por diante). A concentração dos compostos na fase fonte foi sempre $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; como membrana foi usada uma solução $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de éter coroa 18C6 (1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano) em clorofórmio, cloreto de metileno ou tetracloreto de carbono; como fase de recebimento foi usada água destilada. Os ensaios com apenas um composto foram feitos a 15, 25 e 35°C e os com misturas binárias foram realizados a 25 e 35°C e apenas em CHCl_3 e CH_2Cl_2 .

Em cerca da metade dos experimentos feitos com a membrana líquida contendo o carregador, outro experimento era feito em paralelo, sem este composto. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata, e os resultados que serão apresentados são as

médias destas medidas. Na Tabela 3 estão descritas as condições de cada um destes experimentos.

A determinação da taxa de transporte de potássio nestes estudos é feita indiretamente, determinando a quantidade de cada ânion que é detectado na fase de recebimento, como será discutido mais tarde.

As medidas foram feitas usando um sistema de fluxo contínuo contendo a cela de Schulmann, um agitador magnético e uma bomba peristáltica, acoplado a um espectrofotômetro com arranjo de diodos HP 8453 conforme mostrado na Figura 12.

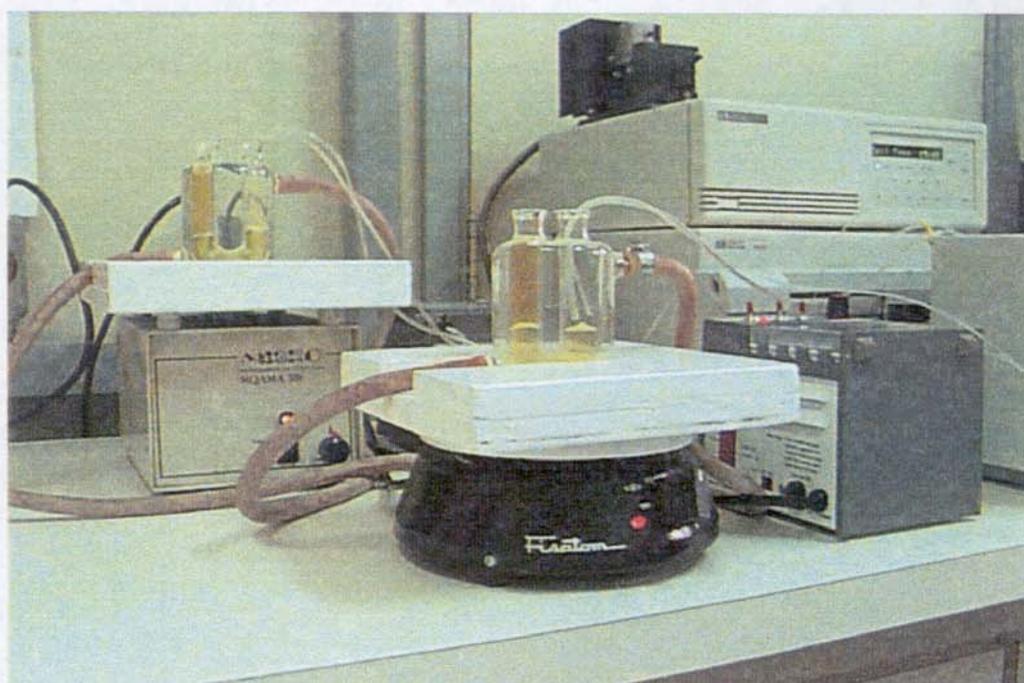


Figura 12: O sistema empregado nos experimentos de transporte

Os métodos utilizados para a quantificação do transporte foram o OLS e o PLS. Para a construção do modelo via PLS foram preparadas quinze misturas com os quatro compostos e mais quatro soluções com apenas um deles por vez. Os espectros UV – Vis na faixa entre 190 e 820 nm destas soluções contendo apenas um composto foram utilizados para a quantificação pelo método OLS.

Tabela 3 : Experimentos com os nitrofenolatos de potássio

# Exp.	Composto	Temp.(°C)	Solvente	# Exp.	Composto	Temp.(°C)	Solvente
1	A	15	CH ₂ Cl ₂	31	D	25	CH ₂ Cl ₂
2	A	15	CHCl ₃	32	D	25	CHCl ₃
3	A	15	CCl ₄	33	D	25	CCl ₄
4	A	25	CH ₂ Cl ₂	34	D	35	CH ₂ Cl ₂
5	A	25	CHCl ₃	35	D	35	CHCl ₃
6	A	25	CCl ₄	36	D	35	CCl ₄
7	A	35	CH ₂ Cl ₂	37	A+B	25	CH ₂ Cl ₂
8	A	35	CHCl ₃	38	A+B	25	CHCl ₃
9	A	35	CCl ₄	39	A+B	35	CH ₂ Cl ₂
10	B	15	CH ₂ Cl ₂	40	A+B	35	CHCl ₃
11	B	15	CHCl ₃	41	A+C	25	CH ₂ Cl ₂
12	B	15	CCl ₄	42	A+C	25	CHCl ₃
13	B	25	CH ₂ Cl ₂	43	A+C	35	CH ₂ Cl ₂
14	B	25	CHCl ₃	44	A+C	35	CHCl ₃
15	B	25	CCl ₄	45	A+D	25	CH ₂ Cl ₂
16	B	35	CH ₂ Cl ₂	46	A+D	25	CHCl ₃
17	B	35	CHCl ₃	47	A+D	35	CH ₂ Cl ₂
18	B	35	CCl ₄	48	A+D	35	CHCl ₃
19	C	15	CH ₂ Cl ₂	49	B+C	25	CH ₂ Cl ₂
20	C	15	CHCl ₃	50	B+C	25	CHCl ₃
21	C	15	CCl ₄	51	B+C	35	CH ₂ Cl ₂
22	C	25	CH ₂ Cl ₂	52	B+C	35	CHCl ₃
23	C	25	CHCl ₃	53	B+D	25	CH ₂ Cl ₂
24	C	25	CCl ₄	54	B+D	25	CHCl ₃
25	C	35	CH ₂ Cl ₂	55	B+D	35	CH ₂ Cl ₂
26	C	35	CHCl ₃	56	B+D	35	CHCl ₃
27	C	35	CCl ₄	57	C+D	25	CH ₂ Cl ₂
28	D	15	CH ₂ Cl ₂	58	C+D	25	CHCl ₃
29	D	15	CHCl ₃	59	C+D	35	CH ₂ Cl ₂
30	D	15	CCl ₄	60	C+D	35	CHCl ₃

A = 2- nitrofenolato **B** = 4- nitrofenolato **C** = 2,4- dinitrofenolato **D** = 2,5- dinitrofenolato

A2: Estudos comparativos do transporte

Foram utilizados 2NP, 4NP, 2,4DNP, 2,5DNP, Benz e Sali para um estudo comparativo do transporte de isômeros e de compostos que têm estrutura muito semelhante.

Para cada sal de potássio foi preparada uma solução $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; para os sais 2,4- e 2,5- dinitrofenolato foram feitas ainda soluções $1,0 \cdot 10^{-4}$, $5,0 \cdot 10^{-4}$ e $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, a fim de verificar a influência da concentração inicial dos compostos sobre as taxas de transporte. A fase de recebimento foi água destilada e a membrana consistiu de uma solução $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ do éter coroa 18C6 dissolvido em CHCl_3 ou CH_2Cl_2 , sendo mantida a temperatura a 25°C .

Outros três estudos foram feitos, com o objetivo de determinar a ocorrência de efeitos sinérgicos ou antagônicos nos processos de transporte e aplicar os vários métodos de calibração multivariada, comparando os resultados entre si. No primeiro estudo foi demonstrada a necessidade de tais métodos, ao fazer a comparação com os resultados obtidos pelos métodos tradicionais, univariados. A Tabela 4 descreve estes estudos.

Tabela 4: Estudos complementares do transporte de K^+

# Experimento	Sais de potássio	Método de quantificação
A3	Sali; 2,4DNP; 2,5DNP	Univariado; PLS
A4	PIC; 2,4-DNP; 2,5-DNP	PLS
A5	2NP; 2,4DNP; 2,5DNP	OLS; TLD

A3 : Estudos com Sali - 2,4DNP - 2,5DNP

Inicialmente foi verificado, para cada composto, qual era o comprimento de onda no qual havia maior absorção; tais comprimentos de onda (280, 428 e 437 nm para Sali, 2,4DNP e 2,5DNP, respectivamente) foram usados para fazer os estudos com calibração univariada convencional §.

Para comparar estes resultados com os que seriam obtidos com os modelos multivariados foram preparadas soluções 1, 2 e $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, que foram analisadas num espectrofotômetro com arranjo de diodos HP 8452A. Os valores de absorbância medidos

§ O método univariado de calibração pode ser encontrado, em detalhes, em qualquer livro de química analítica; por exemplo Skoog, West & Holler [95]

foram aplicados nas equações da calibração univariada e novos valores de concentração foram calculados. O erro percentual em cada caso foi calculado usando a equação (10)

$$E(\%) = \left[\frac{(C_{previsto} - C_{real})}{C_{real}} \right] * 100 \quad (10)$$

Métodos multivariados

Partindo de uma solução de concentração $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ foram preparadas 15 misturas contendo os três sais, com concentração total entre $8,0 \cdot 10^{-5}$ e $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Nove destas soluções foram usadas na etapa de calibração e as seis demais serviram na etapa de validação.

Utilizando o espectrofotômetro HP8452 A foram registrados os espectros na região entre 190 e 820 nm, com intervalos de 2 nm; com isso foram coletados 316 valores de absorvância (a cada 2 nm tem-se uma variável, ou seja, um valor de absorvância). Entretanto, neste estudo somente a faixa entre 270 e 550 nm (141 variáveis) foi importante.

Para os experimentos de cinética desta etapa as soluções colocadas na cela de Schulmann foram: como fase fonte uma solução $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em cada sal; como membrana uma solução $3,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de éter coroa 18C6 em clorofórmio (quantidade que garante que o 18C6 não será um agente limitante para o transporte) e como fase de recebimento, água destilada.

Os espectros da fase de recebimento foram obtidos em intervalos de cinco minutos. Usando o método PLS foi possível encontrar, simultaneamente e em cada tempo, a concentração de cada um dos compostos transportados; com estes valores novas curvas foram calculadas através de regressão linear e as taxas de transporte calculadas (coeficientes angulares das curvas).

A4: Estudos com PIC - 2,4DNP - 2,5DNP

Para este estudo foram preparadas quinze misturas com concentrações diferentes de cada um dos compostos (picrato, 2,4-dinitrofenolato e 2,5-dinitrofenolato), e seus espectros foram registrados num espectrofotômetro com arranjo de diodos HP 8452A, para a modelagem via PLS.

Os espectros foram registrados entre 190 e 820 nm, em intervalos de 2 nm; foram usadas, entretanto, 156 variáveis, que correspondem às absorvâncias entre 220 e 530 nm.

Como fase fonte foi usada uma mistura $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em cada composto. A membrana empregada foi uma solução $3,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de éter coroa 18C6 em clorofórmio, sendo a fase de recebimento apenas água destilada.

Os espectros da fase de recebimento foram registrados em intervalos regulares de cinco minutos; a partir destes espectros e do modelo recém construído, foi calculada a concentração de cada composto em cada tempo e determinada a taxa de transporte de cada um.

A5: Estudos com 2NP - 2,4DNP - 2,5DNP

Como fase fonte foram usadas as misturas indicadas na Tabela 5. O número reduzido de misturas é devido à natureza do método usado nas quantificações (TLD). Como membrana foi preparada uma solução de 18C6 em clorofórmio em concentração suficiente para garantir, como no caso anterior, que o carregador seja suficiente para não provocar alterações devido a efeito de agente limitante no transporte. Os espectros da fase de recebimento (água destilada) foram registrados para as três misturas ternárias em intervalos de um minuto, durante 91 minutos, na região entre 190 e 820 nm.

Tabela 5: Misturas usadas no estudo de transporte quantificado por TLD (fases fonte)

Mistura #	[2NP] $\times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$	[2, 4DNP] $\times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$	[2, 5DNP] $\times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$
01	3,0	1,5	4,0
02	1,5	1,5	5,0
03	3,0	1,0	3,0
04	-	1,5	5,0

Neste caso os conjuntos de dados em três dimensões (comprimento de onda vs tempo vs número de amostras) de tamanho $316 \times 81 \times 3$ são obtidos colocando sequencialmente os espectros registrados a cada tempo.

A6: Estudos com os bactericidas

Para verificar *qualitativamente* a passagem de um dado composto através da membrana líquida (ou seu acúmulo na membrana) foram obtidos espectros UV - Vis da membrana e da fase de recebimento na região de 190 a 820 nm, num espectrofotômetro HP 8452A, com experimentos semelhantes aos anteriores, a 25°C. Posteriormente foram realizados novos experimentos num espectrofotômetro HP 8453 e os resultados estão em boa concordância com os anteriores. As soluções preparadas como fase fonte tiveram sempre $\text{pH} > 10$ e concentração do soluto $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A concentração do éter coroa 18C6 na membrana de clorofórmio ou diclorometano foi de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Na Tabela 6 são mostradas as condições experimentais desta etapa.

Tabela 6: Experimentos com os bactericidas

Bactericida	Solvente
3-metoxi a 3-butoxifenolato	CHCl_3
4-metoxi a 4-butoxifenolato	CHCl_3
metil a butilparaben	CHCl_3
3-metoxi a 3-butoxifenolato	CH_2Cl_2
4-metoxi a 4-butoxifenolato	CH_2Cl_2
metil a butilparaben	CH_2Cl_2

Microcalorimetria

Nesta parte do trabalho foi necessário preparar inóculos de microorganismos. As suspensões de células de *S. cerevisiae* utilizadas nos experimentos foram padronizadas sendo que para tanto, foi preparada uma suspensão estoque de 5,0577 g de microorganismo em $28,5 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ de solução de Ringer (25 g de NaCl, 1 g de KCl e 0,75 g de CaCl_2 em 1 L de H_2O) e $71,5 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ de solução aquosa de Dimetilsulfóxido (DMSO) 11% v/v. Esta suspensão foi mantida sob agitação constante durante a retirada de alíquotas de $2 \cdot 10^{-3} \text{ L}$, que foram colocadas em ampolas de polipropileno. Tanto as ampolas quanto as soluções de Ringer e DMSO e todo material utilizado nesta preparação foram previamente esterilizados em autoclave à temperatura de aproximadamente 120°C e pressão manométrica de 1 atm por um período de 20 minutos. As ampolas foram encaixadas numa placa de isopor perfurada, que foi colocada sobre uma cuba de alumínio contendo nitrogênio líquido sendo mantida a uma altura

de 6 cm acima da superfície do nitrogênio. Após um período de 10 minutos, as ampolas foram liberadas para imersão em nitrogênio líquido e guardadas em cilindro criogênico [96].

Foram inoculados então $2 \cdot 10^{-3}$ L de suspensão de células nas soluções dos compostos bioativos solubilizados em tampão alcalino. As concentrações utilizadas são mostradas nas Figuras mostradas no Apêndice V.

A suspensão de células proveniente de um microreator de volume $50 \cdot 10^{-3}$ L foi bombeada para dentro da cela de fluxo de um microcalorímetro Thermometric modelo 2225 com uma bomba peristáltica, a uma velocidade de $30 \cdot 10^{-3}$ L h⁻¹. A suspensão de células permaneceu sob agitação magnética constante e sua temperatura foi mantida em $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ através do uso de uma jaqueta de vidro, na qual foi colocado o microreator, sendo que esta possui circulação de água proveniente de um banho termostático com temperatura ajustada em $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$.

PARTE B

Transporte de aminoácidos: experimentos usando micelas reversas

B1: Transporte com micelas de AOT quantificado por TLD

Usando as misturas binárias e ternárias de aminoácidos da Tabela 7 foram empregados os métodos OLS e TLD na tentativa de obter novamente espectros puros (espectros de uma substância como se ela estivesse sozinha na solução) dos compostos a partir de experimentos de transporte usando micelas reversas de AOT e poucas amostras (misturas), como obtido para os nitrofenóis.

Tabela 7: Concentrações dos aminoácidos em misturas binárias e ternárias (fases fonte)

Exp. #	[Phe] $\times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$	[Tyr] $\times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$	[Trp] $\times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$
01	2,0	2,0	---
02	4,0	2,0	---
03	2,0	4,0	---
04	4,0	4,0	---
05	4,0	2,0	2,0
06	2,0	---	4,0
07	4,0	---	4,0
08	4,0	2,0	4,0
09	2,0	4,0	4,0

*todas as soluções em pH 1,5

Nesta etapa a fase de recebimento foi mantida em pH 9 e a concentração de AOT foi sempre $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

O conjunto de dados experimentais em três dimensões obtido desta vez tem o tamanho $91 \times 60 \times n$, sendo 91 os comprimentos de onda (entre 217 e 308 nm, em intervalos unitários), 60 os tempos (30 minutos de cinética, com espectros registrados a cada 30 segundos) e n o número de misturas usadas nos cálculos via TLD.

B2: Outros experimentos com Aerosol-OT

Na determinação das taxas de transporte dos aminoácidos isolados ou em misturas binárias ou ternárias foi empregado o sistema de monitoramento contínuo da absorbância da fase de recebimento em tempo real, utilizando um sistema de fluxo contínuo idêntico ao usado nos casos anteriores (página 47). Os aminoácidos usados na fase fonte e algumas condições experimentais estão na Tabela 8.

Misturas de aminoácidos foram preparadas em várias concentrações de cada um e nos pH's 9, 10 e 11 para a modelagem via PLS. Para o método OLS foram usadas as soluções mais concentradas com apenas um composto na obtenção dos coeficientes de absorvidade molar.

Num dos ramos da cela de Schulmann foi colocada a fase fonte, sempre soluções aquosas $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dos aminoácidos em $\text{pH} = 1,5$. Como membrana foi empregada uma solução de bis- [2-etilhexil] sulfosuccinato de sódio (Aerosol OT, AOT) em clorofórmio e posteriormente em diclorometano, em duas concentrações ($5,0 \cdot 10^{-3}$ e $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$)

apropriadas para a formação de micelas reversas nestes solventes. A fase de recebimento foi constituída de solução aquosa com pH = 9, 10 ou 11, conforme o experimento (ver Tabela 8). A agitação magnética foi mantida durante todos os experimentos, a cerca de 45 rpm.

Durante 30 minutos, em intervalos de 30s, foram registradas as absorbâncias para todos os comprimentos de onda entre 190 e 1100 nm no HP8453, com intervalos de 1nm.

Antes de finalizar esta seção é necessário ressaltar que em todos os experimentos com Aerosol OT a membrana foi preparada de modo a conter, inicialmente, uma certa quantidade de água, sempre suficiente para obter $w_0 \approx 7$ (ou seja, $[H_2O] / [AOT] \approx 7$).

Após dissolver o AOT em clorofórmio ou diclorometano eram adicionados, dependendo se a solução era 5 ou $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $0,158 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ ou $0,315 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ de água destilada, aos poucos e fazendo o líquido escorrer pelas paredes do balão; estas quantidades se referem à preparação de $250 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ da membrana.

Cálculos para se obter $w_0 = 7$ (usando a solução $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}$ de AOT)

$$w_0 = \frac{m_{\text{água}} / \text{Mol}_{\text{água}}}{m_{\text{AOT}} / \text{Mol}_{\text{AOT}}} = \frac{0,315/18}{1,1112/444,48} = 7,0$$

Medidas da quantidade de água nas micelas reversas de AOT por Karl Fischer:

Usando um tubo em U não – termostatizado foram simulados os experimentos de transporte de aminoácidos através de membranas de clorofórmio contendo AOT na concentração de $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $w_0 \approx 7$.

Durante 40 minutos foi realizado o processo de simulação do transporte de triptofano, que foi colocado na fase fonte em concentração $1,15 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 1,5. Na fase de recebimento foi colocada uma solução com pH 11 e durante o experimento foi mantida agitação magnética exatamente como nos demais experimentos.

No topo do ramo contendo a fase fonte foi colocada uma rolha de borracha com um pequeno orifício por onde passava um tubo de teflon que alcançava a membrana líquida no fundo sistema. Em intervalos de 10 minutos foram retiradas alíquotas de $1 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ da

membrana, que foram levadas para análise por Karl Fischer, com o equipamento Karl Fischer Orion AF 8.

Tabela 8 : Experimentos com aminoácidos – estudo via OLS e PLS

# Exp	Espécie	[AOT] $\times 10^3$ mol L ⁻¹	pH rec	Solvente	# Exp	Espécie	[AOT] $\times 10^3$ mol L ⁻¹	pH rec	solvente
1	Phe (1)	5	9	CHCl ₃	37	1+2	5	9	CHCl ₃
2	Phe	5	10	CHCl ₃	38	1+2	5	10	CHCl ₃
3	Phe	5	11	CHCl ₃	39	1+2	5	11	CHCl ₃
4	Phe	10	9	CHCl ₃	40	1+2	10	9	CHCl ₃
5	Phe	10	10	CHCl ₃	41	1+2	10	10	CHCl ₃
6	Phe	10	11	CHCl ₃	42	1+2	10	11	CHCl ₃
7	Tyr (2)	5	9	CHCl ₃	43	1+3	5	9	CHCl ₃
8	Tyr	5	10	CHCl ₃	44	1+3	5	10	CHCl ₃
9	Tyr	5	11	CHCl ₃	45	1+3	5	11	CHCl ₃
10	Tyr	10	9	CHCl ₃	46	1+3	10	9	CHCl ₃
11	Tyr	10	10	CHCl ₃	47	1+3	10	10	CHCl ₃
12	Tyr	10	11	CHCl ₃	48	1+3	10	11	CHCl ₃
13	Trp (3)	5	9	CHCl ₃	49	2+3	5	9	CHCl ₃
14	Trp	5	10	CHCl ₃	50	2+3	5	10	CHCl ₃
15	Trp	5	11	CHCl ₃	51	2+3	5	11	CHCl ₃
16	Trp	10	9	CHCl ₃	52	2+3	10	9	CHCl ₃
17	Trp	10	10	CHCl ₃	53	2+3	10	10	CHCl ₃
18	Trp	10	11	CHCl ₃	54	2+3	10	11	CHCl ₃
19	Phe	5	9	CH ₂ Cl ₂	55	1+2	5	9	CH ₂ Cl ₂
20	Phe	5	10	CH ₂ Cl ₂	56	1+2	5	10	CH ₂ Cl ₂
21	Phe	5	11	CH ₂ Cl ₂	57	1+2	5	11	CH ₂ Cl ₂
22	Phe	10	9	CH ₂ Cl ₂	58	1+2	10	9	CH ₂ Cl ₂
23	Phe	10	10	CH ₂ Cl ₂	59	1+2	10	10	CH ₂ Cl ₂
24	Phe	10	11	CH ₂ Cl ₂	60	1+2	10	11	CH ₂ Cl ₂
25	Tyr	5	9	CH ₂ Cl ₂	61	1+3	5	9	CH ₂ Cl ₂
26	Tyr	5	10	CH ₂ Cl ₂	62	1+3	5	10	CH ₂ Cl ₂
27	Tyr	5	11	CH ₂ Cl ₂	63	1+3	5	11	CH ₂ Cl ₂
28	Tyr	10	9	CH ₂ Cl ₂	64	1+3	10	9	CH ₂ Cl ₂
29	Tyr	10	10	CH ₂ Cl ₂	65	1+3	10	10	CH ₂ Cl ₂
30	Tyr	10	11	CH ₂ Cl ₂	66	1+3	10	11	CH ₂ Cl ₂
31	Trp	5	9	CH ₂ Cl ₂	67	2+3	5	9	CH ₂ Cl ₂
32	Trp	5	10	CH ₂ Cl ₂	68	2+3	5	10	CH ₂ Cl ₂
33	Trp	5	11	CH ₂ Cl ₂	69	2+3	5	11	CH ₂ Cl ₂
34	Trp	10	9	CH ₂ Cl ₂	70	2+3	10	9	CH ₂ Cl ₂
35	Trp	10	10	CH ₂ Cl ₂	71	2+3	10	10	CH ₂ Cl ₂
36	Trp	10	11	CH ₂ Cl ₂	72	2+3	10	11	CH ₂ Cl ₂

B3: Experimentos com TOMAC

Alguns experimentos de transporte foram realizados empregando como carregador micelas reversas de um surfatante catiônico, o cloreto de trimetiloctilamônio (TOMA, TOMAC, Aliquat 336). Nestes casos a fase fonte foi constituída dos aminoácidos em solução $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 11 (apenas um aminoácido de cada vez). A fase de recebimento, também analisada por espectroscopia UV-Vis com o HP 8453, foi uma solução com concentração de cloreto entre 0,5 e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. As concentrações de TOMAC na membrana líquida de CHCl_3 estão indicadas na Tabela 9.

Tabela 9: Experimentos com micelas reversas de TOMAC

Aminoácido	[TOMAC] x $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
Phe	300
Phe	100
Phe	50
Phe	20
Trp	300
Trp	100
Trp	50
Trp	20
Tyr	300
Tyr	100

B4: Experimentos com DODAC

Na investigação do transporte por micelas reversas foi feita ainda outra série de experimentos, usando o cloreto de dimetildioctadecilamônio (DODAC, Herga). Este surfatante foi doado pela *Herga Industrias Químicas Ltda., RJ*, e foi submetido a secagem em estufa a cerca de 50°C por dois dias, a fim de eliminar o excesso de álcool presente. Após a secagem o material apresentou-se como uma massa compacta, clara, que foi facilmente pulverizada em almofariz. Com este composto foram realizados os experimentos indicados na Tabela 10.

A concentração de todos os aminoácidos nas fase fonte foi sempre $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e novamente a fase de recebimento foi uma solução com cloreto em concentração na faixa de 0,5 e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

Tabela 10: Experimentos com o DODAC

[DODAC] x 10 ⁻³ mol.L ⁻¹	Fase Fonte	PH da Fase Fonte
50	Trp	11,0
50	Phe	11,0
50	Trp	9,0
50	Phe	9,0
50	Tyr	9,0
30	Trp	9,0
30	Phe	9,0
15	Trp	9,0
15	Phe	9,0
50	Trp	8,0
50	Phe	8,0

PARTE C

Experimentos usando ácido fenilborônico como carregador: transporte de vitaminas

C 1: Transporte de vitamina C

Todos os experimentos com as vitaminas foram feitos usando o HP 8453 e o sistema de fluxo contínuo utilizados nos demais casos. A composição das fases foi alterada frequentemente, de acordo com o necessário para um estudo da influência de cinco fatores, seguindo um planejamento fatorial completo 2⁵ (32 experimentos). As variáveis em questão e os níveis alto e baixo de cada uma são dados na Tabela 11:

Tabela 11: Condições empregadas no planejamento fatorial 2⁵

VARIÁVEIS	NÍVEIS	
	+	-
[AFB]	2.10 ⁻³ mol.L ⁻¹	1.10 ⁻³ mol.L ⁻¹
Temperatura	25 °C	15 °C
[Vitamina C] fase fonte	10.10 ⁻³ mol.L ⁻¹	1.10 ⁻³ mol.L ⁻¹
Glutathiona*	presente	ausente
Solvente	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂

AFB = ácido fenil borônico ; * na fase de recebimento

As condições experimentais de cada um dos 32 ensaios são mostradas na Tabela 12.

Na fase fonte a solução sempre conteve glutaciona, a fim de evitar a oxidação prematura da vitamina C, ou seja, evitando sua transformação em ácido dehidroascórbico, que não absorve na região UV – Vis.

Apenas como esclarecimento, seja o ensaio nº 7, por exemplo. A seqüência de sinais na Tabela 12 indica que ele foi realizado com uma solução 1.10^{-3} L de AFB, a 25°C , com 10.10^{-3} mol.L⁻¹ de vitamina C na fase fonte, sem glutaciona na fase de recebimento e usando diclorometano na membrana.

A solução de glutaciona empregada na metade dos ensaios, bem como a concentração deste composto na fase fonte, foi de $1,0.10^{-2}$ mol.L⁻¹.

Usando o sistema de transporte descrito anteriormente foram realizados os experimentos de acompanhamento cinético da transferência da vitamina. As medidas foram feitas no HP 8453 durante 20 minutos, registrando espectros entre 190 e 1100 nm a cada 20 segundos, usando para efeito dos cálculos via OLS a faixa entre 210 e 560 nm.

C 2: Experimentos com misturas das vitaminas B₂ e C

Nestes experimentos a fase fonte foi uma solução $1,5.10^{-4}$ mol.L⁻¹ (esta é a concentração de cada vitamina, B₂ e C) contendo glutaciona em concentração $1,0.10^{-3}$ mol.L⁻¹. A membrana líquida foi constituída de soluções em clorofórmio e em diclorometano (um solvente de cada vez) contendo o ácido fenilborônico nas concentrações de 1 a 8.10^{-3} mol.L⁻¹ (1, 2, 3, ..., 8).

Os espectros UV – Vis da fase de recebimento, uma solução aquosa 40.10^{-3} mol.L⁻¹ de glutaciona reduzida) foram registrados a cada 20 segundos, durante 20 minutos, na região entre 240 e 390 nm, com intervalos de 1 nm.

A análise dos resultados foi feita inicialmente com todos os dados, por comparação. Em seguida foi feita a separação de grupos de resultados, a fim de usar vários planejamentos fatoriais 2² na tentativa de verificar efeitos não muito claros.

Tabela 12: Condições experimentais dos 32 ensaios do planejamento fatorial 2^5

Experimento	[AFB] (1)	Temp. (2)	[Vit. C] (3)	Glutat. (4)	Solvente (5)
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-
11	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-
17	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	+
19	-	+	-	-	+
20	+	+	-	-	+
21	-	-	+	-	+
22	+	-	+	-	+
23	-	+	+	-	+
24	+	+	+	-	+
25	-	-	-	+	+
26	+	-	-	+	+
27	-	+	-	+	+
28	+	+	-	+	+
29	-	-	+	+	+
30	+	-	+	+	+
31	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+

A Tabela 13 mostra os níveis correspondentes a cada fator nos planejamentos realizados.

Tabela 13: Planejamentos no estudo do transporte simultâneo de vitaminas

FATORES	NÍVEIS	PLANEJAMENTOS					
		1	2	3	4	5	6
A [AFB] $\times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹	-	1	2	3	4	1	2
	+	2	4	6	8	4	8
B Solvente	-	CH ₂ Cl ₂					
	+	CHCl ₃					

Calorimetria: quebra de ampolas

Para uma análise mais detalhada dos resultados de transporte foram feitas medidas calorimétricas da entalpia de dissolução das vitaminas B₂ e C em clorofórmio e em diclorometano, contendo ácido fenilborônico em concentração $4 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ ou na ausência deste. A técnica utilizada foi a de quebra de ampolas⁸⁸, empregando um Microcalorímetro Thermometric modelo 2225.

⁸⁸ Para uma descrição desta técnica ver Simoni, J. A.; Dissertação de Mestrado – IQ / Unicamp, 1978.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE A

Considerações sobre o transporte de K^+

O estudo do transporte de potássio através de membranas líquidas hidrofóbicas utilizando ânions orgânicos de mesmo tamanho (isômeros) foi proposto pelo fato de que na literatura [20,97] encontram-se diversos trabalhos que avaliam a taxa de transporte de espécies catiônicas, porém usando sais cujos ânions são de tamanhos muito diferentes um do outro. Os resultados destes trabalhos são discutidos, então, exatamente na diferença do tamanho dos ânions. Alguns dos resultados, apenas a título de ilustração, são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 : Taxas de transferência de vários sais [97], em soluções $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ numa membrana de clorofórmio, com $[\text{dibenzo-18C6}] = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

Sal	$J_c \text{ (mol/h)} \times 10^7$	Sal	$J_c \text{ (mol/h)} \times 10^7$	Sal	$J_c \text{ (mol/h)} \times 10^7$
LiCl	0	KBr	88	KH_2PO_4	290
LiBr	0	KNO_3	250	BaCl_2	< 1
LiI	0,33	KOH	2,10	BaBr_2	< 1
NaCl	0,31	KAc	1,40	BaI_2	280
NaBr	1,60	KBz	110	LiClO_4	0,34
NaI	15	$\text{KPi}^{(a)}$	510	NaClO_4	58
KF	0,85	K_3PO_4	< 1	KSCN	530
KCl	6,10	K_2HPO_4	< 1	$\text{Ca(NO}_3)_2$	0,25

(a) $[\text{Kpi}] = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

Com estes resultados pode-se observar que as considerações acerca de carga e tamanho do ânion são importantes. Como exemplo, observa-se que entre os haletos, quanto maior for o ânion maior será a taxa de transporte, o mesmo ocorrendo para os demais ânions; quanto menor a densidade de carga existente, mais rápida é a transferência. Isso sugere que a barreira de dessolvatação do ânion é um dos fatores mais importantes no controle da taxa de transporte através de membranas líquidas hidrofóbicas [98].

Ao usar ânions de mesmo tamanho é esperado que as taxas de transporte sejam muito próximas ou iguais, segundo a equação de Born (vide página 6). Nos experimentos realizados durante o período de mestrado foi verificado que havia uma alta diferença nas taxas de

transporte dos isômeros (vale lembrar que foi usada apenas calibração univariada, na época), o que nos levou a estudar novamente este sistema, utilizando um método de quantificação que aumentasse a relação sinal / ruído e fosse menos sensível a flutuações de linha base e eventuais interferentes de natureza desconhecida.

Quando se emprega um carregador neutro em processos de transporte (caso do éter coroa 18C6), o mecanismo envolvido é chamado de simporte e está esquematizado na Figura 13:

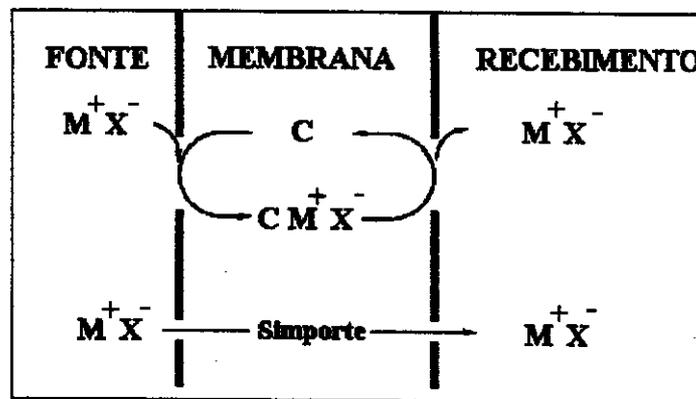


Figura 13: Esquema do mecanismo simporte [7]

Quatro etapas principais descrevem este processo [7]:

- 1) complexação do cátion pelo carregador, na interface da fase fonte / membrana líquida;
- 2) difusão do complexo através da membrana;
- 3) liberação do complexo na interface membrana / fase de recebimento ;
- 4) difusão do carregador de volta através da membrana.

Conforme se observa na Figura 13, o ânion é co-transportado através da membrana, processo necessário para manter a neutralidade elétrica do meio. Isto foi a base para a quantificação do potássio nos experimentos com nitrofenolatos e também para a quantificação das drogas que se encontravam na membrana ou na fase de recebimento nos experimentos com compostos biologicamente ativos.

No primeiro caso foi possível determinar diretamente a quantidade de potássio verificando qual era a quantidade do ânion presente na fase de recebimento, pois o complexo éter coroa / potássio tem estequiometria 1:1 (conforme prevê o modelo CPK) e o sal utilizado

é também 1:1 (cátion : ânion), de modo que para cada ânion que tenha atravessado a membrana, também um potássio terá atravessado [41]. No segundo caso, a quantificação desejada é a do ânion mesmo, que representará a quantidade da droga que tenha atravessado a membrana ou se acumulado nela.

Quando carregadores macrocíclicos neutros são usados para transportar cátions, os ânions devem acompanhá-los (formação de um par iônico), como citado acima, de modo que o efeito dos ânions é duplamente importante: quanto menos hidrofílico ele for, maior será a taxa de transporte esperada e este fator é independente do cátion. Assim, a hidrofilicidade do ânion afeta a taxa de transporte mas não a eficiência total do processo [7].

O segundo efeito se relaciona a interações entre cátions e ânions, interações estas que podem afetar a velocidade, a eficiência e a seletividade do transporte. O efeito destas interações reside no fato de que, neste sistema, o transporte é dirigido por um gradiente de concentração da espécie transportada, ou seja, o par iônico neutro formado.

A estrutura fina de um complexo clássico de éteres coroa é descrita tipicamente por um arranjo coplanar dos átomos de oxigênio [27]. Tais átomos mantêm contato direto com o cátion localizado no centro de uma cavidade a uma distância interatômica calculada matematicamente [99-101].

Cálculos realizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rogério Custódio (IQ - UNICAMP) mostram que, no caso de íons e cavidades de tamanhos muito próximos, o íon permanece um pouco deslocado do plano, apesar de estar a uma distância igual de cada átomo de oxigênio.

Quando o cátion está no interior do macrociclo as ligações são, *a priori*, mais fortes, uma vez que este se adapta exatamente no interior da cavidade. Isto também ocorre quando o carregador pode se deformar o suficiente para permitir a aproximação de seus heteroátomos do cátion a ser complexado [44].

Conforme Pedersen [102] observou, a complexação é fraca, de fato, quando o poliéter é muito pequeno para o cátion, porque existem poucos oxigênios carregados negativamente e também porque o cátion não pode estar no mesmo plano que os átomos doadores - onde a densidade de carga é maior - ou quando o anel é muito grande, pois desta forma o cátion não pode estar próximo o suficiente de todos os átomos doadores.

Pode-se confirmar isto através das estabilidades dos complexos. De acordo com alguns pesquisadores [103, 104] o dicitohexano 18 coroa 6 (DCH18C6) apresenta uma cavidade de aproximadamente 2,6 a 3,2 Å, formando complexos 1 : 1 com cátions que tenham aproximadamente o mesmo diâmetro. Ao contrário, com cátions maiores ou menores não são formados complexos 1 : 1, e sim complexos de estequiometrias diferentes.

A seletividade para o potássio sobre os demais cátions pode ser parcialmente entendida em termos da entalpia de solvatação. Se o cátion tem entalpia de solvatação pequena, o macrociclo pode competir mais efetivamente com o solvente na formação do complexo. A estabilização entálpica pode ser explicada pelo menor gasto de energia na etapa de dessolvatação do cátion no solvente que tiver a menor constante dielétrica. Pode-se também notar um efeito do solvente no sentido de que a eficiência total do processo de transporte diminui, mas a seletividade aumenta uma vez que a constante dielétrica do solvente diminui [104].

A1: Transporte individual e simultâneo

As taxas de transporte calculadas via OLS para a primeira série de experimentos com os nitrofenolatos são mostrados na Tabela 15.

As Figuras 14 a 19 deixam mais claras as comparações entre as taxas de transporte.

Nestas Figuras, o itálico no eixo x indica que se trata de um composto em misturas com o outro composto que aparece no mesmo gráfico. Por exemplo, na Figura 14 as duas primeiras colunas se referem ao 2NP, a 25°C, em CH₂Cl₂ e CHCl₃; as duas colunas seguintes são dos experimentos a 35°C. A quinta e sexta colunas são referentes ao transporte de 2NP quando em mistura com o 4NP, a 25°C e assim por diante.

Tabela 15: Taxas de transporte de cada composto para os experimentos da Tabela 3 (via OLS)

Taxas de transporte $\times 10^5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ min}^{-1}$									
# Exp	2NP	4NP	2,4DNP	2,5DNP	# Exp	2NP	4NP	2,4DNP	2,5DNP
1	0,0150				31				0,3314
2	0,1033				32				0,5742
3	0,0031				33				0,0022
4	0,0824				34				0,6500
5	0,0983				35				0,8274
6	0,0023				36				0,0030
7	0,0471				37	0,2502	0,2027		
8	0,0998				38	0,1783	0,1809		
9	0,0048				39	0,2899	0,2267		
10		0,0162			40	0,2982	0,2518		
11		0,0994			41	0,3083		0,3130	
12		0,0038			42	0,5841		0,4595	
13		0,0800			43	0,4358		0,3554	
14		0,0960			44	0,7574		0,5406	
15		0,0003			45	0,5574			0,5338
16		0,1050			46	0,6660			0,6200
17		0,1330			47	0,6219			0,5892
18		0,0028			48	0,7224			0,6829
19			0,0890		49		0,2741	0,4098	
20			0,3371		50		0,2989	0,4874	
21			0,0013		51		0,3059	0,4267	
22			0,3559		52		0,3275	0,5074	
23			0,4614		53		0,3391		0,6226
24			0,0082		54		0,3454		0,6585
25			0,4246		55		0,3868		0,5354
26			0,5319		56		0,4112		0,7066
27			0,0017		57			0,4811	0,6534
28				0,1251	58			0,5060	0,6803
29				0,2248	59			0,4907	0,6988
30				0,0033	60			0,5266	0,7241

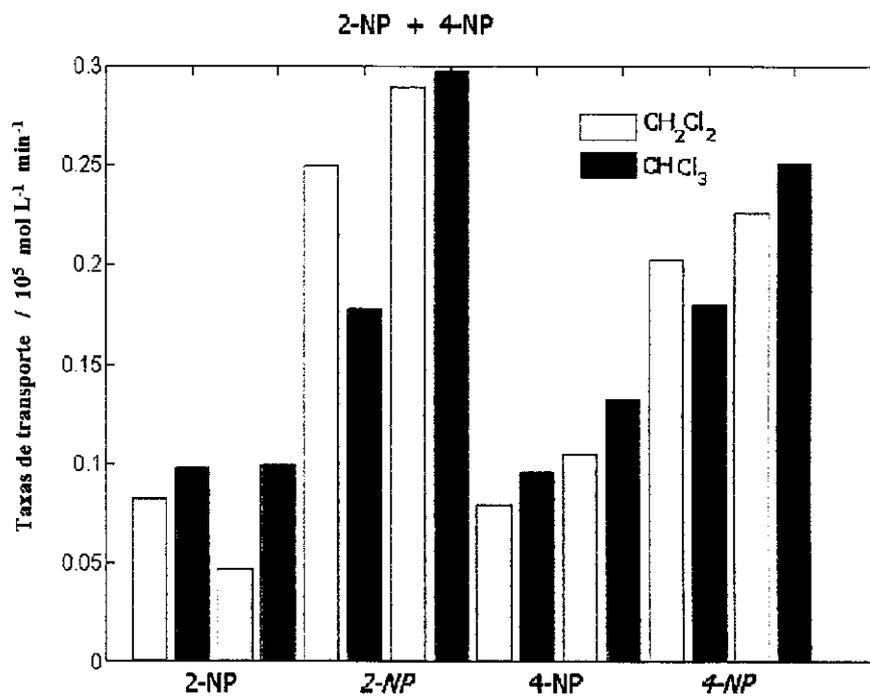


Figura 14: Comparação do transporte de K⁺ usando 2NP e 4NP

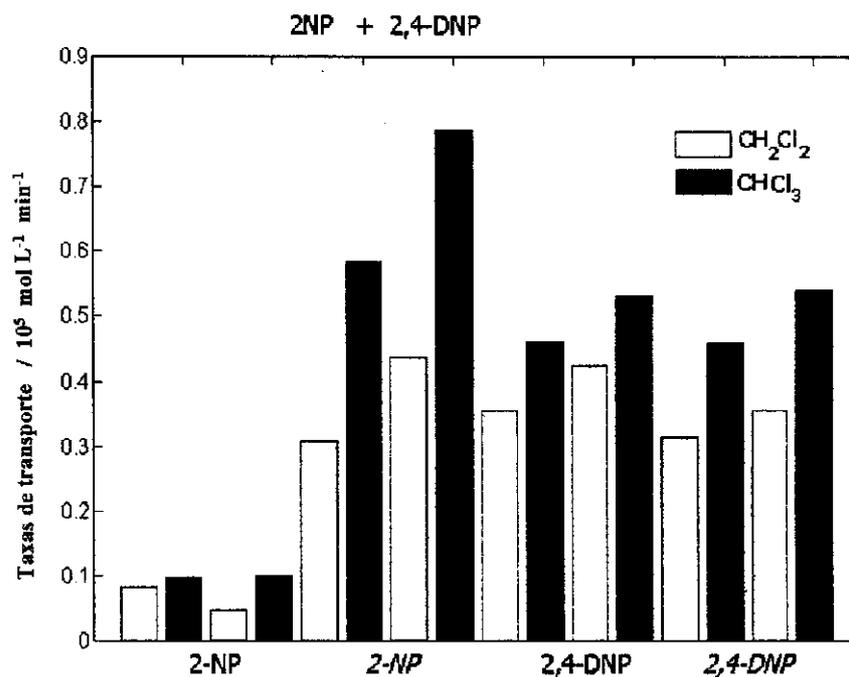


Figura 15: Comparação do transporte de K⁺ usando 2NP e 2,4DNP

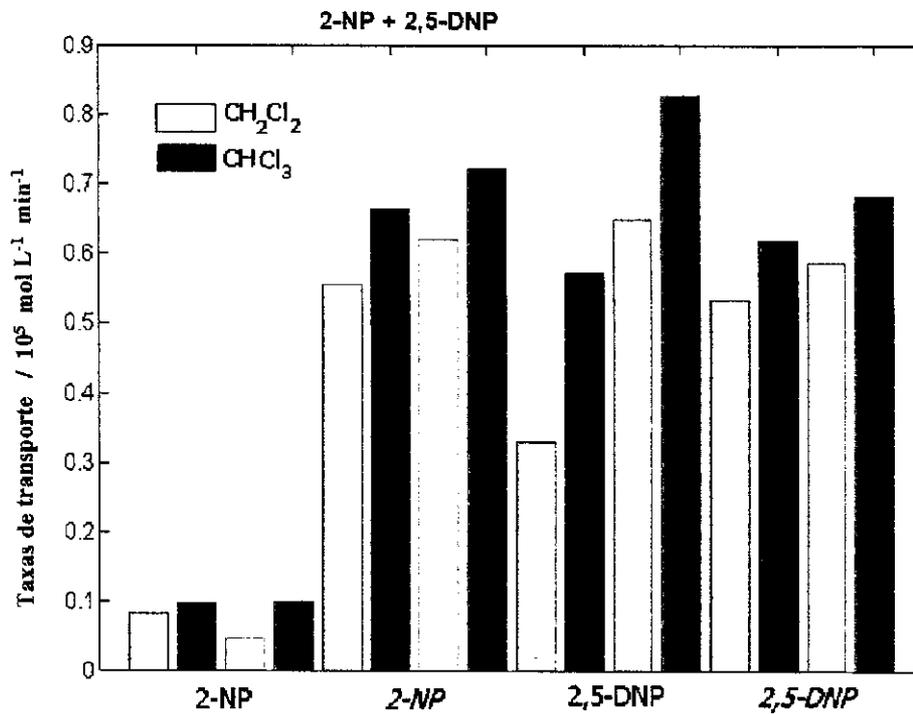


Figura 16: Comparação do transporte de K^+ usando 2NP e 2,5DNP

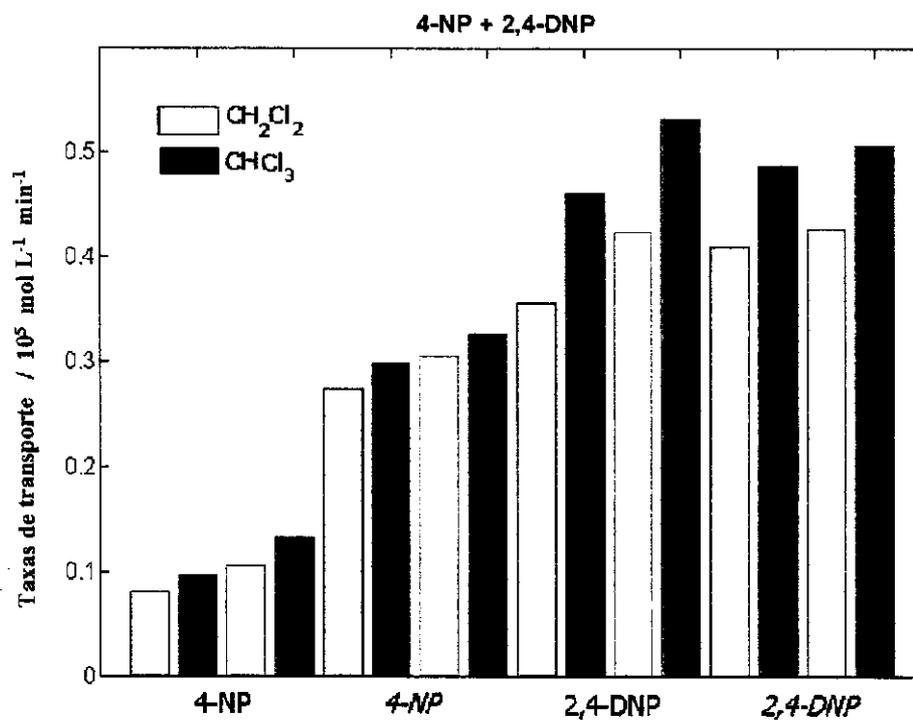
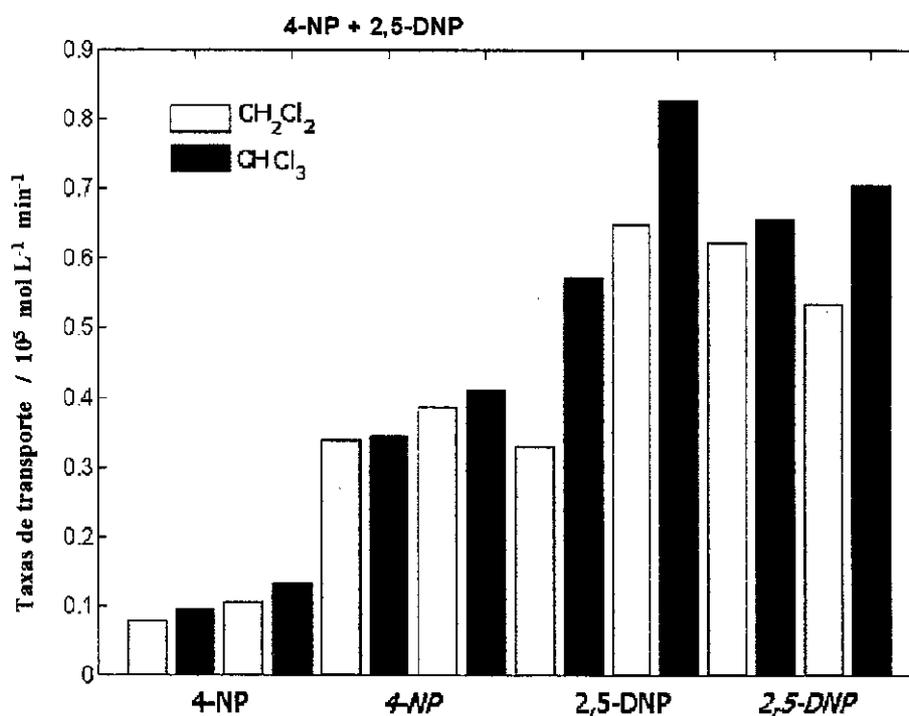
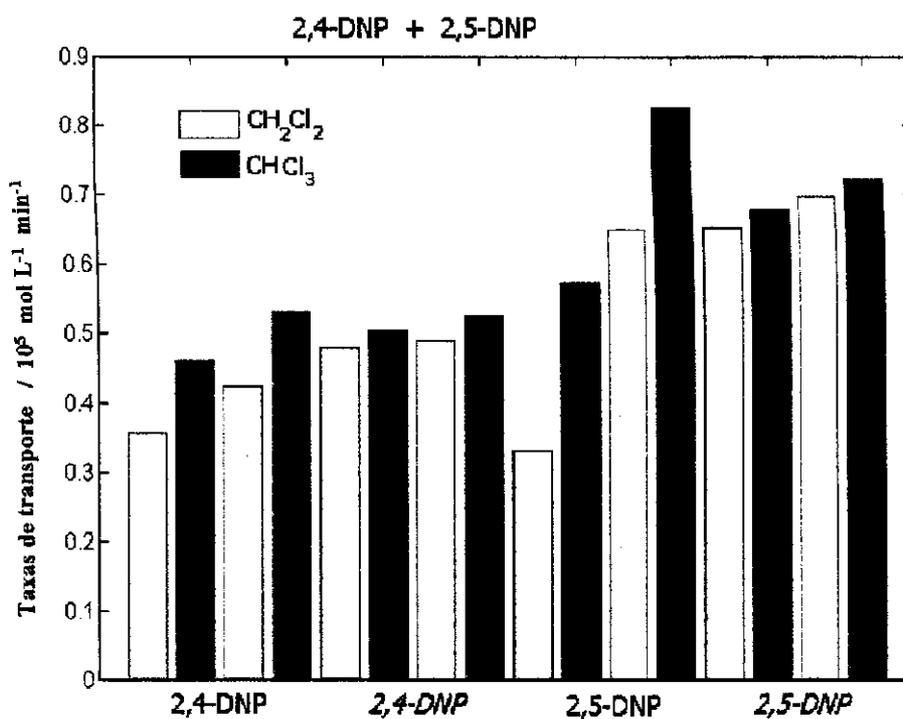


Figura 17: Comparação do transporte de K^+ usando 4NP e 2,4DNP

Figura 18: Comparação do transporte de K^+ usando 4NP e 2,5DNPFigura 19: Comparação do transporte de K^+ usando 2,4DNP e 2,5DNP

Um exemplo do cálculo via OLS é dado no Apêndice II. A partir destes resultados vemos que a equação de Born é satisfatoriamente seguida no que diz respeito a efeito de temperatura e tamanho da espécie a ser carregada. Com efeito, se a temperatura aumenta temos uma diminuição do valor da energia potencial w , fazendo com que o transporte seja mais rápido.

A Tabela 16 contém os raios iônicos calculados pelo Prof. Dr. Rogério Custódio (IQ/Unicamp) através do programa desenvolvido por Takahata e Gaudio [105].

Tabela 16 : Raio iônico dos ânions utilizados

Composto	Raio iônico (Å)
2-nitrofenolato	2,93
4-nitrofenolato	2,93
2, 4-dinitrofenolato	3,10
2, 5-dinitrofenolato	3,10
2, 4, 6-trinitrofenolato	3,24

O 2-nitrofenolato (2NP) e o 4-nitrofenolato (4NP) têm tamanhos idênticos, o mesmo acontecendo para o par 2,4- e 2,5-dinitrofenolato (2,4DNP e 2,5DNP). Desta forma as taxas de transferência são semelhantes para cada dupla de isômeros, sendo que para o primeiro par o valor é mais baixo que para os fenolatos dissubstituídos, como previsto pela equação de Born (o valor da energia potencial a ser vencida é mais alto se o ânion é menor) se são mantidas constantes a temperatura e a membrana inalterada.

A passagem dos ânions pequenos para a membrana é mais difícil, já que a esfera de hidratação neste caso é forte em água porque eles têm maior densidade de carga. Por outro lado, a sua liberação na fase aquosa de recebimento é mais rápida. O contrário acontece com os ânions grandes. Sua esfera de hidratação é fraca em meio aquoso mas é forte na membrana, de modo que sua extração é mais rápida; na liberação na segunda fase aquosa, entretanto, há maior dificuldade. Assim pode-se afirmar que é indispensável que a energia de solvatação em água e sua energia de complexação com o carregador no solvente orgânico devem ter um certo equilíbrio para que ocorra o transporte.

Os dados de variação de entalpia de solução (em água) e de complexação (com 18C6 em clorofórmio) dos compostos 2NP, 4NP e 2,4DNP, mostrados na Tabela 17, foram obtidos calorimetricamente através da técnica de quebra de ampolas.

Tabela 17: Dados termodinâmicos obtidos para três sais de potássio

Composto	Solubilidade (mol.L ⁻¹) ^{§§§}	$\Delta_{\text{sol}}H^{\ominus}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{sol}}G^{\ominus}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{sol}}S^{\ominus}$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{complex}}H^{\ominus}$ (kJ mol ⁻¹)
2NP	1,39.10 ⁻⁴	19,70 ± 0,54	-22,00	140,00	-7,55 ± 0,24
4NP	4,57.10 ⁻⁵	23,99 ± 0,75	-24,70	154,00	-7,20 ± 0,31
2,4DNP	2,65.10 ⁻⁵	31,63 ± 0,51	-26,10	194,00	-11,63 ± 0,26

Os dados de energia livre de solução foram obtidos a partir dos valores de solubilidade dos sais em água, a 25°C, através da equação $\Delta G^{\ominus} = -R T \ln [\text{solubilidade}]$.

O processo de dissolução destes sais em água envolve absorção de energia sendo que o 2,4DNP apresenta o valor mais alto (positivo) de entalpia de solução, por ser menos solvatado (a solvatação é um processo exotérmico).

Os valores de entalpia de complexação e os de entalpia de solução indicam que o transporte de potássio usando o ânion 2,4DNP deve ser mais efetivo em comparação aos obtidos com os outros dois ânions (2NP e 4NP). Os valores de entropia de solução reforçam a maior dessolvatação do ânion 2,4DNP em meio orgânico, com consequente aumento da entropia do sistema.

Não houve boa concordância com o previsto pela equação de Born em se tratando de constantes dielétricas dos solventes e da fase aquosa. Se há uma menor diferença entre a constante dielétrica da água ($\epsilon \approx 79$) [41] e a do solvente, então a energia potencial a ser vencida para a entrada da espécie na membrana é menor, facilitando o transporte. Esta situação ocorre para o solvente que apresenta a maior constante dielétrica, no caso o diclorometano ($\epsilon \approx 8,9$) [41]; em seguida o clorofórmio ($\epsilon \approx 4,8$) [41] e finalmente o tetracloreto de carbono ($\epsilon \approx 2,4$) [41]. Como pôde ser observado, na grande maioria dos casos as taxas com o clorofórmio foram maiores que as com diclorometano. Para o tetracloreto de carbono o comportamento é o esperado; como se observa na Tabela 15, em todos os casos

^{§§§} Para a determinação das solubilidades dos derivados fenólicos, já na forma de sal de potássio, cerca de 1g do composto foi colocado num balão volumétrico de 100.10³ L com água destilada. O sistema foi mantido sob agitação a 25°C por duas horas e deixado em repouso por uma noite. Em seguida foram registrados espectros UV - Vis da fase líquida, que foram usados para quantificar o quanto foi solubilizado e o quanto permaneceu insolúvel, através de curvas de calibração construídas previamente com o método PLS.

onde o solvente é CCl_4 as taxas de transporte são muito mais baixas que nos outros casos. Houve, portanto, uma inversão de comportamento esperado para CH_2Cl_2 e CHCl_3 .

Na Tabela 18 estão os resultados dos mesmos experimentos, porém calculados via PLS. Como se nota, não há grandes diferenças de comportamento, de modo que somente a Tabela será apresentada aqui, sem os respectivos gráficos.

Tabela 18: Taxas de transporte de cada composto para os experimentos da Tabela 5 (via PLS)

Taxas de transporte $\times 10^5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ min}^{-1}$									
# Exp	2NP	4NP	2,4DNP	2,5DNP	# Exp	2NP	4NP	2,4DNP	2,5DNP
1	0,0176				31				0,3300
2	0,1082				32				0,5762
3	0,0027				33				0,0032
4	0,0810				34				0,6517
5	0,0919				35				0,8238
6	0,0028				36				0,0026
7	0,0484				37	0,2489	0,2262		
8	0,1003				38	0,1768	0,1818		
9	0,0057				39	0,2905	0,2317		
10		0,0142			40	0,2990	0,2658		
11		0,0914			41	0,3045		0,3121	
12		0,0028			42	0,5834		0,4785	
13		0,0800			43	0,4362		0,3834	
14		0,0933			44	0,7581		0,5826	
15		0,0001			45	0,5563			0,5428
16		0,9980			46	0,6674			0,6240
17		0,1312			47	0,6232			0,5807
18		0,0018			48	0,7216			0,6913
19			0,0690		49		0,2741	0,3898	
20			0,3340		50		0,2989	0,4624	
21			0,0009		51		0,3059	0,4287	
22			0,3502		52		0,3275	0,5080	
23			0,4644		53		0,3391		0,6217
24			0,0032		54		0,3454		0,6542
25			0,4251		55		0,3868		0,5274
26			0,5299		56		0,4112		0,7071
27			0,0007		57			0,4811	0,6438
28				0,1244	58			0,5060	0,6027
29				0,2252	59			0,4907	0,6788
30				0,0023	60			0,5266	0,7216

Neste ponto é importante ressaltar a eficiência dos métodos multivariados para este tipo de pesquisa. Para a modelagem foram usadas várias misturas dos quatro compostos, ao passo que na determinação das concentrações finais os resultados eram referentes a apenas um

ou dois compostos e mesmo assim houve boa concordância com os resultados calculados por outro método. Isso prova que é possível fazer uma determinação via PLS mesmo na presença de interferentes (que seriam os compostos que não estão presentes num determinado caso).

O fato de as taxas observadas quando se usa CCl_4 serem sempre muito pequenas foi o que levou à não realização dos experimentos com misturas binárias também com este solvente, já que os erros nas quantificações se mostraram muito significativos (em geral, maiores que 15%).

Os resultados apresentados nas Figuras 14 a 19 mostram que há um acréscimo na taxa de transporte de cada composto quando se trabalha com misturas binárias na fase fonte .

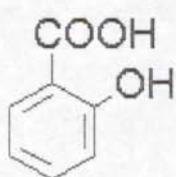
No caso dos pares 2NP e 4NP e 2,4DNP e 2,5DNP observa-se que o acréscimo é equivalente para cada um dos isômeros. Quando os dois componentes da fase fonte não são isômeros observa-se que o composto com menor tamanho sofre um aumento mais pronunciado em sua taxa de transporte (2NP e 2,4DNP, 2NP e 2,5DNP, 4NP e 2,4DNP e 4NP e 2,5DNP).

Este aumento das taxas é devido à maior diferença de força iônica entre as fases fonte e de recebimento nos casos onde *dois* compostos estão sendo transportados. O maior gradiente de força iônica naturalmente força a passagem mais rápida de espécies para o outro lado para atingir o equilíbrio em menor tempo. Os compostos maiores não são tão afetados por este efeito, apesar de serem mais facilmente extraídos da fase fonte para a membrana, porque têm menor coeficiente de difusão [7,25,41]; o transporte deles é aumentado, mas de maneira menos sensível que os compostos menores, o que foi confirmado pelos dados termodinâmicos.

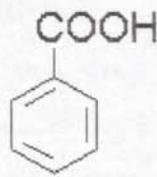
A2: Estudos comparativos do transporte

Na comparação das taxas de transporte para o salicilato e benzoato observa-se, na Figura 20, que o primeiro apresenta taxas muito mais elevadas que o segundo.

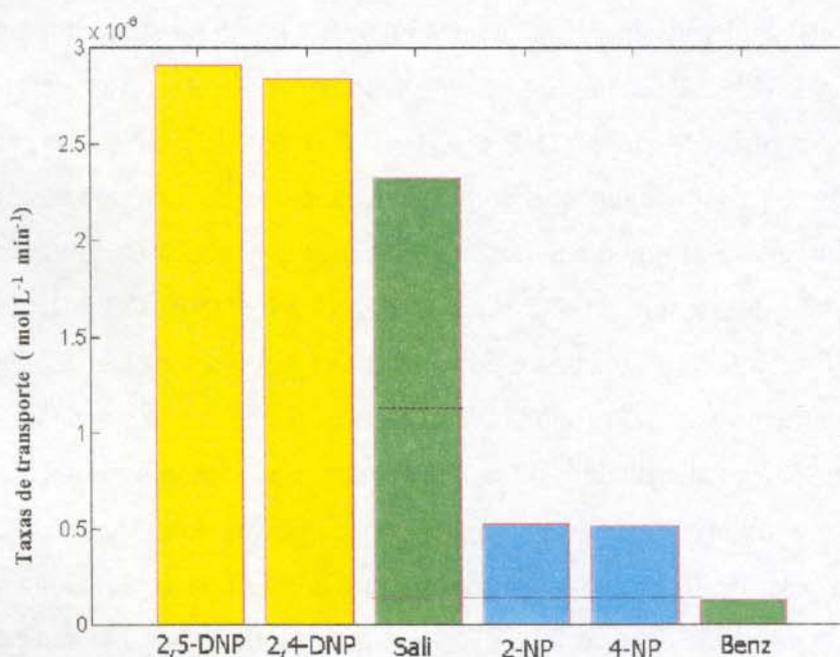
Neste caso o maior transporte do salicilato pode ser devido à possibilidade deste composto complexar dois cátions ao mesmo tempo (um no grupo fenólico e outro no carboxílico), ao contrário do benzoato. Isto, entretanto, não explica os resultados muito mais altos de transporte com o salicilato comparados com os do benzoato.



Sali



Benz

Figura 20: Taxas de transporte de K⁺ usando vários sais diferentes

Após aventar várias hipóteses, a que pareceu mais adequada foi a que considera a formação de dímeros em solução. Se isto ocorre, as taxas encontradas com o ânion benzoato são muito reduzidas pois não há ânions livres para agirem como contraíons. Por outro lado, com os ânions salicilato, mesmo que haja a dimerização, ainda resta o oxigênio fenólico ionizado, permitindo a atuação desta espécie como contraíon. Desta forma, para cada potássio transportado são transportados dois ânions, e são necessárias duas moléculas de éter coroa. Não há problema de limitação de carregador porque este foi colocado em grande excesso nestes experimentos. O transporte de dois salicilatos faz com que as taxas encontradas sejam mais altas, já que toda a quantificação é baseada exatamente nas absorbâncias devidas ao ânion na fase de recebimento. Os resultados são, portanto, apenas aparentes.

Como foi citado na parte experimental (página 49), com os compostos 2,4DNP e 2,5DNP foi feito um estudo sobre a influência da concentração inicial de fenolatos sobre sua taxa de transporte. Os resultados podem ser vistos na Figura 21.

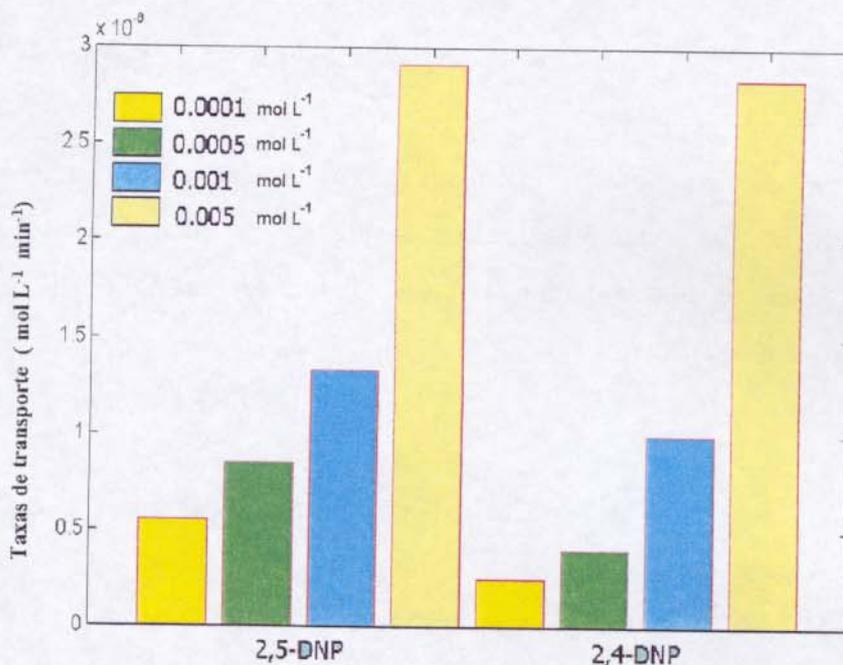


Figura 21: Efeito da concentração de fenolatos sobre as taxas de transporte de K⁺

O comportamento aqui observado pode ser explicado pelo mecanismo em seis etapas, proposto por Reusch e Cussler [24]:

- (I) $C_S^+ + A_S^- = (C^+A^-)_M$
- (II) $(C^+A^-)_M + L_M = (CL^+A^-)_M$
- (III) difusão de $(CL^+A^-)_M$ através da membrana
- (IV) $(CL^+A^-)_M = (C^+A^-)_M + L_M$
- (V) $(C^+A^-)_M = C_R^+ + A_R^-$
- (VI) difusão de L_M de volta através da membrana

A terminologia usada é: C⁺ = cátion ; A⁻ = ânion ; L = carregador ; C⁺A⁻ = par iônico ; CL⁺A⁻ = complexo do cátion associado com o ânion ; S = fase fonte (“source”) R = fase de recebimento (“receiving”) e M = membrana.

As etapas (I) e (V) são vistas como coeficientes de partição, indicados por k , enquanto a etapa (II), que é o inverso da (IV), é descrita como um equilíbrio, de constante K .

As etapas (III) e (VI) são consideradas lentas em relação às demais no desenvolvimento matemático do mecanismo. Seguindo o proposto por Ward [106], Reusch e Cussler obtém-se a equação

$$J_c = (D_{CLA} k K [L] / X) ([C_s]^2 / 1 + k K [C_s]^2)$$

Se um experimento for realizado na ausência de carregador e o transporte for desprezível, $(C^+A)_M$ também pode ser desprezado, e então $[C_s] \gg [C_R]$.

Reusch e Cussler demonstraram ainda que se o termo $k K [C_s]^2 \ll 1$, a expressão de J_c se reduz à equação

$$J_c = (D_{CLA} k K [L] / X) [C_s]^2$$

mostrando que J_c e $[C_s]^2$ podem ser diretamente proporcionais, se os demais termos forem mantidos constantes.

Mais tarde Lamb [97] e colaboradores determinaram que havia uma mudança de comportamento desta equação linear quando se trabalha com concentrações altas de sal na fase fonte. Isso leva à utilização de *atividades* ao invés de *concentrações*, de modo que tem-se as equações (a) e (b)

$$J_c = (D_{CLA} k K [L] / X) (a_{CS}^2 / 1 + k K a_{CS}^2) \quad (a)$$

$$J_c = (D_{CLA} k K [L] / X) a_{CS}^2 \quad (b)$$

A mudança de comportamento observada pelos pesquisadores é devida ao fato de que o termo $k K [C_s]^2$ NÃO É desprezível em relação a 1 se trabalhamos com altas concentrações da espécie na fase fonte.

Embora este modelo faça previsões corretas acerca da relação linear quando está envolvida uma constante de equilíbrio pequena (etapas (II) e (IV)), há uma anomalia na predição do aparecimento de um máximo de fluxo, J , num determinado valor de K e subsequente diminuição a valores maiores de K [106].

Lamb e colaboradores [107] desenvolveram um modelo para a difusão limitada pela membrana que envolve duplas camadas de difusão no lado interno da membrana líquida. Behr

[108] apresentou um tratamento teórico mais compreensível e geral a este modelo, obtendo resultados satisfatórios na predição do pico de fluxo que surge em um determinado K.

A3 : Estudos com Sali - 2,4DNP - 2,5DNP

Usando apenas o salicilato, 2,5- dinitrofenolato e 2,4- dinitrofenolato foi feito um estudo comparativo da taxas de transporte calculadas pelos métodos univariados e o PLS (multivariado), usando misturas dos três compostos. O método univariado não pôde ser usado para misturas devido à superposição espectral (ver Apêndice VI) que há para os três compostos. Assim, foram preparadas várias soluções contendo os três e foi feita uma modelagem via PLS, conforme citado na parte experimental. Paralelamente foi feito um modelo univariado para cada composto.

Inicialmente foi feita a calibração usando o comprimento de onda de máxima absorvância para cada composto (como descrito na parte experimental), obtendo-se as equações da Tabela 19:

Tabela 19 : Modelos univariados

Composto	Modelo	r
Sali	$A = 1792 [C] + 0,0005$	0,9977
2,5DNP	$A = 3350 [C] - 0,0040$	0,9982
2,4DNP	$A = 7161 [C] + 0,0055$	0,9995

A = absorvância; C = concentração, em mol L⁻¹

Para calcular os valores que serão mostrados na terceira coluna da Tabela 20 foram registrados os espectros das soluções nas concentrações indicadas na segunda coluna desta Tabela; os valores de absorvância foram colocados nas equações da Tabela 19 e novas concentrações foram calculadas. Com estes novos valores foi calculado o erro porcentual. O mesmo procedimento foi feito com o modelo construído via PLS, sendo que os resultados dos dois procedimentos mostraram que os erros obtidos pelos métodos univariados são muito elevados se comparados com os dos multivariados, como se nota nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20: Erros pelo modelo univariado [109]

Composto	$C_{\text{real}} \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$	$C_{\text{prevista}} \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$	Erro (%)
Sali	1,00	1,11	11,00
	2,00	2,19	9,50
	3,00	3,13	4,30
2,5DNP	1,00	1,09	9,00
	2,00	2,16	8,00
	3,00	3,25	8,30
2,4DNP	1,00	0,92	-8,50
	2,00	2,12	5,80
	3,00	3,24	8,10

Tabela 21: Erros pelo modelo PLS [109]

$[2,4\text{DNP}] \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$			$[\text{Sali}] \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$			$[2,5\text{DNP}] \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$		
real	Previsto	Erro (%)	Real	Previsto	Erro (%)	real	Previsto	Erro (%)
1,00	0,953	-4,70	0,800	0,825	3,13	3,00	3,048	1,60
3,00	2,190	3,00	1,00	0,969	-3,10	0,80	0,802	0,25
0,80	0,772	-3,50	1,00	1,065	6,50	3,00	3,161	5,37
2,00	2,027	1,35	0,90	1,001	11,22	4,00	3,806	-4,85
2,00	2,014	0,70	4,00	4,036	0,90	0,90	0,881	-2,11
3,00	2,972	-0,93	1,00	1,046	4,60	2,00	2,057	2,85

É importante ressaltar as diferenças nos erros percentuais. Verifica-se, por exemplo, que para o 2,4DNP pelo método univariado o menor erro foi de 5,80%, ao passo que pelo PLS o MAIOR foi 4,70%, lembrando que aqui o 2,4DNP foi quantificado em uma mistura com os outros dois compostos, havendo séria superposição espectral (Apêndice VI). O mesmo comportamento é notado para o 2,5DNP: univariadamente o menor erro foi de 8,00%, enquanto no PLS o maior foi 5,37%. Para o Sali, pelo fato de seus coeficientes de absorvidade molar serem muito menores que os dos dois demais compostos, houve um caso de erro superior a 10%; No entanto, em geral os resultados foram melhores que no método univariado.

Com os resultados de um experimento de transporte dos três compostos através de uma membrana de clorofórmio com 18C6 foram calculadas as taxas de transporte de cada substância, tanto pelo modelo univariado quanto pelo modelo PLS. Vale lembrar que, apesar de haver somente três compostos, o modelo PLS foi construído com quatro componentes principais (ou variáveis latentes, mais precisamente), provavelmente porque existe algum tipo de interação entre os compostos ou competição na interface, levando a pequenos desvios de linearidade.

Um exemplo para esclarecer um pouco mais este ponto: seja um conjunto de dados em três dimensões (três compostos, por exemplo). A primeira variável latente vai explicar a maior variância dos dados, tendo a direção do maior espalhamento da nuvem de pontos; a segunda variável latente vai explicar a segunda maior variância, sendo perpendicular à primeira variável. Ela não explica a variância que a primeira já descreveu. A terceira variável latente explica, por fim, a terceira maior variância da nuvem dos pontos, sendo também ortogonal às outras duas. Se não há desvios de linearidade, a variância acumulada já explicada é de 100%. Caso contrário, talvez a inclusão de uma quarta variável latente melhore os resultados (como no caso que está sendo discutido).

Na Tabela 22 são apresentados os resultados para a cinética de transporte, calculados via modelo univariado [109].

Tabela 22: Taxas de transporte calculadas pelo método tradicional (univariado)

Composto	Taxa de Transporte $\times 10^6 \text{ mol.L}^{-1} \text{ min}^{-1}$
Sali	1,12
2,4DNP	1,37
2,5DNP	2,38

A Tabela 23 mostra as porcentagens de variância explicadas pelas quatro variáveis latentes do modelo PLS.

Tabela 23: Variâncias explicadas pelo modelo PLS com 4 variáveis latentes (VL)****

VL #	Bloco X		Bloco Y	
	Esta VL (%)	Total (%)	Esta VL (%)	Total (%)
1	83,17	83,17	52,23	52,23
2	16,22	99,38	34,63	86,86
3	0,22	99,60	11,52	98,38
4	0,39	99,99	1,48	99,85

Bloco X: espectros; Bloco Y: concentrações

Na Tabela 24 estão as taxas calculadas no experimento de transporte, usando o PLS.

Tabela 24: Taxas de transporte calculadas pelo método PLS

Composto	Taxa de Transporte $\times 10^6 \text{ mol.L}^{-1} \text{ min}^{-1}$
Sali	2,60
2,4DNP	4,61
2,5DNP	3,69

**** Para lembrar sobre as variáveis latentes, ver páginas 33, 38 e 40

Os valores são discordantes mas é bastante provável, frente aos erros já descritos, que a realidade deve estar sendo representada pelos resultados via PLS. Pode-se observar, ainda, que a concentração inicial na fase fonte influencia a taxa de transporte. No estudo para comparação entre 2,5DNP, 2,4DNP, Sali, 2NP, 4NP e Benz os processos foram feitos com soluções $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ na fase fonte e as taxas encontradas foram mais baixas que as obtidas agora (mostradas na Tabela 22), com a fase fonte com concentração $1,0.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. O comportamento do 2,4DNP e 2,5DNP foram sempre muito semelhantes. Deve-se lembrar que os resultados são significativos pois o problema envolve grande superposição espectral .

A4: Estudos com PIC - 2,4DNP - 2,5DNP

Um modelo de calibração foi construído utilizando as onze primeiras amostras da Tabela 25, $X = (n=11 \times m=156)$, que significa 11 amostras com absorbâncias medidas em 156 comprimentos de onda – de 220 a 530 nm, em intervalos de 2 nm), centrando os dados na média previamente. Convém salientar que neste estudo há três analitos de interesse e, portanto, o bloco Y pode ser representado como uma matriz $Y = (11 \times 3)$. No Apêndice VI são mostrados os espectros dos três compostos, salientando a grande superposição também neste caso.

Tabela 25: Misturas usadas na preparação das curvas de calibração multivariada.

Mistura		[2,4DNP] $\times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$	[PIC] $\times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$	[2,5DNP] $\times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$
C A L I B R A Ç Ã O	01	2,0	1,0	2,0
	02	1,5	1,0	1,5
	03	1,0	0,8	2,0
	04	2,0	0,8	1,0
	05	1,0	0,5	0,5
	06	0,5	0,5	1,0
	07	0,8	0,8	0,8
	08	0,4	0,6	0,8
	09	0,8	0,6	0,4
	10	1,5	1,2	1,0
	11	1,4	1,0	1,2
VALI- DAÇÃO	12	1,0	1,0	1,0
	13	1,2	0,7	0,8
	14	1,5	0,8	1,0
	15	1,0	0,7	1,2

Inicialmente foi feita a Análise de Componentes Principais (PCA) com o objetivo de se ter uma idéia do número de componentes principais necessários para descrever o conjunto de dados. Pela análise PCA se observa que três componentes principais, neste caso, são suficientes e os resultados da porcentagem de variância explicada em cada componente principal estão na Tabela 26.

Tabela 26: Porcentagem de variância obtida com o PCA.

Porcentagem de variância explicada pelo modelo PCA		
# Componente principal	% Variância desta PC	% Variância total
1	97,520	97,520
2	1,410	98,940
3	1,050	99,990
4	0,001	100,000
5	0,001	100,000
6	0,000	100,000

A Figura 22 contém os “loadings” para as três primeiras componentes principais. É interessante comparar estes resultados com os espectros puros (Apêndice VI). Está claro que toda a região espectral utilizada é importante na análise, pois os “loadings” são diferentes de zero em toda a faixa espectral considerada.

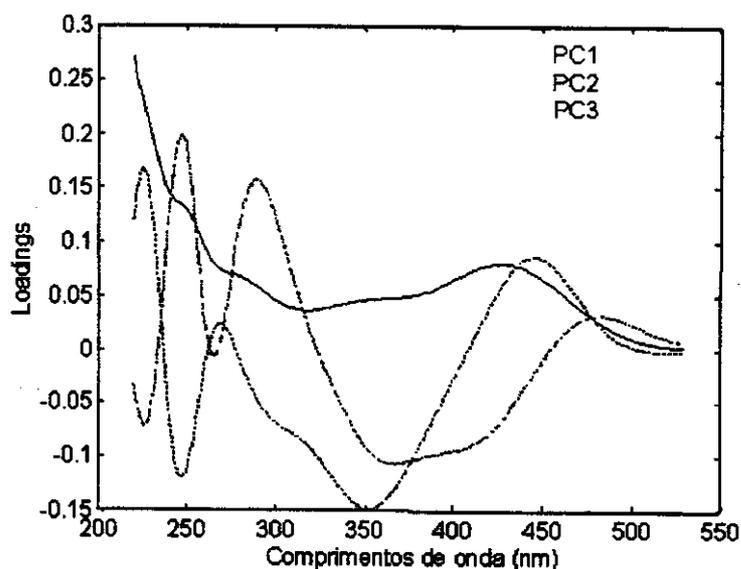


Figura 22: “Loadings” das três primeiras componentes principais

Calibração usando o método PLS

Na etapa de validação, é feita a escolha do número k de variáveis latentes (que corresponde às componentes principais neste caso) e a identificação de possíveis "outliers". A definição de k , tal como descrito na introdução (página 40), foi feita através do gráfico de PRESS (ver def. na pág. 39) versus número de variáveis latentes, mostrado na Figura 23.

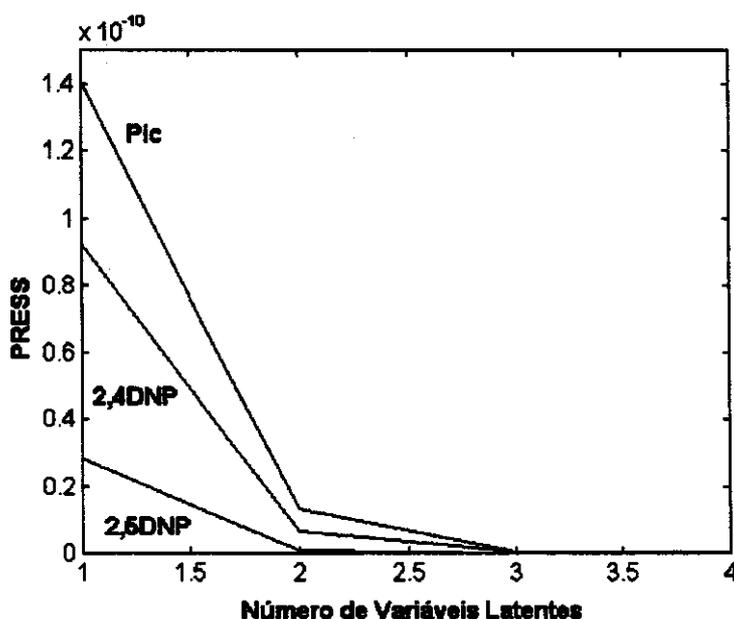


Figura 23: PRESS vs número de VL para as três primeiras componentes principais

Conforme se pode observar, a partir de 3 variáveis latentes o valor do PRESS é próximo de zero. Este resultado de $k = 3$ já era esperado uma vez que temos no sistema três compostos químicos.

A Tabela 27 mostra as porcentagens da variância descrita pelo modelo para as três primeiras variáveis latentes. Os resultados são bem semelhantes àqueles obtidos com PCA, indicando que os resultados obtidos pela calibração com o método PLS serão bem semelhantes aos obtidos pelo método PCR.

Tabela 27: A variância descrita pelo método PLS com três variáveis latentes (VL).

Porcentagem de Variância descrita pelo método PLS				
VL #	—Bloco - X—		—Bloco - Y—	
	Esta VL (%)	Total (%)	Esta VL (%)	Total (%)
1	97,52	97,52	71,43	71,43
2	1,37	98,90	23,78	95,21
3	1,09	99,99	4,70	99,91

Observando-se, agora, o gráfico de resíduos versus “leverage” (Figura 24), é evidente que as misturas do conjunto de calibração possuem valores de “leverage” dentro da faixa considerada normal, ou seja, menor que h_{crit} , que neste caso vale 0,81 ($= 3*3/11$). Pode-se ver também que os valores de Resíduos de Student para as concentrações estão dentro da faixa prevista (-2,5 a +2,5). É necessário salientar que neste único gráfico estão incluídos os resultados obtidos para os três analitos. Assim, aparecem três resultados para uma mesma amostra, cada um se referindo a um dos analitos.

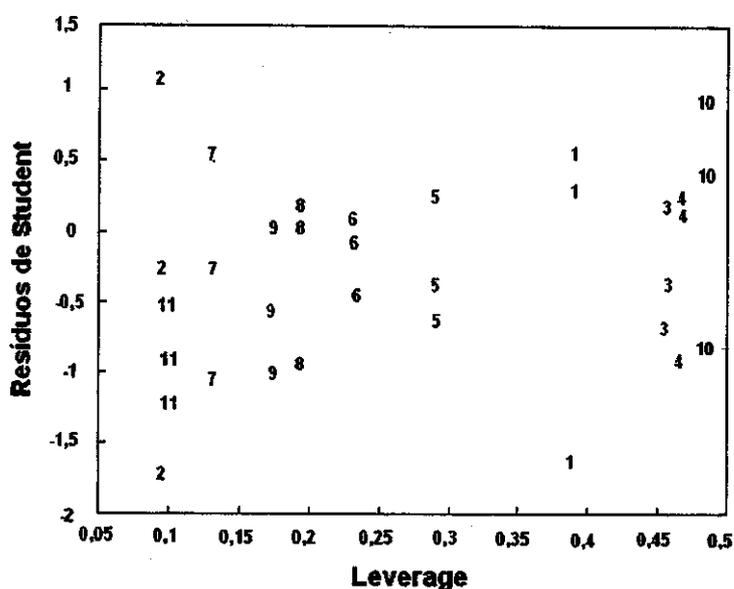


Figura 24: Resíduos de Student vs “leverage” via PLS com 3 VL

Foram calculados também os erros percentuais para cada amostra usada na etapa de calibração, usando novamente a equação

$$E(\%) = \left(\frac{c_{est} - c}{c} \right) \times 100$$

Os erros percentuais de previsão obtidos na validação cruzada são apresentados na Tabela 28, para os três analitos usando um modelo com três variáveis latentes. Observa-se que os resultados são bastante satisfatórios, pois de um total de 33, apenas 5 estão acima de 1,5% (os valores estão destacados).

O gráfico dos três vetores de regressão (um para cada analito) no modelo validado com três variáveis latentes (Figura 25) ressalta, mais uma vez, que toda essa faixa dos espectros entre 220 e 530 nm é importante para a modelagem, visto que para cada intervalo dessa faixa o

coeficiente de regressão é mais significativo para um dos compostos. É útil comparar os dados originais (espectros puros, Apêndice VI) com o dos “loadings” (Figura 22) e os vetores de regressão (Figura 25). Esta comparação pode facilitar a interpretação dos fenômenos que estão por trás do modelo de regressão.

Tabela 28: Erros percentuais de previsão (conjunto de calibração), obtidos pela validação cruzada com três variáveis latentes.

Mistura	2,4DNP Erro (%)	PIC Erro (%)	2,5DNP Erro (%)
01	1,31	-0,52	-0,87
02	-2,25	-0,05	2,36
03	-0,91	0,39	0,06
04	-0,50	0,64	-0,81
05	0,25	-1,04	1,44
06	0,64	-0,77	-0,61
07	-0,13	0,96	-2,52
08	3,69	-0,56	-1,37
09	-0,98	0,42	4,25
10	0,65	-0,84	-1,35
11	0,40	0,96	1,29

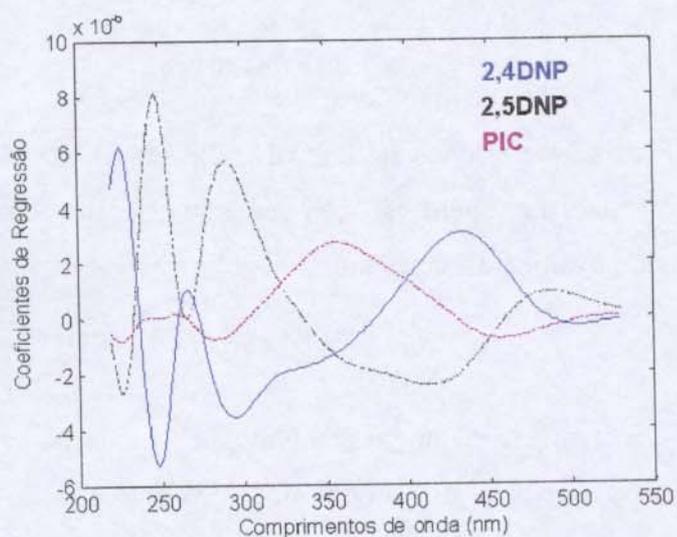


Figura 25: Vetores de regressão obtidos via PLS com 3 VL

No final do processo de validação, as quatro últimas amostras da Tabela 25 foram utilizadas como conjunto-teste. A Tabela 29 mostra os erros percentuais de previsão obtidos para as concentrações dos três compostos neste conjunto. Conforme se observa, os valores previstos estão bem próximos dos reais, indicando que o modelo está bem ajustado e com boa capacidade preditiva.

Tabela 29: Erros percentuais de previsão do conjunto de previsão.

Mistura	2,4DNP Erro (%)	PIC Erro (%)	2,5DNP Erro (%)
12	-0,30	0,60	-1,60
13	1,75	-0,14	0,63
14	0,93	1,13	0,50
15	3,10	0,29	0,92

Este modelo de calibração recém-construído foi utilizado para determinar as taxas de transporte das três espécies químicas. Para tal, foram registrados 19 espectros na fase de recebimento em intervalos regulares de 5 minutos (ver parte experimental). As concentrações de cada espécie em cada tempo foram previstas pelo modelo, e estão representadas na Figura 26.

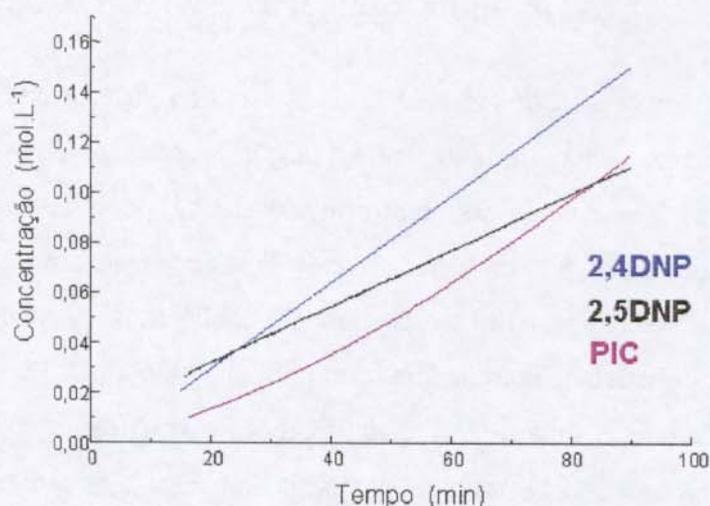


Figura 26: Concentração prevista vs tempo no processo de transporte

A inclinação das respectivas retas correspondem às taxas de transporte e foram determinadas por uma simples regressão das concentrações com os respectivos tempos. Estes valores são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 : Taxas de transporte obtidas para cada composto.

Composto	Taxa de Transporte x 10 ⁷ mol.L ⁻¹ min ⁻¹
2,4DNP	1,71
2,5DNP	1,43
PIC	1,14

Neste caso, contrariando o comportamento esperado segundo a equação de Born, o picrato (maior ânion) apresentou menor taxa de transporte. Isto foi atribuído a uma forte competição pelo éter coroa na interface fase fonte / membrana. A área do sistema é limitada (apenas 0,42 cm²) e as espécies com maior mobilidade (menores ânions) têm mais possibilidade de atingir a interface mais rapidamente. Assim, apesar da sua tendência de permanecer na fase aquosa, os ânions menores estão em maior disponibilidade para a complexação com o carregador e o processo ocorre mais eficientemente que para o picrato [87].

A5: Estudos com 2NP - 2,4DNP - 2,5DNP

São observadas (Apêndice VI) algumas diferenças espectrais entre 2NP, 2,4DNP e 2,5DNP, embora haja bastante superposição entre os dois últimos, como foi visto anteriormente. Nesta etapa foi demonstrado que é possível obter os espectros puros de componentes de uma mistura usando a metodologia da decomposição trilinear (TLD). Neste estudo estes espectros puros eram previamente conhecidos, de maneira que foi possível fazer a comparação dos mesmos com os que foram obtidos pelo TLD. Foi empregado ainda, o método OLS para fazer mais uma vez as quantificações e verificar o quão concordantes eram estes resultados com os do TLD (trata-se, então, de comparar o método muito simples com um mais complexo).

Alguns instrumentos, como os espectrofotômetros com arranjo de diodos, são os mais adequados para acompanhar o transporte através de membranas por permitirem a obtenção dos dados em três dimensões.

O método RAFA (Rank Annihilation Factor Analysis), introduzido por Ho *et al.* [110], foi reformulado mais tarde e expandido por Sanchez e Kowalski [111], surgindo então os métodos não-iterativos GRAM (Generalized Rank Annihilation Method) [111,112] e TLD (TriLinear Decomposition). Este métodos são eficientes para analisar os dados em três dimensões, porém o GRAM está restrito à análise de apenas duas amostras, enquanto o TLD não tem restrições neste ponto. O TLD faz uma decomposição triádica no conjunto de dados, obedecendo a um modelo trilinear descrito pela equação

$$R_{ijk} = \sum_{n=1}^N X_{in} Y_{jn} Z_{kn} + E_{ijk}$$

onde R_{ijk} representa os elementos do conjunto em três dimensões e N é o número de fatores no modelo [113]. As matrizes X , Y e Z descrevem os espectros puros, as cinéticas (concentração vs tempo) e a contribuição relativa de cada componente físico, respectivamente. O “rank” (posto, dimensionalidade intrínseca) de cada matriz de componentes puros é unitário na ausência de ruídos, de maneira que o posto da matriz é o número total de componentes [113].

Na presença de não – linearidades espectrais, o “rank” de cada componente não é muito diferente da unidade e, para corrigir isto, são adicionados mais fatores ao modelo (a idéia é a mesma de se usar quatro componentes principais para um sistema com três compostos, como foi discutido anteriormente).

As análises neste caso foram feitas com as matrizes truncadas, ou seja, usando somente os comprimentos de onda entre 278 e 530 nm (as matrizes têm dimensão 81x126) uma vez que abaixo de 278 nm há muita influência do clorofórmio nos espectros e acima de 530 nm não há nenhuma absorbância significativa. Para os cálculos o intervalo de tempo empregado foi de 5 a 85 minutos. Nos tempos abaixo de cinco minutos ainda não há a estabilidade do sistema e os resultados não são confiáveis neste intervalo de tempo. No Apêndice VII há uma Figura demonstrando como os espectros estão sendo agrupados, a título de maior esclarecimento.

A decomposição de valor singular (SVD, singular value decomposition) foi aplicada para determinar qual era o número de fatores necessário para modelar o transporte nas membranas. Cada amostra individual foi bem descrita por dois fatores, embora um terceiro, muito pequeno, pudesse descrever a variância não – aleatória.

Os mesmos resultados foram obtidos quando as três misturas ternárias (da Tabela 5, parte experimental página 51) são justapostas na horizontal ou na vertical e analisadas como se fossem apenas uma matriz, conforme mostra a Tabela 31.

Tabela 31: Valores singulares e porcentagem de variância para os dados das misturas 1, 2 e 3 da Tabela 5 justapostos horizontal (H) e verticalmente (V)

Valores singulares V	Variância Total %	Valores singulares H	Variância Total %
33,2497	99,9494	33,2031	99,6692
0,7180	0,0466	1,8774	0,3187
0,1916	0,0033	0,3316	0,0099
0,0805	0,0006	0,1503	0,0020

De acordo com a análise de variância feita pelo SVD, a aplicação do método TLD deve fornecer bons resultados para dois compostos (2,4-DNP e 2,5-DNP, que têm maiores absorvâncias medidas). Embora este modelo com dois fatores pareça ser adequado para descrever o transporte, sabe-se que o sistema químico tem três compostos. Este terceiro fator que seria necessário estaria descrevendo apenas variações não – aleatórias. Na verdade, este fator também produz um “espectro puro”, mas o resultado que é obtido no perfil de concentração vs tempo não tem nenhum significado físico neste caso [94].

Os perfis espectrais e cinéticos estimados pelo modelo com três fatores para 2,4DNP e 2,5DNP são mostrados na Figura 27a e 27b. Os comprimentos de onda de máxima absorvância encontrados nos espectros estimados (436 e 439 nm para 2,4DNP e 2,5DNP, respectivamente) mostram uma alta concordância, dentro do erro experimental esperado, com os que aparecem nos espectros puros registrados anteriormente (434 e 444 nm).

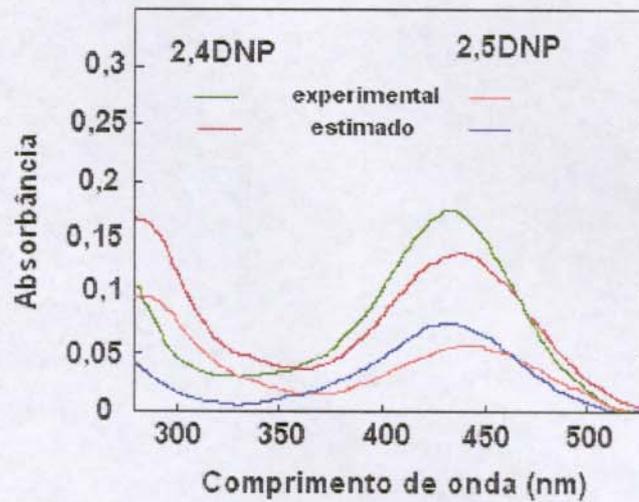


Figura 27a: Espectros de absorção experimentais e estimados, normalizados para comprimento unitário

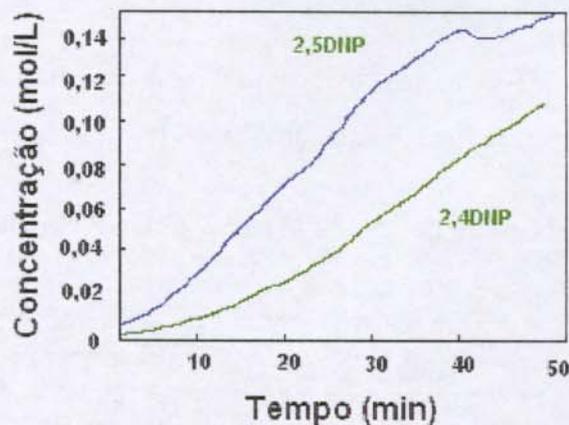


Figura 27b: Perfis cinéticos estimados pelo modelo TLD

Resumindo, estes resultados indicam que somente o 2,4DNP e o 2,5DNP são efetivamente transportados através da membrana quando uma fase fonte é uma mistura de 2NP com estes compostos. A fim de verificar tais resultados foi feita uma análise via OLS usando cada mistura em separado. Os resultados para uma das misturas estão na Figura 28 (A e B). Estes confirmam que o 2NP tem uma baixa taxa de transporte nestas condições. Uma mistura extra (número 4 na Tabela 5, página 51) contendo apenas os dois isômeros foi estudada, para esclarecer qual o efeito do 2NP. Observa-se que na ausência deste componente, o transporte dos isômeros é incrementado.

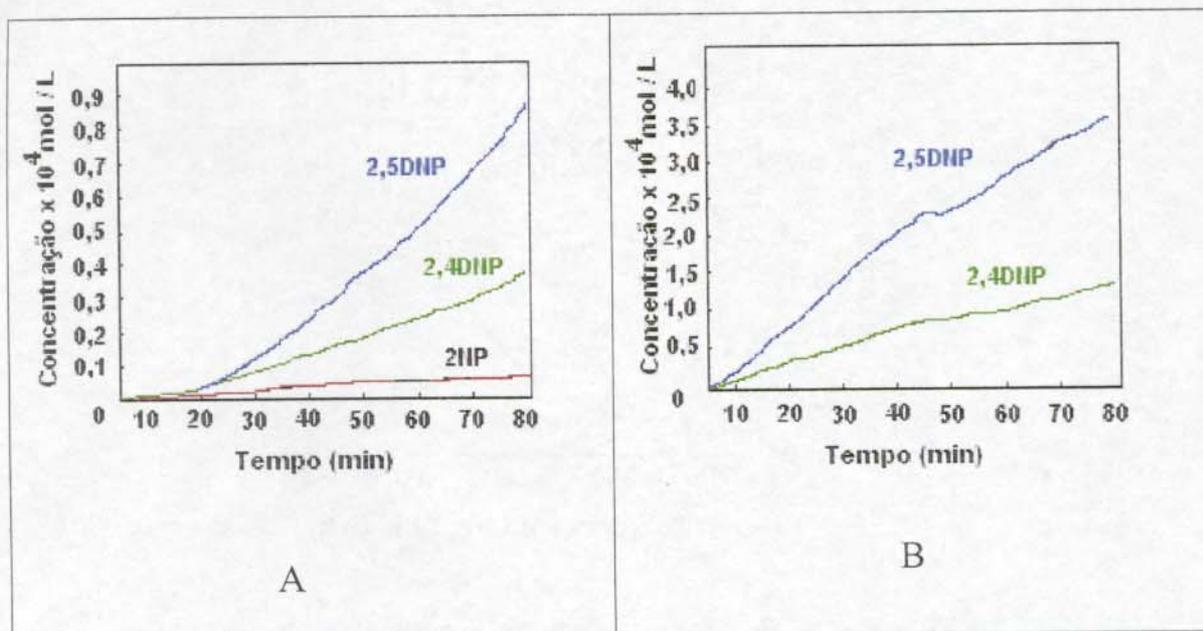


Figura 28: Perfis de cinética das misturas 2 (A) e 4 (B) da Tabela 5

Os resultados finais obtidos, comparados com os encontrados em outros estudos são colocados na Tabela 31 para fins de comparação [94].

Tabela 31: Taxas de transporte de 2NP, 2,4DNP e 2,5DNP em diferentes situações ($\times 10^5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) [94]

	“Single” ^(18, 19) (a)	Binário ^(b)	Ternário ^(d)
2NP	0,444	(c)	0,008
2,4DNP	1,37	0,158	0,045
2,5DNP	2,38	0,428	0,125

(a) pelo método univariado (b) sem 2NP (c) não calculado (d) valores médios do OLS

Se apenas um composto é transportado as taxas se mostram mais elevadas. O mesmo comportamento é observado ao comparar os valores encontrados para misturas binárias e os encontrados para as misturas ternárias. Isto vem confirmar os resultados do estudo anterior: a presença de ânions menores na interface impede (ou dificulta) a passagem de ânions maiores. No caso anterior, o picrato foi muito prejudicado pela presença de 2,4DNP e 2,5DNP (menores que ele), que por si só têm altas taxas de transporte. Neste último caso, o 2NP não foi suficientemente eficaz para diminuir tanto o transporte dos dois isômeros, pois sua taxa individual é naturalmente menor que a de 2,4DNP e 2,5DNP.

A6: Experimentos com os Bactericidas

Devido à sua baixa solubilidade em água os compostos bioativos foram estudados na forma de íons fenolato, através da solubilização em solução alcalina. Desta forma, adotou-se como controle dos experimentos de calorimetria a inoculação dos microorganismos numa solução alcalina (100 % de Resposta Biológica (RB) [57], o que corresponde à altura na curva potência *versus* tempo do termograma de *Saccharomyces cerevisiae* nesta solução). No Apêndice V são mostradas as curvas controle, bem como os efeitos da concentração de $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ a $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (dose) das drogas adicionadas neste processo.

Graficando-se os valores de RB versus $\log(\text{dose})$ mostrados na Tabela 32 obteve-se, por extrapolação dos mesmos, os valores de $\log(\text{dose})_{\text{máx}}$ dos compostos m-pentoxifenol, m-butoxifenol e m-propoxifenol sendo que para os outros dois compostos não foi possível a determinação do $\log(\text{dose})_{\text{máx}}$ pois dentro da faixa de concentração estudada não ocorreu inibição da respiração do microorganismo, obtendo-se RB de aproximadamente 100 %. O valor de $\log(\text{dose})_{\text{máx}}$ é obtido quando RB é igual a zero e corresponde ao logaritmo da concentração máxima da droga adicionada a uma cultura de células a qual não deve produzir resposta no calorímetro [57].

Para fazer uma determinação adequada das taxas de transporte de cada composto das séries homólogas estudada seria necessário ter, para cada composto, um modelo multivariado (lembrando que estes compostos foram estudados somente com soluções de um composto por vez, sem as misturas). Em alguns casos foi notado que as quantidades presentes na fase de recebimento foram extremamente baixas, o que tornaria os resultados muito mais sensíveis a erros. Nestes casos, os modelos deveriam ser feitos considerando as soluções em clorofórmio e as em diclorometano, solventes empregados como membranas nestes estudos. Para construir modelos de análise multivariada em solventes orgânicos seria necessário a dissolução dos sais diretamente nos solventes, o que se mostrou inviável do ponto de vista experimental, tanto pela dificuldade de produzir os sais de potássio em quantidades adequadas (m-alcoxifenolato, p-alcoxifenolato e os sais dos parabens), como pela dificuldade de dissolvê-los nos solventes orgânicos. Assim, nesta etapa foi feita apenas uma investigação *qualitativa* do transporte.

Tabela 32: Valores de RB e log(dose) [57].

Composto	Dose (μM)	Log(dose)	RB	Composto	Dose (μM)	log(dose)	RB
1	2,021	3,31	93	3	6,305	3,80	83
1	4,078	3,61	38	3	8,034	3,91	80
1	6,002	3,78	10	3	10,100	4,00	76
2	2,009	3,30	92	4	6,126	3,79	99
2	4,455	3,65	53	4	8,143	3,91	98
2	6,177	3,79	36	4	10,110	4,00	97
2	8,191	3,91	22	5	6,018	3,78	96
3	2,061	3,31	97	5	8,093	3,91	98
3	4,147	3,61	89	5	10,100	4,00	93

Compostos: 1 - *m*-pentoxifenol, 2 - *m*-butoxifenol, 3 - *m*-propoxifenol, 4 - *m*-etoxifenol, 5 - *m*-metoxifenol.

Nas Figuras 29a e 29b são mostradas as absorvâncias encontradas na fase de recebimento e na membrana, para o caso onde se utilizou o clorofórmio como membrana e os membros da série dos 3-alcóxifenóis. Nota-se facilmente que tais compostos não chegam à fase de recebimento, ou seja, não há transporte nenhum (observe-se, ainda, os valores de absorvância). Na membrana líquida hidrofóbica há uma quantidade um pouco mais elevada dos bactericidas, mas ainda muito pequena no caso dos derivados metílico e etílico. Em diclorometano o mesmo efeito pode ser observado.

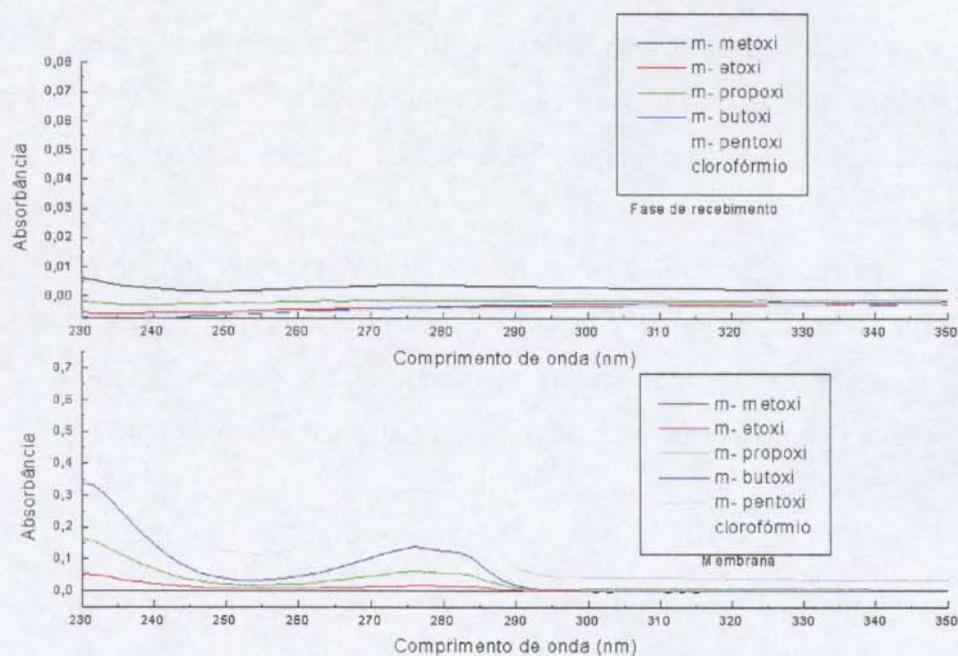


Figura 29a: Espectros UV-Vis das fases de recebimento e da membrana no estudo do transporte de 3-alcóxifenóis (clorofórmio)

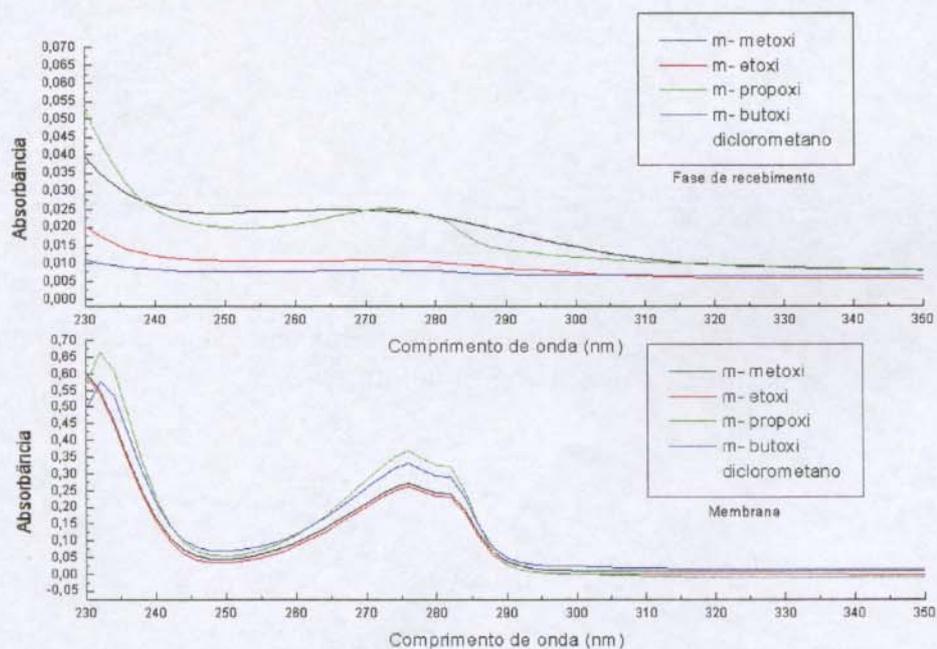


Figura 29b: Espectros UV-Vis das fases de recebimento e da membrana no estudo do transporte de 3-alcóxifenóis (diclorometano)

No caso dos membros da série dos 4-alcoxifenóis observa-se exatamente o mesmo efeito, porém as absorbâncias são mais elevadas (Figuras 30a e 30b). Isto quer dizer que aumentando-se a constante dielétrica, neste caso, o transporte se torna mais eficiente através da membrana.

Os resultados gerais dos experimentos realizados mostraram que nos casos onde são empregados m- alcoxi e p- alcoxifenolatos de potássio como fase fonte não há o aparecimento destes compostos na fase de recebimento, mas apenas na membrana líquida (só para os derivados homólogos com maior número de carbonos e em clorofórmio).

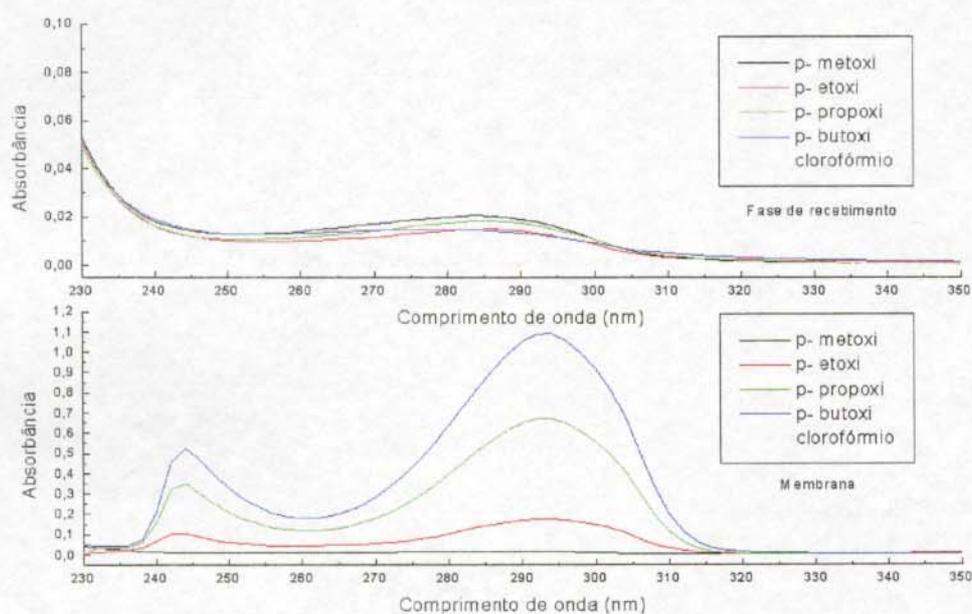


Figura 30a: Espectros UV-Vis das fases de recebimento e da membrana no estudo do transporte de 4-alcoxifenóis (clorofórmio)

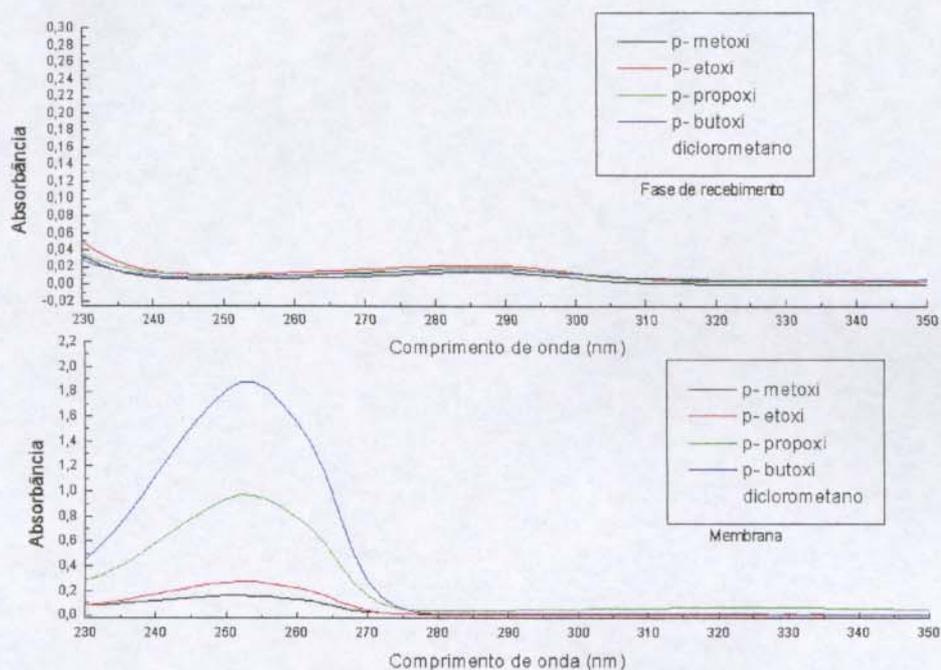


Figura 30b: Espectros UV-Vis das fases de recebimento e da membrana no estudo do transporte de 4-alcoxifenóis (diclorometano)

No caso dos experimentos usando os parabens, mesmo na presença do éter coroa não foram detectadas quantidades significativas da droga na membrana, sendo que em alguns casos foi detectada uma quantidade muito pequena destes compostos na fase de recebimento (Figuras 31a e 31b).

Em virtude das absorbâncias medidas terem sido muito baixas, não foi possível um estudo quantitativo de transporte para estes compostos, conforme citado anteriormente. Com base nos resultados qualitativos, entretanto, pode-se dizer que os parabens exercem efeito bactericidas agindo *provavelmente* sobre o citoplasma, uma vez que eles conseguem atravessar a membrana líquida (e, portanto, a membrana biológica, já que a membrana líquida é usada para mimetizar a biológica; suas constantes dielétricas são de mesma ordem de grandeza). No caso destes compostos ocorre uma atividade muito mais baixa que nos casos das duas outras séries estudadas (meta e para-alcoxifenolatos).

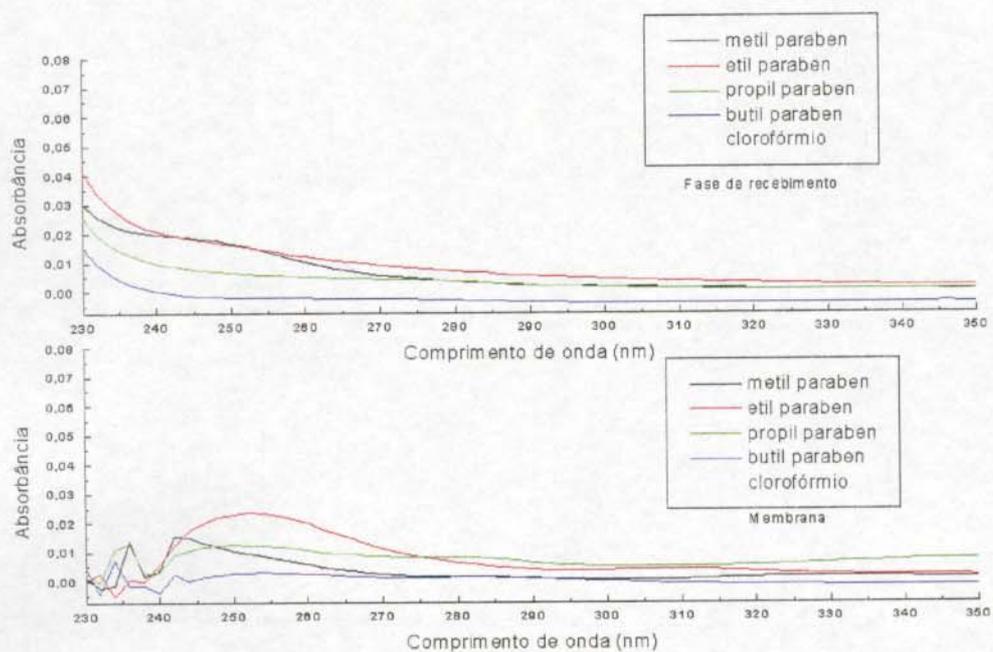


Figura 31a: Espectros UV-Vis das fases de recebimento e da membrana no estudo do transporte de parabens (clorofórmio)

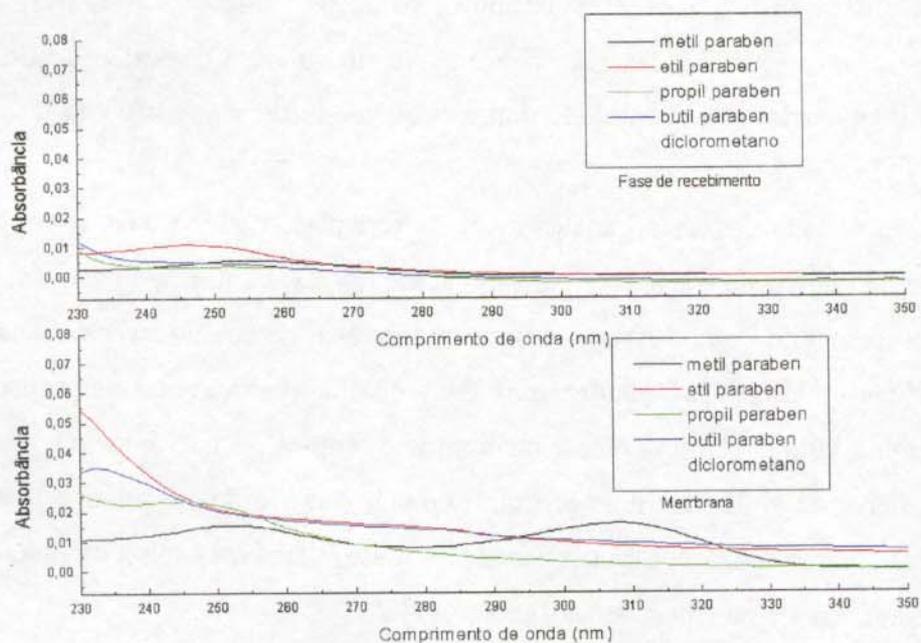


Figura 31b: Espectros UV-Vis das fases de recebimento e da membrana no estudo do transporte de parabens (diclorometano)

Os resultados de calorimetria estão em boa concordância com os dos experimentos de transporte. Quanto menor a cadeia lateral dos derivados, menor é o efeito sobre os microorganismos. Observa-se que com cadeias maiores há o acúmulo dos bactericidas na membrana em todos os casos, mas de maneira particular na série dos 4-alcoxifenóis (derivado butílico). Sua hidrofobicidade mais elevada favorece a entrada na membrana mas dificulta a liberação na de recebimento, mesmo com o gradiente de concentração entre a membrana e esta fase.

PARTE B

Micelas reversas como carregadores: o transporte de aminoácidos

Fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) foram escolhidos por absorverem absorção na região UV-Vis, sendo portanto adequados para o estudo com o sistema espectrofotométrico utilizado nas demais etapas deste trabalho. Os espectros UV – Vis destes compostos e suas respectivas estruturas são mostrados no Apêndice VIII.

Para transportar estes aminoácidos foram empregadas micelas reversas dos surfatantes apresentados na Figura 32.

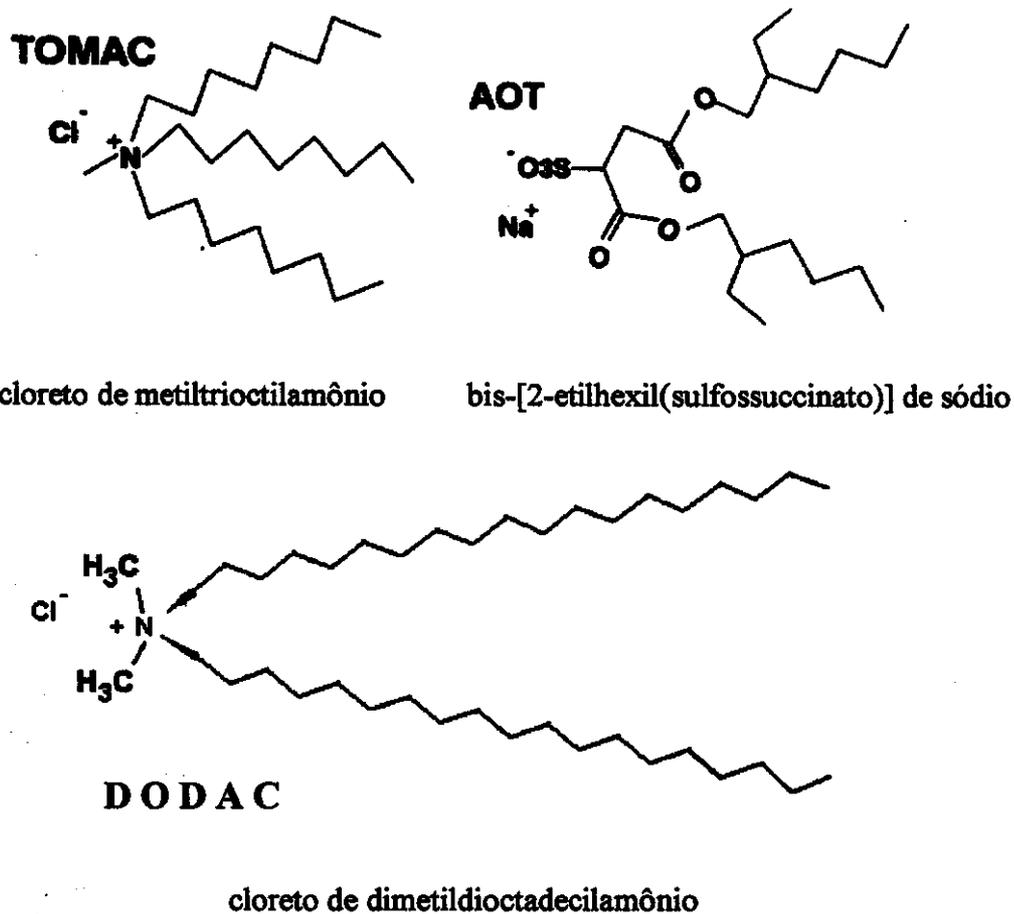
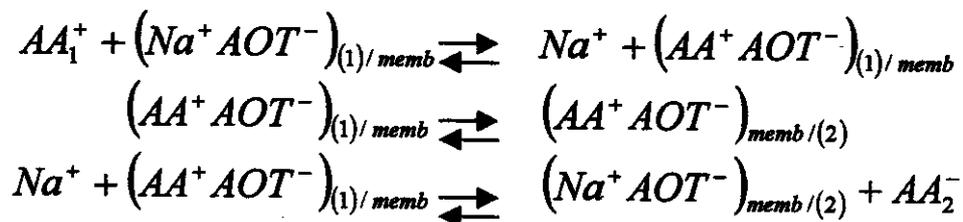


Figura 32: Estruturas dos surfatantes utilizados

O sistema de transporte: exemplificando com o Aerosol-OT

O transporte foi estudado utilizando uma cela de Schulmann. Na interface da fase aquosa 1 / fase orgânica o surfatante aniônico lipofílico AOT, interage com a espécie catiônica de um aminoácido via interação eletrostática a fim de extraí-lo para a membrana orgânica. O aminoácido em sua forma catiônica presente na fase orgânica é então liberado para a fase aquosa 2 por uma reação de troca com um cátion inorgânico via mecanismo antiporte [7]. Com o TOMAC e o DODAC o mecanismo é semelhante, apenas que na fase fonte o aminoácido estará em sua forma aniônica, uma vez que este é um surfatante catiônico; nos dois casos o ânion é cloreto.

O mecanismo para o transporte do aminoácido AA^+ da solução fase aquosa fonte (1) através da membrana (memb) e passagem para a fase aquosa de recebimento (2) pode ser representado pelo conjunto de reações abaixo:



Este conjunto de reações pode também ser representado pela Figura 33.

Estudos extensivos [67-69] mostraram que os aspectos característicos dos dados de transporte através de membranas líquidas obtidos com tais sistemas são, em muitos casos, perfeitamente consistentes com modelos de transporte facilitado, análogos àqueles que ocorrem com o transporte de íons metálicos por carregadores macrocíclicos do tipo éter coroa. Similarmente a estes carregadores, microemulsões do tipo óleo em água (o/w) podem transportar íons através de uma membrana hidrofóbica, mas a associação entre carregador e a espécie química transportada está longe de ser específica. De fato, neste caso o íon metálico transportado está simplesmente solubilizado no microambiente aquoso da micela invertida, dentro do qual o íon pode interagir com a cabeça polar do surfatante.

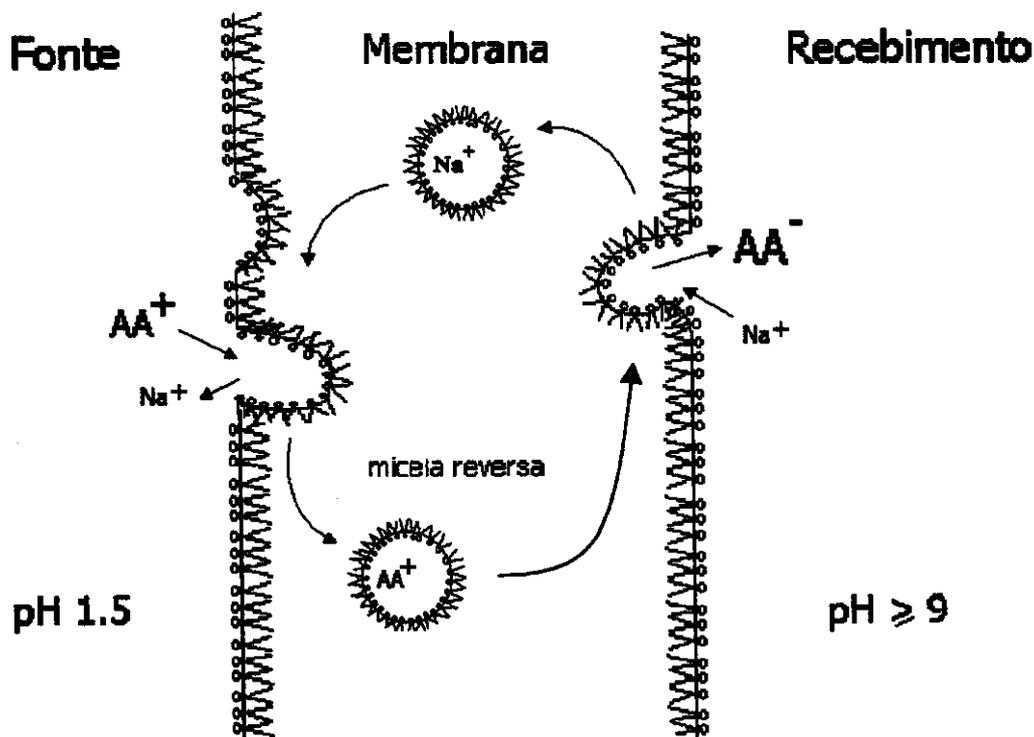


Figura 33: O transporte de aminoácidos com AOT

Sendo essencialmente insolúveis em solventes orgânicos devido à sua natureza zwitteriônica, os aminoácidos solubilizados em uma micela invertida estão associados a esta, sendo que sua interação com a micela pode acontecer de várias formas. Dependendo da sua carga elétrica e hidrofobicidade eles podem estar solubilizados preferencialmente na parte central aquosa, na interface da água e da camada de surfatante, ou ainda diretamente na monocamada de surfatante. O transporte ocorre devido a um processo de protonação – desprotonação que extrai o aminoácido de uma fase aquosa para outra através da membrana líquida hidrofóbica. Estas diferentes regiões de solubilização têm sido discutidas em literatura publicada recentemente [75].

Uma vez que as interações entre micelas invertidas e os aminoácidos são fortemente dependentes da natureza destes e do surfatante, o estudo da interação, transporte e extração simultânea destes através de membranas líquidas hidrofóbicas e a análise multivariada dos dados de transporte obtidos em tempo real têm grande relevância, tanto do ponto de vista bioquímico quanto industrial [75].

B1: Experimentos com Aerosol-OT

Os resultados dos experimentos indicados na Tabela 33 (apresentados na Tabela 8, na parte experimental), mostram que no estudo do transporte individual de cada aminoácido, utilizando concentrações de AOT $5,0 \cdot 10^{-3}$ e $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹, sempre são obtidas taxas decrescentes na ordem: Phe > Trp > Tyr. Na Figura 34 estão os resultados dos transportes individuais e nas Figuras 35 a 37 os resultados dos transportes de misturas.

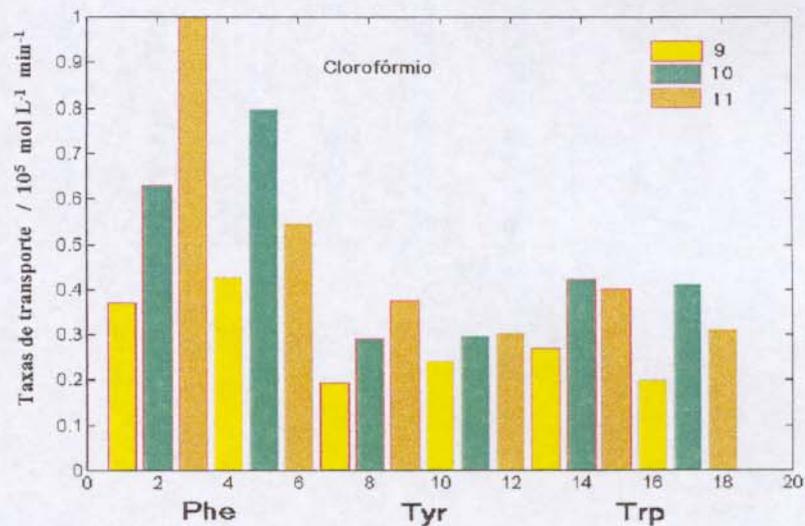


Figura 34: Comparação das taxas de transporte de aminoácidos

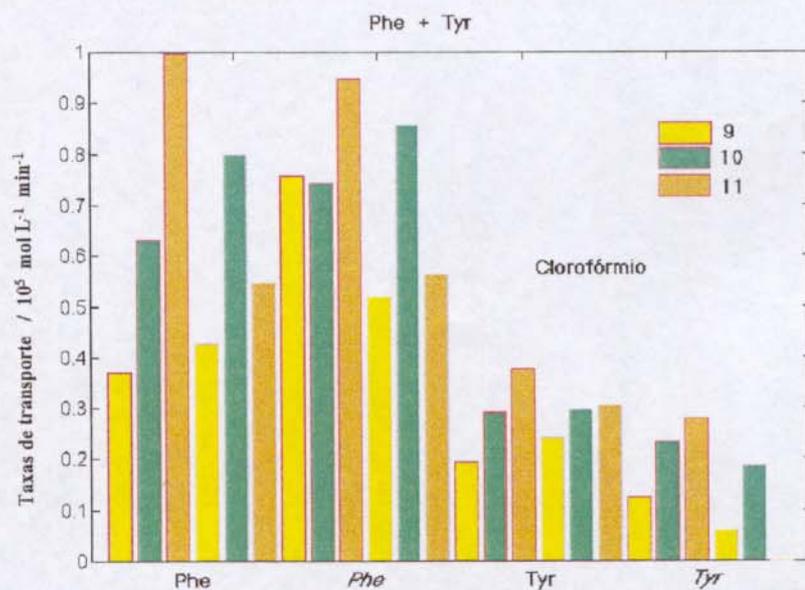


Figura 35: Transporte individual e simultâneo de Phe e Tyr

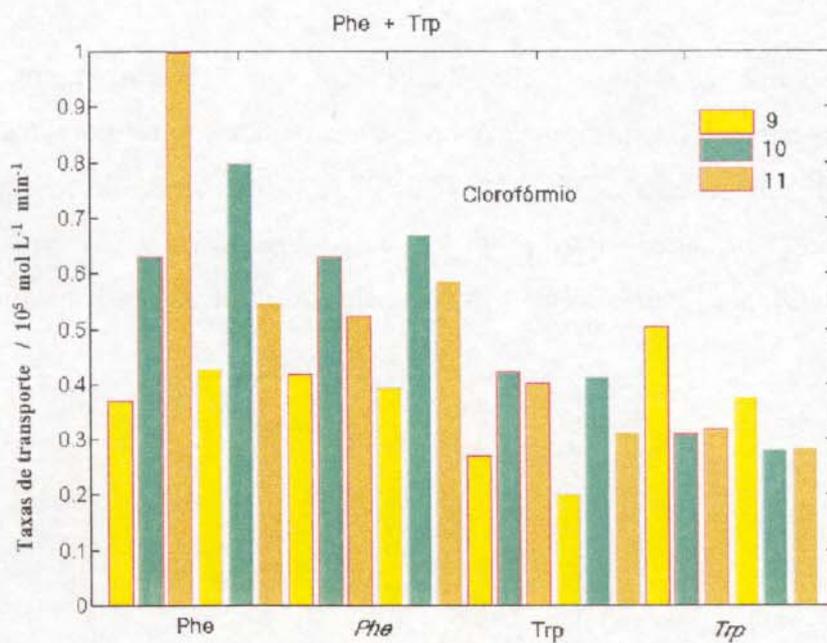


Figura 36: Transporte individual e simultâneo de Phe e Trp

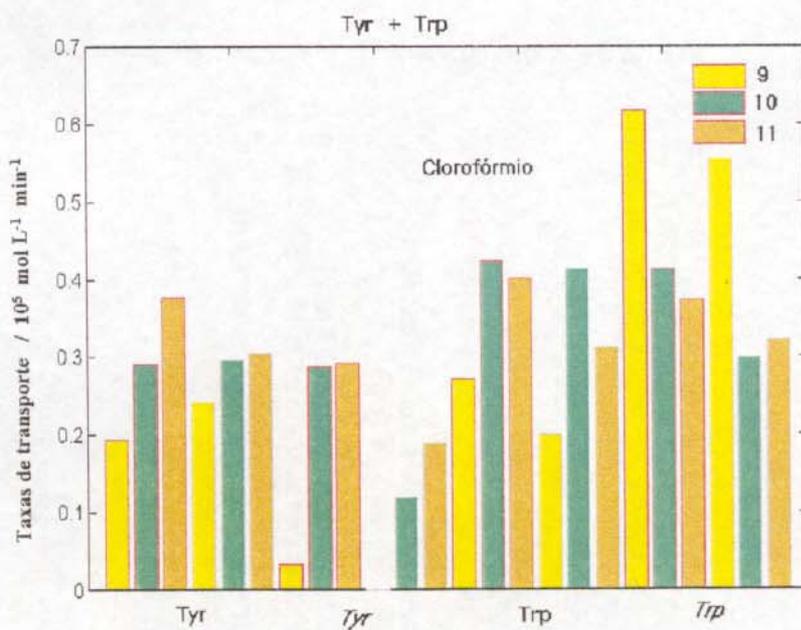


Figura 37: Transporte individual e simultâneo de Tyr e Trp

Como anteriormente (caso dos nitrofenolatos), nestas Figuras o que está em **negrito** se refere à taxa de um dos compostos calculada no caso de se usar como fase fonte uma mistura binária com o outro composto que aparece no mesmo gráfico. Os resultados calculados para as membranas de diclorometano são apresentados no Apêndice IX, mas a tendência dos resultados é a mesma nos dois casos.

Tabela 33: Resultados dos experimentos de transporte com aminoácidos

Taxas de transporte $\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$							
# Exp	Phe	Tyr	Trp	# Exp	Phe	Tyr	Trp
1	0,3696			37	0,7566	0,1251	
2	0,6312			38	0,7442	0,2327	
3	0,9987			39	0,9479	0,2784	
4	0,4264			40	0,5206	0,0606	
5	0,7987			41	0,8571	0,1878	
6	0,5470			42	0,5625	0,0007	
7		0,1946		43	0,4185		0,5030
8		0,2917		44	0,6300		0,3101
9		0,3761		45	0,5242		0,3180
10		0,2425		46	0,3945		0,3768
11		0,2982		47	0,6691		0,2812
12		0,3059		48	0,5863		0,2846
13			0,2712	49		0,0343	0,6171
14			0,4237	50		0,2870	0,4128
15			0,4016	51		0,2919	0,3736
16			0,2012	52		0,0021	0,5543
17			0,4143	53		0,1197	0,2983
18			0,3125	54		0,1890	0,3217
19	0,4320			55	0,6174	0,0684	
20	1,0460			56	1,1562	0,2751	
21	0,7640			57	1,0743	0,2103	
22	0,4080			58	1,2781	0,1277	
23	0,8470			59	1,0480	0,2674	
24	0,7320			60	0,6458	0,0041	
25		0,1090		61	0,2202		0,1121
26		0,2010		62	0,8504		0,2181
27		0,3990		63	0,6493		0,3105
28		0,3040		64	0,3991		0,3864
29		0,3152		65	0,8587		0,2763
30		0,3354		66	0,7070		0,1999
31			0,2845	67		0,0044	0,6291
32			0,2521	68		0,1510	0,3451
33			0,1750	69		0,1302	0,3327
34			0,3784	70		0,0052	0,4051
35			0,4504	71		0,1988	0,3642
36			0,4986	72		0,0596	0,2447

Dos três compostos em estudo a Phe e o Trp são os mais hidrofóbicos. Assim verificamos maiores taxas de transporte para estes compostos, o que pode ser justificado pelo fato deles não permanecerem solubilizados preferencialmente no microambiente aquoso da micela reversa, mas sim na monocamada de surfatante (mais moléculas sendo levadas de cada vez, por ser maior a área da interface), com a cabeça polar solvatada no interior da micela.

Com isso, verifica-se o transporte mais rápido destes aminoácidos em relação à Tyr, que fica preferencialmente no ambiente aquoso (fase fonte), o que concorda com a ordem em que estes compostos aparecem na escala de hidropatia de Kyte [114]. A escala de hidropatia combina hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, e pode ser usada para prever quais aminoácidos serão encontrados na fase aquosa (os que tiverem valores negativos nesta escala) e quais deverão estar num ambiente hidrofóbico (os de valores positivos). Os valores deste parâmetro para os três aminoácidos empregados são [114]: Phe (2,8) > Trp (-0,9) > Tyr (-1,3).

No caso do Trp, sua hidropatia é menor que a da Phe, o mesmo ocorrendo com sua taxa de transporte; o Trp permanece não totalmente no interior da monocamada de surfatante como a Phe mas também não se encontra totalmente solubilizado no interior na micela como a pequena quantidade de Tyr que é solubilizada na interface e consegue entrar no microambiente aquoso (interior da micela).

O comportamento dos três aminoácidos na interface membrana / fase de recebimento (pH alcalino) é o mesmo: ocorre a repulsão eletrostática entre o aminoácido na fase de recebimento e o carregador (AOT) devido à regeneração do grupo amino e ao aparecimento de carga negativa na carboxila.

Em clorofórmio há uma tendência de diminuir a diferença entre as taxas de Tyr e Trp conforme se aumenta o pH da fase de recebimento; na verdade esta diferença praticamente não mais existe se o pH desta fase é 11. Usando diclorometano o comportamento das taxas em geral é muito semelhante e estas são ligeiramente mais elevadas na maioria dos casos estudados. Todas as conclusões desta etapa estão baseadas, mais uma vez, nos resultados obtidos via OLS, semelhantes aos obtidos via PLS. Nas misturas com tirosina e triptofano o comportamento geral é de diminuição da taxa de transporte da tirosina, se comparada às taxas dos experimentos contendo apenas este aminoácido. No caso do triptofano observa-se a tendência de aumentar a taxa de transporte na presença da tirosina apenas quando o pH é 9, mantendo-se quase inalterada nos demais valores de pH.

Utilizando um surfatante aniônico como o AOT, é necessário manter a fase fonte em pH abaixo do valor de pK_{a1} dos aminoácidos, para que seja possível a interação eletrostática entre a espécie ionizada e a parte polar do surfatante [114]. O pH da solução afeta a solubilização dos aminoácidos por modificar a distribuição de carga na sua superfície. Em pH's abaixo dos valores do ponto isoeletrico (pI) (em outras palavras, pH no qual o aminoácido está em sua forma zwitteriônica) estes compostos apresentam carga líquida positiva, enquanto que acima deste ponto a carga será negativa [114,115].

Nos experimentos com transporte simultâneo verifica-se que as taxas para a fenilalanina são maiores quando a tirosina está presente, enquanto que para a tirosina o efeito é o inverso. Em geral foi verificado que o pH da fase fonte não foi significativo para a determinação da ordem das taxas de transporte, provavelmente pelo fato de todos eles se encontrarem acima do segundo pK dos aminoácidos estudados, de maneira que em todos os casos havia ionização do grupo $-OH$ (para a tirosina apenas não foi totalmente ionizado o grupo $-OH$ da cadeia lateral, cujo pK é cerca de 10,19) [28].

Não se observam grandes variações nas taxas de fenilalanina nos experimentos contendo também triptofano na fase fonte, uma vez que cada um deles é transportado numa região diferente da micela reversa, como já discutido. Para o triptofano foram observados comportamentos um tanto variados, dependendo do pH e do solvente, mas tais variações provavelmente são devidas apenas à instabilidade do sistema empregado para o transporte (isto será melhor discutido logo abaixo).

Como foi verificado, a tirosina sempre tem sua taxa de transporte reduzida na presença de outros aminoácidos. Apesar de estar sendo levada numa região diferente (preferencialmente na fase aquosa central) dos demais compostos ela pode formar dímeros em meio aquoso, o que reduz sua disponibilidade para o transporte por se tornar mais insolúvel em água [116]. O triptofano e a fenilalanina, que têm resíduos hidrofóbicos, são mais facilmente extraídos para a fase orgânica [116]. A tirosina, na verdade, é extremamente insolúvel em água (apesar de apresentar menor hidropatia) devido à formação de dímeros. Como é essencial que exista a solubilização dos aminoácidos para que ocorra o transporte fica claro que a tirosina deve realmente ter taxas de transporte extremamente baixas se comparadas aos demais aminoácidos [116].

Para explicar o motivo do aumento das taxas de transporte da fenilalanina e de triptofano quando há tirosina presente, pode-se pensar em termos de força iônica (potencial químico). Se a tirosina está presente na fase fonte, o potencial químico desta fase é mais elevado do que se houvesse apenas a fenilalanina, por exemplo. Assim cria-se um gradiente de potencial mais elevado, que facilita a passagem do aminoácido que tiver mais condições para entrar nas micelas reversas (que serão a fenilalanina e o triptofano).

B2: Transporte de aminoácidos calculadas por TLD

As taxas de transporte obtidas via OLS e TLD (resultados dos experimentos da Tabela 7 - parte experimental, página 54) são mostrados nas Tabelas 34 e 35.

Tabela 34: Taxas de transporte de aminoácidos calculadas via OLS

	Phe ($\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Tyr ($\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Trp ($\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
Mistura #	OLS		
1	0,48	0,05	---
2	0,36	0,05	---
3	0,98	0,11	---
4	0,99	0,09	---
5	0,73	0,05	0,31
6	0,92	---	0,22
7	0,90	---	0,22
8	0,85	0,05	0,38
9	0,61	0,06	0,30

Tabela 35: Taxas de transporte de aminoácidos calculadas via TLD

	Phe ($\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Tyr ($\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Trp ($\times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
Misturas #	TLD		
6 7	1,06	---	0,22
5 8	1,93	0,00	0,16
5 9	1,06	0,01	0,12
5 8 9	1,09	0,01	0,13
5 6 7 8 9	1,40	0,00	0,27

Os resultados são ligeiramente diferentes entre si (OLS e TLD) o que pode ser atribuído ao tipo de carregador empregado. No estudo do transporte de potássio com os

nitrofenolatos o carregador, um éter coroa, tinha uma cavidade de tamanho bem definido e os resultados via OLS e TLD foram consistentes. No caso de aminoácidos, as micelas reversas têm tamanhos muito variados, segundo uma distribuição de Boltzmann e nas interfaces ocorre um processo dinâmico de formação e rompimento destas micelas. Sendo assim, é impossível haver um controle da distribuição de tamanhos das micelas e, se houver a disponibilidade maior de um dos aminoácidos, é possível que as micelas sejam maiores, de forma a acomodar as espécies a serem transportadas e os resultados sejam mais altos.

A decomposição de valores singulares foi novamente usada para determinar o número de fatores necessário para modelar o transporte através das membranas. Desta vez os resultados obtidos por justaposição das matrizes na horizontal e na vertical indicam que há um desvio da linearidade mais acentuado que no caso dos nitrofenolatos, de modo que os resultados do TLD são menos precisos neste estudo do que no problema anterior. No Apêndice II é mostrada uma rotina em linguagem MATLAB para fazer esta seleção de comprimentos de onda e intervalos de tempo. O que se procura é uma região onde os valores singulares do SVD para as matrizes justapostas na horizontal sejam o mais próximos possível dos valores encontrados com as matrizes justapostas verticalmente.

Como observado na Tabela 34, se Phe e Tyr estão juntas na fase fonte a taxa de transporte de Phe é 8,8 vezes maior que a da Tyr (Phe/Tyr=8,80; misturas 1 a 4); usando Trp ao invés de Tyr a razão (Phe/Trp) é menor, cerca de 2,12 (misturas 5 a 7).

Concluindo...

Através desta série de resultados pode-se concluir que a principal causa da solubilização dos aminoácidos na interface com AOT (a região onde estão as caudas apolares do surfatante) é o efeito hidrofóbico. O ganho entrópico com a remoção das cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos da água e sua imersão na interface apolar do AOT parece ser forte o suficiente para promover o processo de solubilização.

A presença de regiões polares nas cadeias laterais dos aminoácidos que possam aumentar a afinidade do soluto pela água, através da formação de pontes de hidrogênio, reduz significativamente o coeficiente de partição interfacial. A ligação de hidrogênio entre soluto e

água se opõe à solubilização interfacial e tem influência na oposição ao efeito hidrofóbico [115].

Por fim, é preciso destacar que usando os aminoácidos é esperado que ocorra uma flutuação nos resultados, uma vez que o processo tem algumas variáveis que não podem ser bem controladas: nas interfaces fase fonte / membrana e membrana / recebimento ocorre um processo dinâmico de formação / rompimento de micelas reversas e não é possível saber qual é a taxa com que estes processos acontecem. Nestes experimentos foi tomado muito cuidado no controle da temperatura. Além disso, os tamanhos das micelas reversas seguem uma distribuição de Boltzmann, como dito anteriormente, possibilitando a entrada de maior ou menor quantidade de espécies dependendo do tamanho das micelas.

B3: Experimentos com TOMAC

Foi estudada a possibilidade da aplicação de um surfatante catiônico, o cloreto de trioctilmetilamônio, TOMAC, como carregador para o transporte de aminoácidos através de membranas líquidas. Neste caso a fase fonte foi mantida com pH alcalino a fim de criar cargas negativas nos aminoácidos, uma vez que as micelas reversas estarão carregadas positivamente.

Com a utilização de surfatantes catiônicos é necessário manter na fase de recebimento uma concentração adequada de um sal. O gradiente de íons cloreto entre a fase de recebimento e a fase fonte é a força – motriz da transferência neste sistema [116].

A Figura 38 mostra o mecanismo do transporte com o TOMAC ou com o DODAC.

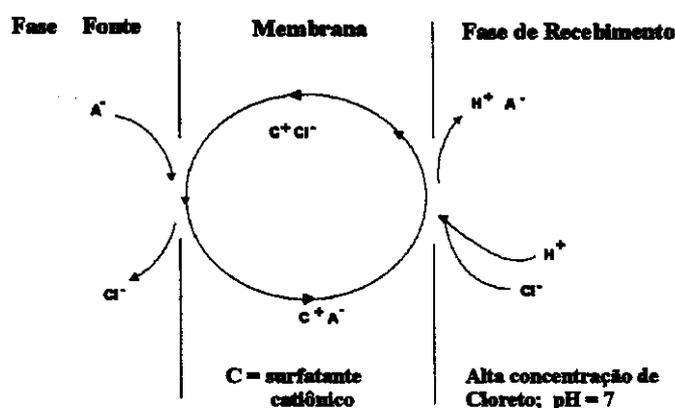


Figura 38: Mecanismo de transporte (antiporte) com surfatantes catiônicos

Apesar de terem sido feitos experimentos mantendo o pH da fase fonte em valores altos (maiores que pK_{a2} de todos os aminoácidos) e uma concentração de cloreto entre 0,5 e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ na fase de recebimento não foi observado transporte significativo em nenhum dos casos, especialmente para a tirosina. Os espectros da fase de recebimento para estes compostos foram semelhantes a ruídos instrumentais, o que levou à sua exclusão do conjunto a ser analisado. Os demais experimentos, com Phe e Trp apresentaram valores muito baixos de absorvância na fase receptora, o que causou muita instabilidade nos cálculos das concentrações e conseqüentemente muitos erros na determinação das taxas de transporte. Apenas para finalizar, vale a pena ressaltar que as micelas de TOMAC são muito pequenas.

B4: Experimentos com DODAC

O mecanismo de transporte no caso deste surfatante é idêntico ao mostrado para o TOMAC. As taxas de transporte calculadas via OLS para os experimentos indicados na Tabela 10 (parte experimental, pág. 58) são mostradas na Tabela 36.

Tabela 36: Resultados dos transportes com micelas reversas de DODAC

[DODAC] ($\times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)	Aminoácido	pH fase fonte	Taxa de transporte $\times 10^6 \text{ mol.L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
50	Trp	11,0	10,10
50	Phe	11,0	4,75
50	Trp	9,0	9,52
50	Phe	9,0	3,13
50	Tyr	9,0	0,95
30	Trp	9,0	7,52
30	Phe	9,0	4,48
15	Trp	9,0	6,13
15	Phe	9,0	2,22
50	Trp	8,0	2,70
50	Phe	8,0	1,03

A fase de recebimento, a exemplo dos estudos com TOMAC, foi constituída de uma solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl.

Das Figuras 39 e 40 pode-se verificar que há uma dependência linear entre a quantidade de surfatante utilizada e a taxa de transporte calculada para Trp e Phe, na faixa

entre 15 e $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de DODAC. Os valores para o Trp foram maiores que os para Phe, ao contrário do caso dos transportes com AOT.

Como era esperado observa-se uma forte queda nas taxas quando o pH inicial fica abaixo do pK do grupo amino, por causa da maior quantidade de cargas positivas no aminoácido. Acima de pH 9 o comportamento é praticamente constante, o que de certa forma concorda com os dados anteriores (para AOT). A diferença notada é que aqui o comportamento é bem mais linear.

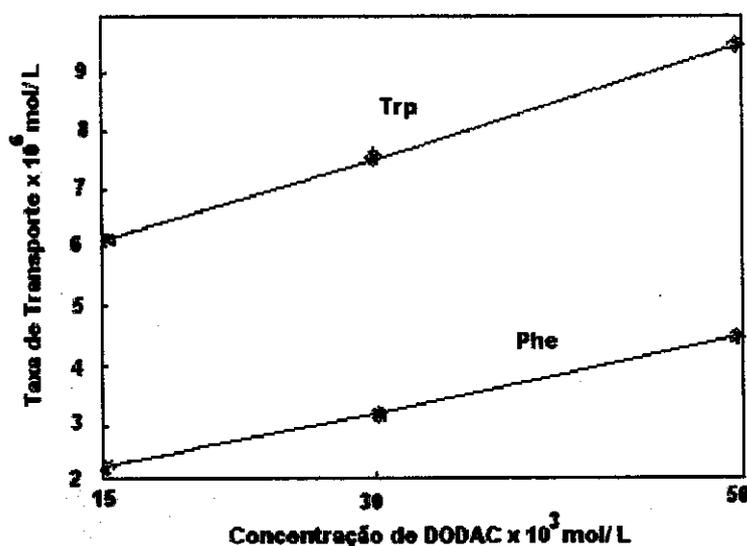


Figura 39: Efeito da concentração de surfatante sobre as taxas de transporte de Phe e Trp

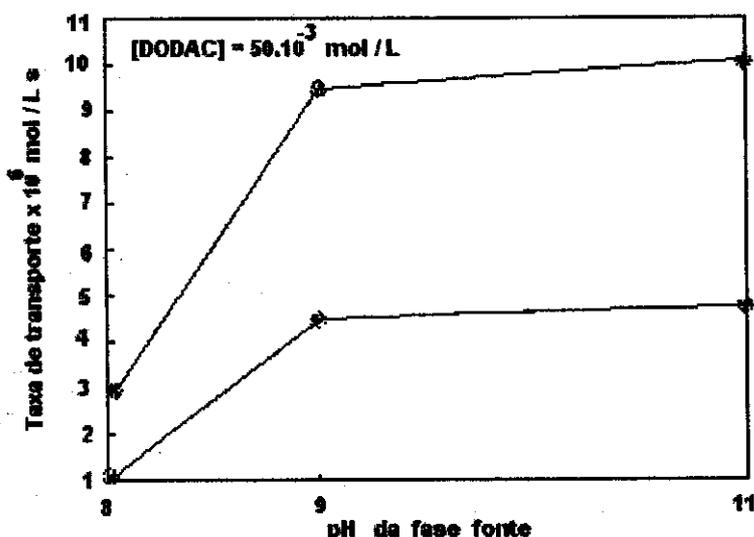


Figura 40: Efeito do pH da fase fonte sobre a taxa de transporte de Phe e Trp

PARTE C

Ácido fenilborônico (AFB) como carregador: o transporte de vitaminas

O transporte das vitaminas C e B₂ através de uma membrana, mediado por ácido fenilborônico, ocorre segundo o mecanismo mostrado na Figura 41.

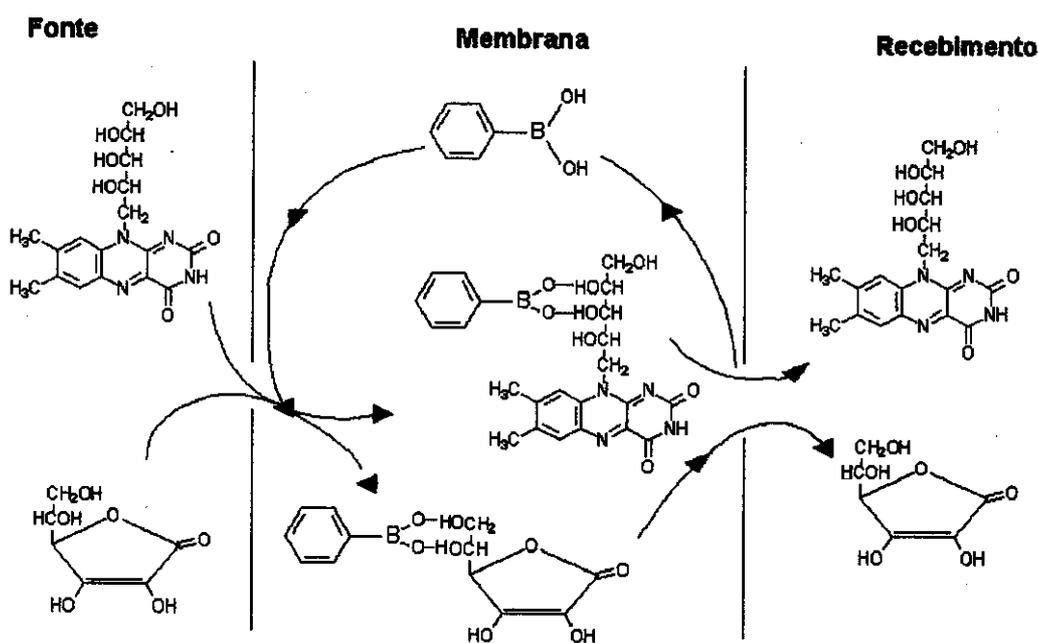


Figura 41: Mecanismo (simporte) do transporte de vitaminas

Na interface fase fonte / membrana líquida o ácido fenilborônico forma um complexo com a vitamina, através da interação de suas duas hidroxilas com grupos dióis vicinais da vitamina [117,118]. Em alguns casos pode haver complexação também com compostos que tenham grupos dióis 1,3.

Foi feita uma investigação sobre a influência de cinco fatores (concentração de carregador na membrana, temperatura, concentração inicial de vitamina C, presença de glutatona na fase de recebimento e tipo de solvente) sobre a taxa de transporte do ácido ascórbico através de membranas líquidas.

Para tentar viabilizar a utilização de uma solução de vitamina C durante pelo menos dez horas foi feito um estudo prévio, que seria um período suficiente para que se pudesse utilizar à tarde uma solução preparada pela manhã. Após vários experimentos, a estabilização desejada

foi conseguida com a proporção molar 1:1 entre a glutathiona reduzida e o ácido ascórbico. O monitoramento no comprimento de onda de máxima absorvância da vitamina C (264 nm) de uma solução $1,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ deste composto, com e sem glutathiona demonstra a estabilização obtida, conforme mostrado nas Figuras 42a e 42b.

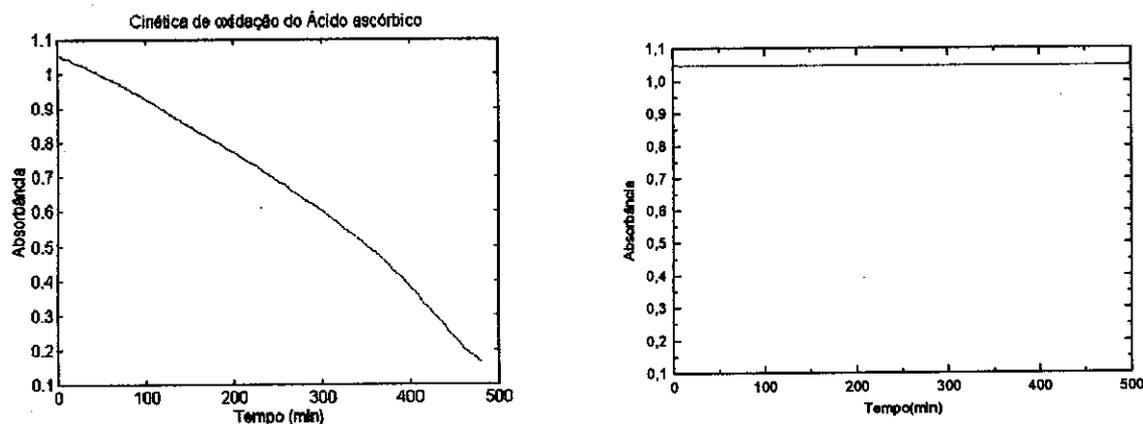


Figura 42: a) Decomposição da vitamina C sem glutathiona; b) idem, com glutathiona

Vale ressaltar que a proporção glutathiona: vitamina C nos experimentos de transporte foi maior que 1:1 em todos os casos.

A oxidação do Ácido Ascórbico é irreversível e ocorre em solução aquosa devido à presença de oxigênio dissolvido; outros fatores que afetam a oxidação são o pH e a temperatura.

Para avaliar o efeito de um determinado fator sobre uma resposta experimental é necessário que ele seja variado, observando-se os resultados. Para isso são necessários experimentos com este fator em pelo menos dois níveis, o que dá origem aos planejamentos mais simples, que são aqueles onde todas as variáveis (fatores) são estudadas em apenas dois níveis (alto, representado por + e baixo, representado por -). Havendo k fatores o planejamento será chamado de *planejamento fatorial 2^k* .

Os planejamentos fatoriais de dois níveis são de grande utilidade em estudos preliminares, quando apenas se quer saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta experimental, sem uma descrição muito detalhada desta influência. Se for necessário conhecer melhor a relação existente entre fatores e resposta pode-se expandir estes planejamentos e formar outro, mais sofisticado. Quando existem muitas variáveis a serem

avaliadas é mais conveniente usar um planejamento fatorial fracionário, que não será discutido aqui [119,120].

C 1: Transporte de vitamina C

Com os resultados dos experimentos de transporte foram calculadas, via OLS, as taxas para a vitamina C nos 32 experimentos. Tais valores foram os dados de entrada para o programa FATORIAL, que foi usado para calcular os efeitos neste estudo. As respostas experimentais e os valores dos efeitos são dados abaixo; a descrição completa do planejamento 2^5 é dada no Apêndice X.

*** VALORES DAS RESPOSTAS PARA OS ENSAIOS ESPECIFICADOS.....:

(1)	=	.1975	e	=	.2031
a	=	.2645	ae	=	.3572
b	=	.1910	be	=	.1503
ab	=	.1957	abe	=	.3691
c	=	.1855	ce	=	.1583
ac	=	.3707	ace	=	.3565
bc	=	.1242	bce	=	.2292
abc	=	.2729	abce	=	.3462
d	=	.1611	de	=	.6295
ad	=	.2852	ade	=	.2992
bd	=	.1139	bde	=	.5280
abd	=	.2284	abde	=	.2332
cd	=	.1489	cde	=	.5719
acd	=	.2247	acde	=	.3027
bcd	=	.1263	bcde	=	.4788
abcd	=	.1511	abcde	=	.2216

Faz-se necessário citar aqui que para efeitos de inclusão no programa os valores das taxas de transporte da vitamina C (as respostas do fatorial) foram multiplicadas por $1,0 \cdot 10^6$.

Para o cálculo dos efeitos o que se faz é uma média dos valores das respostas, considerando o sinal algébrico segundo o planejamento (veja o Apêndice X para a explicação completa do procedimento).

Nos planejamentos fatoriais o termo *efeito* é o fator de variação de uma resposta quando as condições experimentais são alteradas do nível baixo para o alto em cada variável.

Os primeiros resultados conseguidos com o FATORIAL foram os seguintes:

ESTIMATIVA DOS EFEITOS:

I	=	.2711	E	=	.1371
A	=	.0176	AE	=	-.0755
B	=	-.0473	BE	=	.0070
AB	=	-.0080	ABE	=	.0119
C	=	-.0086	CE	=	-.0045
AC	=	.0103	ACE	=	-.0052
BC	=	.0012	BCE	=	.0107
ABC	=	-.0116	ABCE	=	-.0096
D	=	.0458	DE	=	.0911
AD	=	-.1191	ADE	=	-.1108
BD	=	-.0205	BDE	=	-.0247
ABD	=	.0064	ABDE	=	.0016
CD	=	-.0230	CDE	=	.0073
ACD	=	-.0152	ACDE	=	.0348
BCD	=	-.0010	BCDE	=	-.0125
ABCD	=	.0035	ABCDE	=	.0119

No caso de planejamentos do tipo 2^k o número de efeitos principais e de interações de ordem superior é facilmente visto com um triângulo de Pascal:

Fatores (k)	1
2	1 2 1
3	1 3 3 1
4	1 4 6 4 1
5	1 5 10 10 5 1
6	1 6 15 20 15 6 1

Será necessário fazer algumas suposições a fim de calcular o erro dos valores encontrados, uma vez que não foram feitas duplicatas.

Um planejamento com 5 fatores (como o do caso em questão), tem 5 efeitos principais, 10 interações de dois fatores, 10 interações de três fatores, 5 interações de quarta ordem e uma interação de quinta ordem. Admitindo que pequenas variações nos fatores não causem variações bruscas na resposta, ou seja, admitindo que a superfície de resposta é relativamente suave na região que está sendo estudada, espera-se que os coeficientes do modelo obedeçam a uma certa hierarquia, de maneira que os termos de ordem menor sejam mais importantes que os de alta ordem; isto quer dizer, exatamente, que os efeitos principais devem ser mais

importantes na formulação do modelo do que uma interação de quarta ou quinta ordem, por exemplo [120].

Em geral é esperado que a importância de uma interação para um modelo decresça à medida que o número de fatores envolvidos aumenta, pois caso contrário não seria possível obter um modelo satisfatório para a superfície de resposta com um número finito de termos [120].

No estudo com a vitamina C serão considerados importantes apenas os efeitos principais, de segunda e de terceira ordem; os outros seis (cinco de quarta e um de quinta ordem) serão atribuídos a flutuações aleatórias características do processo de transporte, ou em outras palavras, ao ruído contido nas respostas do planejamento. Ao elevar ao quadrado cada uma destas interações de ordem mais alta é obtida uma estimativa da variância de um efeito. Fazendo uma média dos seis valores encontra-se uma estimativa conjunta, com cinco graus de liberdade (porque os valores são independentes). Assim:

$$\hat{V}(\text{efeito}) = \frac{[(ABDC)^2 + (ABCE)^2 + (ABDE)^2 + (ACDE)^2 + (BCDE)^2 + (ABCDE)^2]}{6}$$

$$\hat{V}(\text{efeito}) = \frac{[(0,0035)^2 + (-0,0096)^2 + (0,0016)^2 + (0,0348)^2 + (-0,0125)^2 + (0,0119)^2]}{6}$$

$$\hat{V}(\text{efeito}) = 0,000269$$

Tirando a raiz quadrada obtém-se a estimativa do erro padrão de um efeito, s :

$$s \cong 0,0164$$

Para tentar diferenciar o que é ruído nos resultados do planejamento, separando-os do que realmente é um efeito, pode ser feita a análise por meio de gráficos normais. No Apêndice XI encontram-se mais informações sobre a construção destes gráficos.

Examinando o gráfico normal das estimativas, obtido com o programa FATORIAL (Figura 43), pode-se observar que os pontos centrais estão melhor ajustados a uma reta cuja interseção com a probabilidade acumulada de 50% ocorre praticamente sobre o ponto zero do eixo das abscissas; isto significa que tais pontos vieram de uma população normal com média zero e não representam nenhum efeito significativo. Os demais pontos, sendo muito afastados da reta, devem ser provenientes de uma distribuição diferente daquela dos pontos centrais;

quanto mais afastados estiverem estes pontos, mais significativos serão os efeitos que eles representam [120]. É muito importante ressaltar que *nem todas as estimativas* estão colocadas na Figura 43, que foi obtida diretamente do programa FATORIAL, de modo que não foi possível colocar a identificação de cada uma neste gráfico.

Para decidir se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero foi empregado um teste t (Student). No nível de 95% de confiança o valor de t corresponde a 2,447 [119]. Como o valor do erro padrão de um efeito foi calculado como sendo $s = 0,0164$ somente consideram-se significativos os efeitos cujo valor seja maior que $2,447 * 0,0164$, ou seja, os valores maiores que 0,0401. Assim, continuando com o FATORIAL,

*** ESPECIFIQUE OS EFEITOS QUE DEVEM SER INCLUIDOS NA MODELAGEM DA RESPOSTA:

I	=	.2711	ZERAR ? [S/N] n
A	=	.0088	ZERAR ? [S/N] s
B	=	-.0436	ZERAR ? [S/N] n
AB	=	-.0040	ZERAR ? [S/N] s
C	=	-.0043	ZERAR ? [S/N] s
AC	=	.0052	ZERAR ? [S/N] s
BC	=	.0006	ZERAR ? [S/N] s
ABC	=	-.0058	ZERAR ? [S/N] s
D	=	.0429	ZERAR ? [S/N] n
AD	=	-.0596	ZERAR ? [S/N] n
BD	=	-.0102	ZERAR ? [S/N] s
ABD	=	.0032	ZERAR ? [S/N] s
CD	=	-.0115	ZERAR ? [S/N] s
ACD	=	-.0076	ZERAR ? [S/N] s
BCD	=	-.0005	ZERAR ? [S/N] s
ABCD	=	.0017	ZERAR ? [S/N] s
E	=	.0685	ZERAR ? [S/N] n
AE	=	-.0408	ZERAR ? [S/N] n
BE	=	.0035	ZERAR ? [S/N] s
ABE	=	.0059	ZERAR ? [S/N] s
CE	=	-.0022	ZERAR ? [S/N] s
ACE	=	-.0026	ZERAR ? [S/N] s
BCE	=	.0053	ZERAR ? [S/N] s
ABCE	=	-.0048	ZERAR ? [S/N] s
DE	=	.0455	ZERAR ? [S/N] n
ADE	=	-.0554	ZERAR ? [S/N] n
BDE	=	-.0124	ZERAR ? [S/N] s
ABDE	=	.0008	ZERAR ? [S/N] s
CDE	=	.0037	ZERAR ? [S/N] s
ACDE	=	.0174	ZERAR ? [S/N] s
BCDE	=	-.0062	ZERAR ? [S/N] s
ABCDE	=	.0059	ZERAR ? [S/N] s

Um modelo bem ajustado deve ser capaz de representar toda a informação sistemática dos dados, restando a parte aleatória para os resíduos. Fazendo um gráfico normal dos resíduos deve-se encontrar uma reta que passe pelo ponto $(x, P) = (0, 50)$, ou seja, os resíduos não devem ser significativos (a idéia aqui é a mesma usada para determinar quais são os efeitos significativos, usando um gráfico normal, como descrito anteriormente).

Ainda sobre os resíduos é importante ressaltar que o gráfico destes valores contra as respostas previstas por um modelo deve ter a aparência mais aleatória possível; isto vai indicar que não há nenhuma espécie de tendência no ajuste, que seria causada pela inclusão dos erros não-sistemáticos na modelagem.

VALORES DOS EFEITOS QUE SERAO INCLUIDOS NA MODELAGEM:

I	=	.2711	E	=	.0685
A	=	.0000	AE	=	-.0408
B	=	-.0436	BE	=	.0000
AB	=	.0000	ABE	=	.0000
C	=	.0000	CE	=	.0000
AC	=	.0000	ACE	=	.0000
BC	=	.0000	BCE	=	.0000
ABC	=	.0000	ABCE	=	.0000
D	=	.0429	DE	=	.0455
AD	=	-.0596	ADE	=	-.0554
BD	=	.0000	BDE	=	.0000
ABD	=	.0000	ABDE	=	.0000
CD	=	.0000	CDE	=	.0000
ACD	=	.0000	ACDE	=	.0000
BCD	=	.0000	BCDE	=	.0000
ABCD	=	.0000	ABCDE	=	.0000

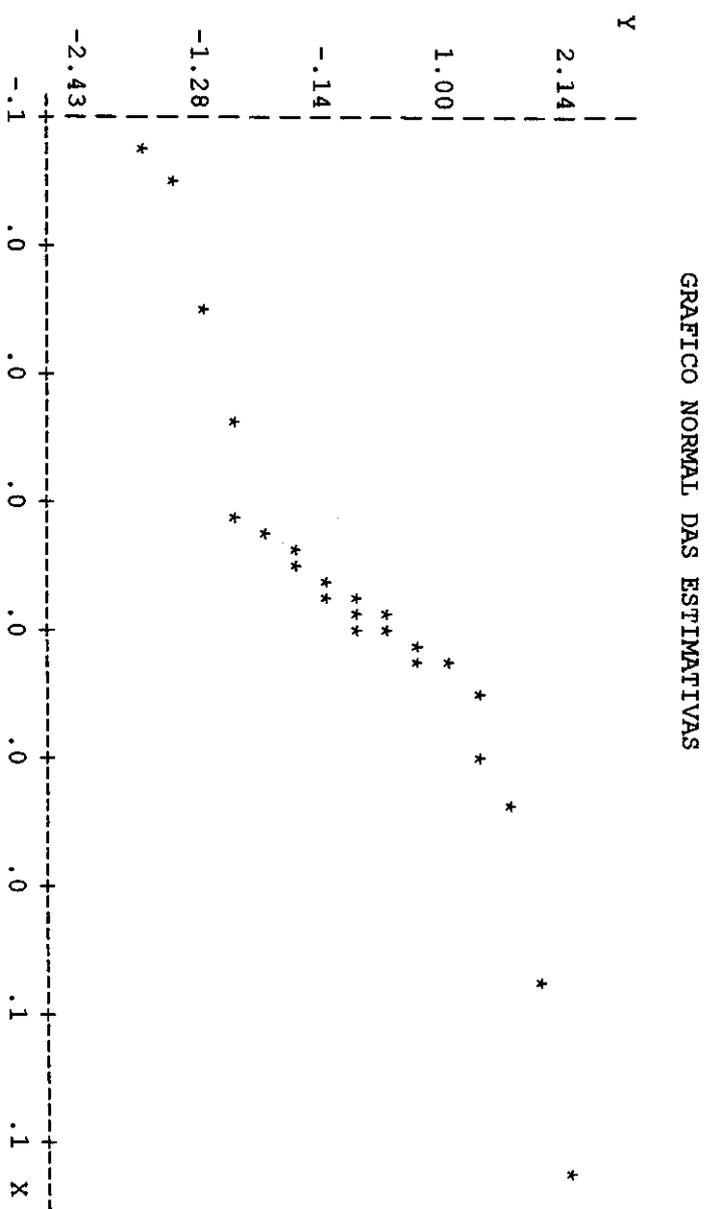


Figura 43: Gráfico normal das estimativas (programa FATORIAL)

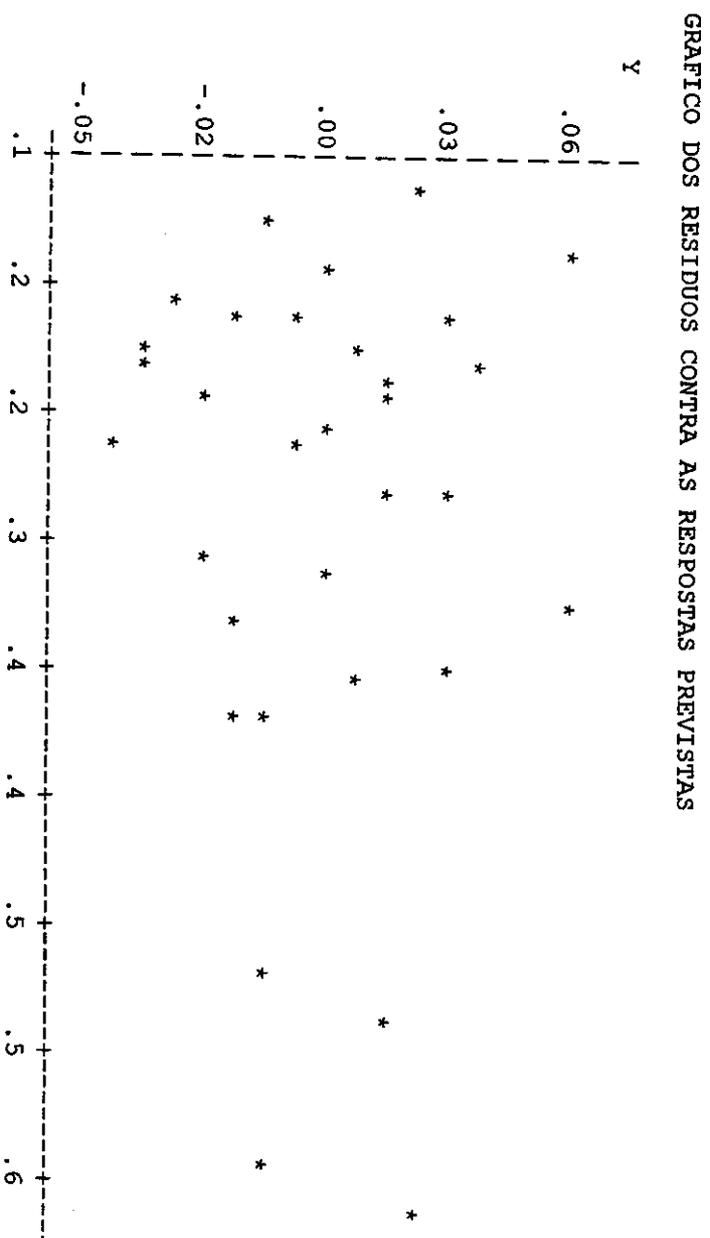


Figura 44: Gráfico dos resíduos vs. respostas previstas (programa FATORIAL)

GRAFICO NORMAL DOS RESIDUOS

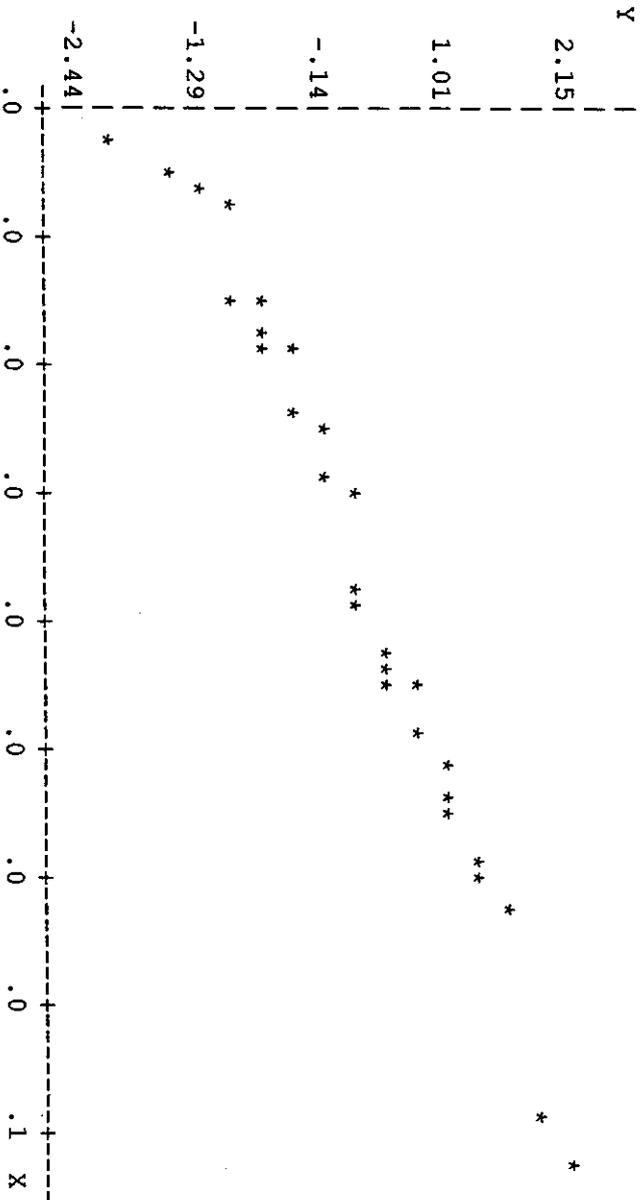


Figura 45: Gráfico normal dos resíduos (programa FATORIAL)

Tendo incluído somente os efeitos B, D, AD, E, AE, DE, ADE e a média (I), os resultados obtidos foram os seguintes:

RESULTADOS DA MODELAGEM

ENSAIO	RESPOSTA	RESPOSTA PREVISTA	RESIDUO
(1)	.1975	.2070	-.0095
a	.2645	.2908	-.0263
b	.1910	.1597	.0313
ab	.1957	.2435	-.0478
c	.1855	.2070	-.0215
ac	.3707	.2908	.0799
bc	.1242	.1597	-.0355
abc	.2729	.2435	.0294
d	.1611	.1700	-.0089
ad	.2852	.2372	.0480
bd	.1139	.1227	-.0088
abd	.2284	.1899	.0385
cd	.1489	.1700	-.0211
acd	.2247	.2372	-.0125
bcd	.1263	.1227	.0036
abcd	.1511	.1899	-.0388
e	.2031	.2177	-.0146
ae	.3572	.3721	-.0149
be	.1503	.1704	-.0201
abe	.3691	.3248	.0443
ce	.1583	.2177	-.0594
ace	.3565	.3721	-.0156
bce	.2292	.1704	.0588
abce	.3462	.3248	.0214
de	.6295	.5845	.0450
ade	.2992	.2790	.0202
bde	.5280	.5372	-.0092
abde	.2332	.2317	.0015
cde	.5719	.5845	-.0126
acde	.3027	.2790	.0237
bcde	.4788	.5372	-.0584
abcde	.2216	.2317	-.0101

O gráfico de resíduos contra respostas previstas (Figura 44) também se apresenta bastante aleatório, validando o modelo ajustado. Na Figura 45 foi mostrado o gráfico normal dos resíduos e pode-se observar que todos eles estão satisfatoriamente sobre uma reta, indicando bom ajuste do modelo.

A observação dos valores absolutos dos efeitos incluídos na modelagem indica que os mais significativos foram os seguintes:

Ordem	Efeito	Variáveis	Sinal algébrico
1 ^o	E	Solvente	+
2 ^o	AD	[AFB] + Glutaciona	-
3 ^o	ADE	[AFB] + Glutaciona + Solvente	-
4 ^o	DE	Glutaciona + Solvente	+
5 ^o	B	Temperatura	-
6 ^o	D	Glutaciona	+
7 ^o	AE	[AFB] + Solvente	-

A atribuição dos sinais positivos e negativos para cada nível de cada variável (ver Tabela no apêndice X) é arbitrária. Para variáveis quantitativas é normal que se atribua o valor mais alto para o nível +; com as qualitativas observa-se a arbitrariedade (por exemplo, a atribuição de nível alto para a *presença* de glutaciona na fase de recebimento é aleatória; a *ausência* poderia ter sido o nível superior). Ao inverter os níveis (trocar as definições de nível alto e de nível baixo entre si) os sinais no resultado final também são invertidos, sem no entanto causar nenhuma diferença em termos de interpretação.

Um efeito positivo para uma variável (o solvente, por exemplo) significa que ao trocar o diclorometano (definido como nível inferior) pelo clorofórmio (definido como superior) é conseguido um aumento na taxa de transporte da vitamina C através da membrana.

Observa-se que o efeito teria sido negativo se o clorofórmio fosse definido como nível inferior; note que neste caso ao passar do nível inferior (CHCl₃) para o superior (CH₂Cl₂) seria encontrada uma diminuição da taxa de transporte. A conclusão seria, então, a mesma encontrada anteriormente.

Dos resultados apresentados pode-se concluir que o passo seguinte à realização desta “triagem” inicial de variáveis deve ser a investigação mais detalhada dos efeitos onde estejam envolvidas as variáveis solvente (E), concentração de ácido fenilborônico (A), temperatura (B) e presença ou não de glutaciona na fase de recebimento (D), já que estes efeitos e suas interações foram os mais significativos.

A vitamina C é solúvel em água (portanto em solventes polares). Em uma situação na qual houvesse somente um compartimento aquoso contendo vitamina C em contato com outro compartimento contendo clorofórmio não seria observada uma extração da vitamina para o solvente orgânico. Entretanto, caso este segundo compartimento contivesse diclorometano, a

extração seria mais fácil. Isto ocorre porque, sendo solúvel em solventes polares, quanto maior for a constante dielétrica da membrana, mais facilmente haverá a extração da vitamina para esta fase.

No entanto, com a presença do AFB na membrana, o caráter hidrofóbico / hidrofílico do complexo AFB-vitamina formado é diferente do das vitaminas isoladas. Seria esperado que o transporte do ácido ascórbico mediado pelo AFB fosse mais eficiente na membrana líquida de diclorometano, o que não ocorre exatamente devido a esta alteração deste caráter hidrofóbico / hidrofílico. Os resultados deste planejamento mostraram que há um favorecimento do transporte quando o solvente é trocado de diclorometano para clorofórmio.

Para o caso da vitamina C, os valores de entalpia de solubilização em água e de complexação com AFB em água são, respectivamente, $\Delta H_{sol}^{\circ} = 22,461 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta H_{complex}^{\circ} = 22,365 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Tais valores foram obtidos, em quintuplicata, através da calorimetria de quebra de ampolas e mostram que o processo de complexação é entropicamente dirigido. Assim, nota-se que o processo é endotérmico e os dois valores de entalpia são muito próximos, indicando a ausência de efeito entálpico.

Uma vez que sem a complexação não pode haver transporte da vitamina C nestas condições, uma prova indireta desta complexação é a detecção da vitamina na fase de recebimento. Como o processo de complexação deve ser espontâneo ($\Delta G < 0$) é a entropia que dirige o processo.

A interação [AFB] com glutathiona (AD) indica que ao aumentar a [AFB] e adicionar glutathiona na fase de recebimento ocorre uma diminuição na eficiência do processo de transporte. Este é um fato curioso, pois o esperado é que se aumente a taxa de transporte com o aumento da [AFB]. Por enquanto isto será deixado de lado pois, como será visto, o mesmo problema vai aparecer em alguns casos de transporte simultâneo de vitaminas B₂ e C. Este comportamento é reforçado pelos efeitos também negativos nas interações ADE ([AFB], glutathiona e solvente) e AE ([AFB] e solvente).

Analisando a interação DE observa-se que é mais conveniente usar glutathiona na fase de recebimento e clorofórmio como membrana, pois o efeito encontrado foi positivo (aumento na taxa de transporte medida). O processo de oxidação da vitamina C (de certa forma rápido) pode ser impedido com a utilização de glutathiona na forma reduzida, uma vez que ela possui um potencial de oxidação maior que o ácido ascórbico, evitando assim a oxidação da

vitamina. No caso de não se evitar este processo o monitoramento do transporte seria prejudicado porque haveria ácido dehidroascórbico (que não apresenta absorção na região UV – Vis) na fase de recebimento, dando a impressão de estar havendo menor transporte que o real.

O efeito da temperatura, sendo negativo, sugere que seria vantajoso diminuí-la de 25 para 15°C para favorecer o transporte. Entretanto, em alguns casos houve grande dificuldade para a estabilização deste parâmetro durante os experimentos. Muitas vezes foram feitas replicatas para evitar erros maiores mas ainda assim não se pode dizer que há confiabilidade neste resultado; na verdade é esperado um aumento do transporte se a temperatura é maior.

C 2: Estudos com misturas das vitaminas B₂ e C

O transporte simultâneo de vitaminas B₂ e C foi estudado utilizando o mesmo carregador, AFB. O objetivo desta etapa foi o de verificar a influência do solvente e da concentração de AFB na taxa de transporte das duas vitaminas em membranas de clorofórmio e diclorometano. Os experimentos foram feitos com concentrações de AFB variando de zero a $8,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em cada um dos solventes e em duplicata. Estes dados foram analisados em partes, usando planejamentos fatoriais 2² para descrever a influência de cada fator sobre as taxas de transporte usando diferentes concentrações de AFB.

Na Tabela 37 as respostas correspondem aos respectivos valores das taxas de transporte de cada vitamina, calculadas via OLS, como sempre tem sido feito.

Tabela 37: Dados experimentais (duplicatas) do transporte de vitaminas.

CONCENTRAÇÃO ($\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	RESPOSTAS							
	TAXA DE TRANSPORTE ($\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) $\times 10^{10}$							
[AFB]	B ₂ D		B ₂ C		CD		CC	
1	5,29	5,39	15,50	15,90	5,47	5,55	16,12	16,48
2	6,56	6,70	22,80	23,40	9,01	9,15	28,09	28,71
3	12,67	12,93	36,70	38,70	16,67	16,93	58,85	60,15
4	16,63	16,97	55,47	56,93	18,75	19,05	74,27	75,93
5	16,83	17,17	60,01	61,59	19,05	19,35	75,16	76,84
6	17,03	17,37	59,02	60,58	19,15	19,45	76,55	78,25
7	17,13	17,47	59,61	61,19	19,44	19,76	78,72	80,48
8	16,93	17,27	61,00	62,60	20,73	21,07	80,11	81,89

B₂D: vitamina B₂ em diclorometano; B₂C: vitamina B₂ em clorofórmio; CD: vitamina C em diclorometano; CC: vitamina C em clorofórmio

Os planejamentos 2^2 foram analisados usando os valores que aparecem na coluna RESPOSTAS (taxas de transporte) da Tabela 38.

Nesta Tabela aparecem os valores médios das taxas de transporte de cada vitamina em cada ensaio de cada planejamento fatorial (as respostas), a estimativa conjunta da variância em cada caso (s^2), o erro padrão de um efeito (s) e o valor a partir do qual deve ser considerado significativo um efeito ($t_4 \times s$).

Tabela 38: Planejamentos com as vitaminas

FATORES		RESPOSTAS ($\times 10^{10}$) mol L ⁻¹ s ⁻¹		S ² (est. Conjunta)		S (est. individual para um efeito)		s x t ₄		
	A	B	B ₂	C	B ₂	C	B ₂	C	B ₂	C
1	-	-	5,34	5,51	0,069	0,068	0,19	0,18	0,05	0,05
	+	-	6,63	9,08						
	-	+	15,70	16,30						
	+	+	23,10	28,40						
2	-	-	6,63	9,08	0,328	0,406	0,41	0,45	0,11	0,13
	+	-	16,80	18,90						
	-	+	23,10	28,40						
	+	+	56,20	75,10						
3	-	-	12,80	16,80	0,627	0,292	0,64	0,54	0,18	0,15
	+	-	17,20	19,30						
	-	+	38,20	59,50						
	+	+	59,80	77,40						
4	-	-	16,80	18,90	0,615	0,766	0,56	0,62	0,15	0,17
	+	-	17,10	20,90						
	-	+	56,20	75,10						
	+	+	61,80	81,00						
5	-	-	5,34	5,51	0,302	0,378	0,39	0,43	0,11	0,12
	+	-	16,80	18,90						
	-	+	15,70	16,30						
	+	+	56,20	75,10						
6	-	-	6,63	9,08	0,382	0,766	0,44	0,62	0,12	0,12
	+	-	17,10	20,90						
	-	+	23,10	28,40						
	+	+	61,80	81,00						

O valor de s^2 é calculado de uma forma um pouco diferente da que foi discutida no caso do planejamento 2^5 . Agora existem duplicatas de cada ensaio e como cada repetição é

autêntica e foi realizada em ordem aleatória, pode-se usar a variância de um par de valores como sendo uma estimativa da verdadeira variância devida aos erros aleatórios característicos dos experimentos. Foi admitido que todo o espaço experimental investigado tem a mesma variância populacional, sendo possível combinar as informações das repetições em todos os ensaios a fim de fazer uma estimativa com mais graus de liberdade.

Cada experimento foi realizado duas vezes, de modo que fornece uma estimativa com apenas *um grau* de liberdade. Foi feita a média ponderada de todas as estimativas (usando como pesos os próprios graus de liberdade) para obter a estimativa conjunta com *quatro graus* de liberdade, segundo a equação (16) [119]

$$s^2 = \frac{(v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_m s_m^2)}{(v_1 + v_2 + \dots + v_m)} \quad (16)$$

onde $v_i = n - 1$ é o número de graus de liberdade e s_i^2 é a estimativa da variância do i -ésimo ensaio.

De acordo com o indicado anteriormente, quando são calculados (via programa FATORIAL) os efeitos em cada caso, o que se faz é uma combinação linear de quatro valores médios de resposta (Apêndice X) com coeficientes a_i valendo $+1/2$ ou $-1/2$. Uma vez que os experimentos foram feitos em ordem aleatória e as repetições são autênticas, os valores encontrados são independentes e têm a mesma variância σ_y^2 . Aplicando a equação $\sigma_y^2 = \sum_i a_i^2 \sigma_i^2$ encontra-se a variância de um efeito. Assim:

$$\hat{V}(\text{efeito}) = \left(\frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \right) \sigma_y^2 = \sigma_y^2$$

Como cada valor médio de resposta é uma média de duas observações independentes,

$\sigma_y^2 = \frac{\sigma^2}{2}$ sendo σ^2 a variância de uma observação individual. Finalmente, usando a estimativa (s^2) ao invés da variância é estimado o erro padrão de um efeito:

$$s(\text{efeito}) = \left(\frac{\sigma^2}{2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Novamente é necessário decidir se os valores dos efeitos são significativamente diferentes de zero e o teste t é empregado. Agora temos quatro graus de liberdade e encontramos na literatura que o valores de t_4 para 95% de confiança é 2,776 [119]. Apenas para lembrar o que isso significa: somente serão considerados importantes os efeitos maiores que $t_4 \times s$, indicado na última coluna da Tabela 38.

Na Tabela 39 são indicados os valores dos efeitos principais e da interação binária em cada planejamento e para cada vitamina, incluindo-se os desvios-padrão (s).

Tabela 39: Dados dos planejamentos no estudo de transporte simultâneo de vitaminas

Planejamento	EFEITO $\times 10^{10}$			
	M	A	B	AB
Vitamina B₂				
1	1,27 \pm 0,09	0,44 \pm 0,19	1,34 \pm 0,19	0,31 \pm 0,19
2	2,57 \pm 0,21	2,16 \pm 0,41	2,79 \pm 0,41	1,15 \pm 0,41
3	3,20 \pm 0,32	1,30 \pm 0,64	3,40 \pm 0,64	0,86 \pm 0,64
4	3,80 \pm 0,28	0,29 \pm 0,56	4,20 \pm 0,56	0,26 \pm 0,56
5	2,35 \pm 0,20	2,59 \pm 0,39	2,48 \pm 0,39	1,46 \pm 0,39
6	2,71 \pm 0,22	2,46 \pm 0,44	3,05 \pm 0,44	1,41 \pm 0,44
Vitamina C				
1	1,48 \pm 0,09	0,78 \pm 0,18	1,50 \pm 0,18	0,43 \pm 0,18
2	3,29 \pm 0,23	2,83 \pm 0,45	3,77 \pm 0,45	1,84 \pm 0,45
3	4,32 \pm 0,27	1,02 \pm 0,54	5,04 \pm 0,54	0,77 \pm 0,54
4	4,90 \pm 0,31	0,40 \pm 0,62	5,82 \pm 0,62	0,19 \pm 0,62
5	2,90 \pm 0,23	3,61 \pm 0,43	3,35 \pm 0,43	2,27 \pm 0,43
6	3,48 \pm 0,31	3,22 \pm 0,62	3,97 \pm 0,62	2,04 \pm 0,62

M = média A = efeito principal da concentração de AFB B = efeito principal do solvente

AB = efeito de interação de A e B

Pode ser notado que no planejamento 4 (onde os níveis baixo e alto de [AFB] foram 4 e $8 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, respectivamente) os efeitos A ([AFB]) e de interação com o solvente (AB) são *menores* que o erro padrão. Comparando os valores dos efeitos nesta Tabela com os

valores das últimas colunas da Tabela 38 pode-se verificar que em todos os casos o valor absoluto do efeito é maior que o valor mínimo para significância com 95% de confiança.

Observa-se que o efeito de interação é menor que os efeitos principais em todos os planejamentos realizados, chegando a ser, em alguns casos (planejamento 3), muito próximo do intervalo de confiança. Esse resultado mostra que a interação não produz um efeito sinérgico no transporte das duas vitaminas. Além disso, nota-se que o efeito do solvente (B) é, na maioria dos casos mais significativo que o efeito da concentração (A).

As únicas exceções ocorreram nos planejamentos 5 e 6, onde os valores dos efeitos principais foram muito próximos entre si e a interação foi maior do que nos outros casos. O objetivo da realização dos planejamentos 5 e 6 foi verificar o efeito da utilização de níveis de concentração de AFB mais distantes, mantendo-se uma proporção 1:4 entre eles (concentrações 1 e $4 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ no planejamento 5 e, 2 e $8 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ no planejamento 6). Os dados mostram que o aumento da concentração de 2 para $8 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ não traz aumentos significativos na taxa de transporte das vitaminas, quando comparado com o aumento de 1 para $4 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

Esse resultado, observado a partir de $[AFB] = 4 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ como será visto logo a seguir, deve estar relacionado com o efeito de saturação da membrana que, a partir de uma certa concentração do carregador (AFB), sofre uma redução na capacidade de transporte das vitaminas. Em outras palavras, o fator concentração de AFB começa a ser limitante para o processo de transporte.

Com estes resultados foi feita uma análise conjunta, mais completa, que permitiu visualizar o comportamento geral das taxas de transporte de cada vitamina em cada solvente. Os dados de transporte são repetidos na Tabela 40, para maior clareza.

Com um gráfico de barras pode-se notar claramente que é grande a influência do solvente sobre o transporte e que a partir de $4 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de AFB há uma tendência de estabilizar o processo. Recordando, isto já havia sido notado no caso do transporte apenas de vitamina C (no planejamento 2⁵, onde foi verificado que o efeito da $[AFB]$ não era importante), porém naquele caso a “concentração limite” era mais baixa.

Tabela 40: Dados do transporte de vitaminas

[AFB] $\times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	Taxas de transporte $\times 10^{10} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$			
	B ₂ (CH ₂ Cl ₂)	C (CH ₂ Cl ₂)	B ₂ (CHCl ₃)	C (CHCl ₃)
Zero	0,007	0,022	0,015	0,038
1	0,053	0,055	0,157	0,163
2	0,063	0,091	0,231	0,284
3	0,128	0,168	0,382	0,595
4	0,168	0,189	0,562	0,751
5	0,170	0,192	0,608	0,760
6	0,172	0,193	0,598	0,774
7	0,173	0,196	0,604	0,796
8	0,171	0,209	0,618	0,810

Para analisar a eficiência dos processos ao aumentar a [AFB] foram calculadas as

razões $R_{i/0} = \frac{\text{Taxa}_i}{\text{Taxa}_{\text{zero}}}$, sendo Taxa_i a resposta, para cada vitamina, quando ocorre que

$1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} < [\text{AFB}] < 8.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $\text{Taxa}_{\text{zero}}$ a taxa quando não há carregador na membrana. Nota-se que a vitamina B₂ tem o maior ganho no transporte se a membrana é de clorofórmio, já a partir de $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, e os valores são praticamente o dobro dos encontrados para a vitamina C nas mesmas condições. Em diclorometano a eficiência é menor, mas as diferenças entre as duas vitaminas tornam-se ainda maiores, com os resultados para ácido ascórbico correspondendo a cerca de um terço dos resultados para a riboflavina. Estes resultados são mostrados na Tabela 41 e na Figura 46.

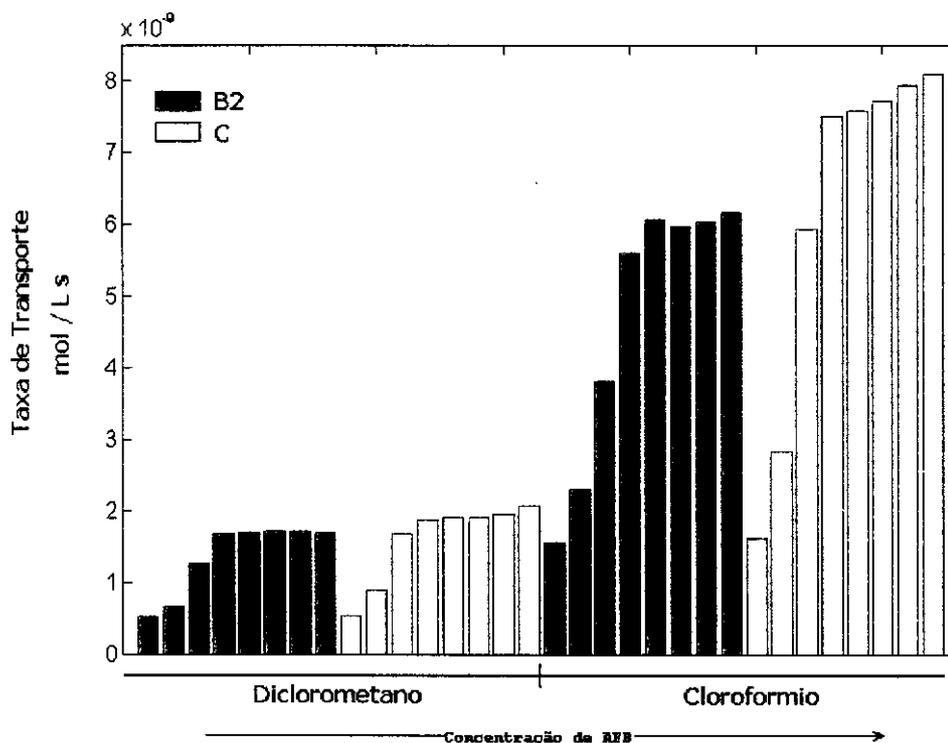


Figura 46 : Taxas de transporte de riboflavina e ácido ascórbico em várias condições

Nesta Figura, à medida que se caminha para a direita está aumentando a $[AFB]$ de 1 até $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

Tabela 41: Razão $R_{i/0}$ para experimentos de transporte simultâneo de vitaminas B_2 e C em clorofórmio e diclorometano

i	Razão $i/0$			
	B_2 (CH_2Cl_2)	C (CH_2Cl_2)	B_2 ($CHCl_3$)	C ($CHCl_3$)
1	8,27	2,48	10,68	4,24
2	10,26	4,09	15,71	7,40
3	19,81	7,57	25,99	15,49
4	26,00	8,51	38,26	19,56
5	26,32	8,65	41,36	19,79
6	26,63	8,69	40,68	20,16
7	26,78	8,83	41,08	20,73
8	26,47	9,41	42,04	21,09

Embora seja a vitamina C o composto com as maiores taxas de transporte (Figura 46 e Tabelas 39 e 40) nota-se que a influência da $[AFB]$ é muito mais significativa para o caso da riboflavina, certamente pelo fato desta molécula ser mais hidrofóbica, o que facilita a sua extração para dentro da membrana. É a diferença de concentração na membrana e na fase de

recebimento que promove a liberação da vitamina nesta segunda fase aquosa. Esta informação não pôde ser devidamente verificada quando do estudo pelos planejamentos fatoriais porque não era possível a comparação das taxas e efeitos em toda a faixa de concentração do carregador.

Não foi observado nenhum efeito de competição entre as duas vitaminas, ao contrário do que ocorria no transporte de íons potássio com ânions de tamanhos diferentes e usando 18C6. Uma justificativa pode ser a diferença de solubilidades das duas vitaminas em água e em solventes orgânicos. A vitamina C é preferencialmente solubilizada em água [121] em relação à vitamina B₂, de modo que não há uma competição pelo carregador no mesmo lado da interface fase fonte / membrana, evitando problemas de impedimento espacial como para os casos dos nitrofenóis.

Numa tentativa de explicar o motivo da interrupção do aumento das taxas a partir de $4.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ foi sugerido que o ácido fenilborônico poderia estar formando um dímero (a exemplo do que ocorre com alguns ácidos carboxílicos), que o impediria de complexar-se com as vitaminas. Foram realizados experimentos usando RMN ¹H para tentar comprovar esta hipótese.

No Apêndice XII podem ser encontradas todas as informações destes espectros para a confirmação de que são realmente idênticos.

Outra tentativa foi analisar os espectros na região do infravermelho obtidos de soluções $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $8.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Caso houvesse a formação de dímeros seria de se esperar uma alteração na banda referente às hidroxilas. Entretanto, mais uma vez nada foi verificado, o que não permite observar a formação de dímeros ou não.

CONCLUSÕES

- ✓ Os processos empregando éteres coroa permitiram verificar o efeito da presença de duas espécies sobre suas taxas de transporte individuais: quanto maior o contra-íon no transporte de potássio, menor é a influência que ele sofre pela presença de outra espécie;
- ✓ A utilização de métodos quimiométricos mostrou-se indispensável para a calibração e quantificação dos diversos compostos empregados, devido à grande superposição espectral em todos os casos;
- ✓ Os métodos multivariados de calibração permitiram o aprofundamento do trabalho anterior (mestrado) e esclarecimento de alguns pontos pendentes;
- ✓ A quimiometria tem um grande potencial nesta área de processos de transporte, permitindo quantificações precisas e de certa forma rápidas, sendo úteis para a obtenção de espectros de espécies desconhecidas a partir de experimentos cinéticos com poucas misturas;
- ✓ Os resultados dos experimentos calorimétricos com *S. cerevisiae*, aliados aos obtidos nos processos de transporte de compostos bactericidas permitem afirmar que há boa mimetização dos processos biológicos por parte do modelo de transporte estudado (BLM);
- ✓ A proximidade das constantes dielétricas de solventes orgânicos comuns e de membranas biológicas é um dos fatores principais, provavelmente, para que isto ocorra;
- ✓ O sistema funciona bem para o transporte de aminoácidos, sendo necessário variar pH's para a separação de espécies;
- ✓ No transporte simultâneo de aminoácidos há grande influência da tirosina, retardando a transferência de fenilalanina e triptofano;
- ✓ O surfatante catiônico TOMAC não permite, nas condições experimentais estudadas, realizar a extração de aminoácidos, provavelmente pelo tamanho reduzido das micelas reversas formadas;
- ✓ Com o surfatante DODAC foi possível verificar o efeito do pH da fase fonte sobre as taxas de transporte;
- ✓ Micelas reversas de AOT mostraram-se o melhor sistema para transportar aminoácidos apesar da instabilidade verificada em algumas quantificações, causada pela impossibilidade de controlar alguns parâmetros no processo;

- ✓ O trabalho contribui nas investigações sobre o transporte de vitaminas através de membranas líquidas, assunto ainda pouco discutido na literatura;
- ✓ A natureza do solvente é um fator muito importante no transporte de vitamina C mediado por ácido fenilborônico, devido à variação de caráter hidrofóbico / hidrofílico do complexo formado em relação à vitamina isolada;
- ✓ Não foi possível, com as técnicas empregadas, explicar o motivo da limitação do transporte de vitaminas a partir de uma determinada concentração de carregador;
- ✓ As características dos processos são bastante diferentes para os casos de transporte de espécies catiônicas (K^+), aminoácidos e vitaminas mas é possível boa modelagem com um sistema simples como a cela de Schulmann.

Bibliografia

- 1) Lonsdale, H. K.; *J. Membr. Sci.*, **10** (1982), 81.
- 2) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry V. A16, 187.
- 3) McBain, J. W.; Kistler, S. S.; *J. Phys. Chem.*, **35** (1931), 130.
- 4) Meyer, K. H.; Sievers, J. -F.; *Helv. Chim. Acta*, **19** (1936), 649.
- 5) Meyer, K. H.; Strauss, W.; *Helv. Chim. Acta*, **23** (1940), 795.
- 6) Reid, C. E.; Koppers, J. R.; *J. Appl. Polym. Sci.*, **2** (1959), 264.
- 7) Araki, T. ; Tsukube, H. ; "Liquid Membranes: Chemical Applications", CRC Press, Boca Raton, 1990.
- 8) Li, N.N; Calo, J. M.; "Recent Developments in Separation Science", CRC Press, v. IX, Boca Raton, 1996.
- 9) Uragami, T.; in "Membrane Science and Technology", Marcel Dekker, Inc., New York, 1992
- 10) Jain, M. H.; Wagner, R. C.; "Introduction to Biological Membranes", Wiley- Interscience, 2nd Ed., New York, 1980.
- 11) Bittar, E. E.; "Membrane Structure and Function", Wiley- Interscience, 3rd Ed., New York, 1980.
- 12) Singer, S. J. ; Nicolson, G. L.; *Science*, **175** (1972), 722. (citado em (7)).
- 13) Khorana, H. G.; *Bioorg. Chem.*, **9** (1980), 363-405
- 14) Tien, H.T.; "Bilayer Lipid Membranes (BLM) Theory and Practice", 1st Ed., Marcel-Dekker, New York, 1974.
- 15) Tyrrell, D. A.; Heath, T. D.; Colley, C. M.; Ryman, B. E.; *Biochim. Biophys. Acta*, **457** (1976), 259-302.
- 16) Fendler, J. H.; "Membrane Mimetic Chemistry", 1st Ed., John Wiley & Sons, New York, 1982.
- 17) Cussler, E. L. ; *AIChE J.*, **17** (1971) 1300.
- 18) Pedersen, C. J. ; *J. Am. Chem. Soc.* , **89** (1967), 7017
- 19) Dietrich, B.; Lehn, J.-M.; Sauvage, J.-P.; *Tetrahedron Lett.*, (1969), 2889.
- 20) Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Izatt, R. M.; *J. Chem. Educ.*, **57** (1980), 227.
- 21) Lonsdale, H. K.; *J. Membr. Sci.*, **11** (1983), 120.
- 22) Izatt, R. M. ; Lamb, J. D.; Bruening, R. L.; *Sep. Sci. Tech.*, **23** (1988), 1645.
- 23) Cahn, R. P.; Li, N. N.; *J. Membr. Sci.*, **1** (1976), 129.
- 24) Reusch, C. F.; Cussler, E. L.; *AIChE J.*, **19** (1973), 736.
- 25) Lauger, P.; in "Membranes et Communication Intercellulaire", Les Houches, Session XXXIII, North-Holland Publ. Co. , 1981.
- 26) Noble, R. D.; *Sep. Sci. Tech.* **22** (1987), 731.

- 27) Weber, E.; Vögtle, F.; *Top. Curr. Chem.*, **98** (1981), 3.
- 28) Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; "Principles of Biochemistry", 2nd ed., Worth Publishers, Inc., New York, 1993.
- 29) Starzak, M. E.; "The Physical Chemistry of Membranes", Academic Press, Orlando, 1984.
- 30) Kakutani, T.; Nishiwaki, Y.; Senda, M.; *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **59** (1986), 781.
- 31) Fyles, T. M.; Malik-Diemer, V. A.; Whitfield, D. M.; *Can. J. Chem.*, **59** (1981), 1734.
- 32) Tuwiner, S. B.; "Diffusion and Membrane Technology", Reinhold Publishing Corp. - Chapman & Hall, London, 1962.
- 33) Burchard, J. K.; Toor, H. L.; *J. Phys. Chem.*, **66** (1962), 2015.
- 34) Atkins, P. W.; "Physical Chemistry", 4th Ed., Oxford University Press, Oxford, 1990.
- 35) Shinki, S.; Kinda, H.; Araragi, Y.; Manabe, O.; *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **56** (1983), 559.
- 36) Maruyama, K.; Tsukube, H.; Araki, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982), 5197.
- 37) Wong, K. H.; Yagi, K.; Smid, J.; *J. Membr. Biol.*, **18** (1974), 379.
- 38) Noble, R. D.; Way, J. D., Eds.; "Liquid Membranes : Theory and Applications", American Chemical Society, 1987.
- 39) Vögtle, F.; Sieger, H.; Müller, W. M.; *Top. Curr. Chem.*, **98** (1981), 107.
- 40) Dietrich, B.; *J. Chem. Educ.*, **62** (1985), 954.
- 41) Antunes, A. M.; Dissertação de Mestrado, IQ – Unicamp, 1995.
- 42) Michaux, G.; Reisse, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982), 6895.
- 43) Christensen, J. J.; Eatough, D. J.; Izatt, R. M.; *Chem. Rev.*, **74** (1974), 351.
- 44) Kappenstein, C.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1-2 (1974), 89.
- 45) Izatt, R. M.; Terry, R. E.; Haymore, B. L.; Hansen, L. D.; Dalley, N. K.; Avondet, A. G.; Christensen, J. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (1976), 7620.
- 46) Frensdorff, H. K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **93** (1971), 600.
- 47) Smith, H. J.; Willians, H.; "Introduction to the Principles of Drug Design", Wright, Bristol, 1983.
- 48) Hansch, C.; *Accounts Chem. Res.*, **2** (1969), 232.
- 49) Jonhson, C. D.; "The Hammett Equation", Cambridge Press, (1973).
- 50) Denyer, S. P.; Hugo, W. B.; in "Mechanisms of Action of Chemical Biocides", 1991.
- 51) Denyer, S. P.; *International Biodeterioration*, **26** (1990), 89.
- 52) Beezer, A.E.; *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, London, 1980.
- 53) James, A.M.; "Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems", Wright, Bristol, 1987.
- 54) Spink, C.H.; Wadso, I.; "Methods of Biochemical Analysis", Vol. 23, Glick, D. Eds., Wiley Interscience, New York, 1976.

- 55) Stryer, L.; "Bioquímica", 4ª Ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.
- 56) Nakagawa, Y.; Moldéus, P.; *Biochem. Pharmacol.*, **55** (1998), 1907.
- 57) Volpe, P. L. O.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **8** (1997), 343.
- 58) Matthews, C.; Davidson, J.; Bauer, E.; Morrison, J. L.; Richardson, A. P.; *J. Am. Pharm. Assoc.*, **45** (1956), 260.
- 59) Mostow, S. R.; Dreisin, R. B.; Manawadu, B. R.; La Force, F. M.; *Laryngoscope*, **89** (1979), 1697.
- 60) Ausel, H. C.; Cadwallader, D. F.; *J. Pharm. Sci.*, **53** (1964), 169.
- 61) Derache, R.; Gourdon, J.; *Food Cosmet. Toxicol.*, **1** (1963), 189.
- 62) Hilgenfeld, R.; Saenger, W.; *Top. Curr. Chem.*, **101** (1982), 3.
- 63) Agtarap, A.; Chamberlin, J. W.; Pinkerton, M.; Steinrauf, L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **89** (1967), 5373. (citado em (7)).
- 64) Robinson, B. H.; *Chemistry in Britain*, **26** (1990), 342.
- 65) Mitchell, D. J.; Ninham, B. W.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, **77** (1981), 601.
- 66) Winsor, P. A.; *Trans. Faraday Soc.*, **44** (1948), 376.
- 67) Tondre, C.; Xenakis, A.; in K.L.Mittal and B. Lindman (Eds.) "Surfactants in Solution", Vol 3, Plenum, New York, 1984.
- 68) Xenakis, A.; Tondre, C.; (a) *J. Phys. Chem.*, **87** (1983), 4737; (b) *J. Colloid Interface Sci.*, **117** (1987), 442.
- 69) Tondre, C.; Xenakis, A.; *J. Chem. Soc. Faraday Discuss*, **77** (1984), 115.
- 70) Derouiche, A.; Tondre, C.; (a) *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1*, **85** (1989), 3301; (b) *Colloids Surfaces*, **48** (1990), 243.
- 71) Seno, M.; Shiraishi, Y.; Takkeuchi, S.; Otsuki, J.; *J. Phys. Chem.*, **94** (1990), 3776.
- 72) Kaibara, K.; Ito, K.; Kimizuka, H.; Miyakawa, K.; Kaneshina, S.; *J. Membr. Sci.*, **41** (1989), 187.
- 73) Eicke, H.F.; *Top. Curr. Chem.*, **87** (1980), 85.
- 74) Langevin, D.; *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **43** (1992), 342.
- 75) Street, G. (Ed.); in "Highly Selective Separations in Biotechnology", Chapman & Hall, London, 1994.
- 76) Zulauf, M.; Eicke, H. F.; *J. Phys. Chem.*, **83** (1979), 480-486.
- 77) Luisi, P. L.; Giomini, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, **947** (1988), 209.
- 78) Lehninger, A. L.; "Bioquímica", 2ª ed., Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 1976.
- 79) Westmark, P.R.; Smith, B.D.; *J. Pharm. Sci.*, **85** (1996), 266.
- 80) Sharaff, M. A.; Ilmann, D. L.; Kowalski, B. R.; in "Chemometrics", John Wiley & Sons, New York, 1986.
- 81) Brereton, R. G.; *Analyst*, **112** (1987), 1635.
- 82) Vandeginste, B. G. M.; *Top. Curr. Chem.*, **141** (1987), 1.

- 83) Martens, H.; Naes, T.; in "Multivariate Calibration"; John Wiley & Sons, New York, 1989.
- 84) Haaland, D. M.; Thomas, E. V.; *Anal. Chem.*, **60** (1988), 1193.
- 85) Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B.; "Chemometrics: A Practical Guide"; Wiley, New York, 1998.
- 86) Malinowski, E. R.; "Factor Analysis in Chemistry"; John Wiley & Sons, New York, 1991.
- 87) Ferreira, M.M.C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *Quimica Nova*, **22** (1999), 724.
- 88) Geladi, P.; Kowalski, B. R., *Anal. Chim. Acta*, **185** (1986), 1.
- 89) Brown, S. D.; *Appl. Spectr.*, **49** (1995), 14A.
- 90) Kowalski, B. R.; Seasholtz, M. B.; *J. Chemom.*, **5** (1991), 129.
- 91) Lorber A.; Wangen, L.; Kowalski, B. R.; *J. Chemom.*, **11** (1997), 19.
- 92) Wold, S.; *Technometrics*, **20** (1978), 397.
- 93) Welsch, R. E.; *Technometrics*, **25** (1983), 245.
- 94) Antunes, A. M.; Ferreira, M. M. C.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *J. Molec. Struc.*, **480** (1999), 563.
- 95) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6th Ed., Saunders College Publishing, Fort Worth, 1992.
- 96) Kirsop, B. E.; Snell, J. J.; "Maintenance of Microorganisms", Academic Press, New York, 1984.
- 97) Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Izatt, S.R.; Bedke, K.; Astin, M. S.; Izatt, R. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **102** (1980), 3399.
- 98) Christensen, J. J.; Lamb, J. D.; Izatt, S.R.; Starr, S.E.; Weed, G.C.; Astin, M. S.; Stitt, B. D.; Izatt, R.M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **100** (1978), 3219.
- 99) Seiler, P.; Dobler, M.; Dunitz, J. D.; *Acta Crystallogr.* B30, (1974), 2744.
- 100) Mallinson, P. R.; Truter, M. R.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1972), 1818.
- 101) Hugher, D. L.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1975), 2374.
- 102) Pedersen, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **89** (1967), 2498 e **92** (1970), 386.
- 103) Bright, G.; Truter, M. R.; *J. Chem. Soc. B*, (1970), 1544.
- 104) Carey, F. A.; Sundberg, R. J.; "Advanced Organic Chemistry", 5th ed., Plenum Press, New York, 1993..
- 105) Gaudio, A. C.; Takahata, Y.; *Computers Chem.*, **16** (1982), 277.
- 106) Ward, W. J.; *AIChE J.*, **16** (1970), 405.
- 107) Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Oscarson, J. L.; Nielsen, B. L.; Asay, B. W.; Izatt, R. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **102** (1980), 6820.
- 108) Behr, J. P.; Kirch, M.; Lehn, J. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **107** (1985), 241.
- 109) Antunes, A. M.; Poppi, R. J.; Volpe, P. L. O.; *Sep. Sci Technol.*, **34** (1999), 289.

- 110) Ho, C. -N.; Christian, G. D.; Davison, E. R.; *Anal. Chem.*, **50** (1978), 1108.
- 111) Sanchez, E.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.*, **58** (1986), 496.
- 112) Lorber, A.; *Anal. Chim. Acta*, **164** (1984), 293.
- 113) Sanchez, E.; Kowalski, B. R.; *J. Chemom.*, **4** (1990), 29.
- 114) Kyte, J.; Doolittle, R. F.; *J. Molec. Biol.*, **157** (1982), 105.
- 115) Takeshima, S.; Wada, S.; Sakurai, H.; *Sep. Sci. Technol.*, **29** (1994), 2117.
- 116) Leodidis, E.B.; Hatton, T. A.; *J. Phys. Chem.*, **94** (1990), 6411.
- 117) Dzygiel, P.; Wieczorek, P.; Mathiasson, L.; Jönsson, J. Å.; *Anal. Lett.*, **31** (1998), 1261.
- 118) Lambert, E.; Breinlinger, E. C.; Rotello, V. M.; *J. Org. Chem.*, **60** (1995), 2646.
- 119) Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; "Statistics for Experimenters", John Wiley & Sons, New York, 1978.
- 120) Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R. E.; "Planejamento e Otimização de Experimentos", Ed. Da Unicamp, Campinas, 1995.
- 121) CRC Handbook of Chemistry and Physics; Lide, D. R. (Ed.), 78th Ed., CRC Press, New York, 1997
- 122) Bussab, W. O.; Moretin, P. A.; "Estatística Básica", Atual, São Paulo, 1984.

APÊNDICE I

Referências gerais sobre o uso de membranas

1. Li, N.N.; *AIChE J.*, 17 (1971), 459.
2. Ohki, A.; Takeda, T.; Takagi, M.; Ueno, K.; *J. Membr. Sci.*, 15 (1983), 231.
3. Reusch, C.F.; Cussler, E.L.; *AIChE J.*, 19 (1973), 736.
4. Strzelbicki, J.; Bartsch, R.A.; *J. Membr. Sci.*, 10 (1982), 35.
5. Izatt, R.M.; McBride, D.W.; Brown, P.R.; Lamb, J.D.; Christensen, J.J.; *J. Membr. Sci.*, 28 (1986), 69.
6. Bacon, E.; Jung, L.; *J. Membr. Sci.*, 24 (1985), 185.
7. Christensen, J.J.; Lamb, J.D.; Brown, P.R.; Oscarson, J.L.; Izatt, R.M.; *Sep. Sci. Technol.*, 16 (1981), 1193.
8. Brown, P.R.; Izatt, R.M.; Christensen, J.J.; Lamb, J.D.; *J. Membr. Sci.*, 13 (1983), 85.
9. Moore, J.H.; Schlechter, R.S.; *AIChE J.*, 19 (1973), 741.
10. Cussler, E.L.; *AIChE J.*, 17 (1971), 1300.
11. Danesi, P.R.; Horwitz, E.P.; Vandegrift, G.F.; Chiarizia, R.; *Sep. Sci. Technol.*, 16 (1981), 201.
12. Akiba, K.; Hashimoto, H.; *Talanta*, 32, 8B (1985), 824.
13. Kataoka, T.; Nishiki, T.; Ueyama, K.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 55 (1982), 1306.
14. Danesi, P.R.; Horwitz, E.P.; Rickert, P.; *Sep. Sci. Technol.*, 17 (1982), 1183.
15. Danesi, P.R.; Cianetti, C.; *J. Membr. Sci.*, 20 (1984), 215.
16. Lee, K.H.; Evans, D.F.; Cussler, E.L.; *AIChE J.*, 24 (1978), 860.
17. Teramoto, M.; Tanimoto, H.; *Sep. Sci. Technol.*, 18 (1983), 871.
18. Danesi, P.R.; Reichle-Yinger, L.; Rickert, P.G.; *J. Membr. Sci.*, 31 (1987), 117.
19. Takeuchi, H.; Nakano, M.; *J. Membr. Sci.*, 42 (1989), 183.
20. Danesi, P.R.; Rickert, P.G.; *Solv. Extr. Ion. Exch.*, 4 (1986), 149.
21. Tanigaki, M.; Ueda, M.; Eguchi, W.; *Sep. Sci. Technol.*, 23 (1988), 1161.
22. Teramoto, M.; Matsuyama, H.; Takaya, H.; Asano, S.; *Sep. Sci. Technol.*, 22 (1987), 2175.
23. Sengupta, A.; Basu, R.; Prasad, R.; Sirkar, K.; *Sep. Sci. Technol.*, 23 (1988), 1735.
24. Sengupta, A.; Basu, R.; Sirkar, K.; *AIChE J.*, 34 (1988), 1698.
25. Teramoto, M.; Sakai, T.; Yanagawa, K.; Miyake, Y.; *Sep. Sci. Technol.*, 18 (1983), 985.
26. Jeong, Y.; Ihm, S.; Won, Y.; *J. Membr. Sci.*, 32 (1987), 47.
27. Draxler, J.; Furst, W.; Marr, R.; *J. Membr. Sci.*, 38 (1989), 281.
28. Borwankar, R.P.; Chan, C.C.; Wasan, D.T.; Kurzeja, R.M.; Gu, Z.M.; Li, N.N.; *AIChE J.*, 34 (1988), 53.
29. Boyadzhiev, L.; Kyuchoukov, G.; *J. Membr. Sci.*, 6 (1980), 107.
30. Kremesec, V.J.; Slattery, J.C.; *AIChE J.*, 28 (1982), 492.
31. Ho, W.S.; Hatton, T.A.; Lightfoot, E.N.; Li, N.N.; *AIChE J.*, 28 (1982), 662.
32. Nakashio, F.; Kondo, K.; *Sep. Sci. Technol.*, 15 (1980), 1171.
33. Goddard, J.; Schultz, J.; Suchdeo, S.; *AIChE J.*, 20 (1974), 625.
34. Schulz, G.; Goddard, J.; Suchdeo, S.; *AIChE J.*, 20 (1974), 417.
35. Smith, K.; Meldon, J.; Colton, C.; *AIChE J.*, 19 (1973), 102.
36. Smith, K.D.R.; Quinn, J.A.; *AIChE J.*, 25 (1979), 197.
37. Stroeve, P.; Varanasi, P.; *AIChE J.*, 30 (1984), 1007.
38. Hatton, T.; Wardius, D.; *AIChE J.*, 30 (1984), 934.
39. Baird, R.S.; Bunge, A.L.; Noble, R.D.; *AIChE J.*, 33 (1987), 43.
40. Casamatta, G.; Chavarie, C.; Angelino, H.; *AIChE J.*, 24 (1978), 345.
41. Yoshida, S.; Hayano, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986), 3903.

42. Nakatsuji, Y.; Sakamoto, M.; Okahara, M.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, (1988), 1101.
43. Sakim, M.; Hayashita, T.; Yamabe, T.; Igawa, M.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60** (1987), 1289.
44. Ramadan, A.; Danesi, P.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **6** (1988), 157.
45. Christensen, J.; Lamb, J.; Brown, P.; Oscarson, J.; Izatt, R.; *Sep. Sci. Technol.*, **16** (1981), 1193.
46. Strzelbicki, J.; Charewicz, W.; *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **40** (1978), 1415.
47. Fyles, T.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1**, **82** (1986), 617.
48. Yamaguchi, K.; Negi, S.; Kozakai, S.; Negano, R.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61** (1988), 2047.
49. Nakatsuji, Y.; Kobayashi, H.; Okahara, M.; *J. Org. Chemistry*, **51** (1986), 3789.
50. Sakamoto, H.; Kimura, K.; Shono, T.; *Anal. Chem.*, **59** (1987), 1513.
51. Xenakis, A.; Tondre, C.; *J. Colloid Interface Sci.*, **117** (1987), 442.
52. Stolwijk, T.; Sudhoeleter, E.; Reinhoudt, D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **109** (1987), 7042.
53. Izatt, R.; Eblerhardt, L.; Clark, G.; Bruening, R.; Bradshaw, J.; Cho, M.; Christensen, J.; *Sep. Sci. Technol.*, **22** (1987), 701.
54. Kobuke, Y.; Tabushi, I.; Oh, K.; Aoki, T.; *J. Org. Chem.*, **53** (1988), 5933.
55. Hayworth, H.; Ho, W.; Li, N.N.; *Sep. Sci. Technol.*, **18** (1983), 493.
56. Teramoto, M.; Sakuramoto, T.; Koyama, T.; Matsuyama, H.; Miyake, Y.; *Sep. Sci. Technol.*, **21** (1986), 229.
57. Novikov, A.; Myasoedov, B.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **5** (1987), 117.
58. Nakamura, S.; Akiba, K.; *Sep. Sci. Technol.*, **24** (1989), 673.
59. Frankenfeld, J.; Cahn, R.; Li, N.N.; *Sep. Sci. Technol.*, **16** (1981), 385.
60. Strzelbicki, J.; Charewicz, W.; *Sep. Sci. Technol.*, **13** (1978), 141.
61. Ohki, A.; Hinoshita, H.; Takagi, M.; Ueno, K.; *Sep. Sci. Technol.*, **18** (1983), 969.
62. Cox, J.; Bhatnagar, A.; Francois, R.; *Talanta*, **33** (1986), 713.
63. Yoshizuka, K.; Kondo, K.; Nakashio, F.; *J. Chem. Eng. Jpn.*, **19** (1986), 312.
64. Molinari, R.; Drioli, E.; Pantano, G.; *Sep. Sci. Technol.*, **24** (1989), 1015.
65. Strzelbicki, J.; Charewicz, W.; Mackiewicz, A.; *Sep. Sci. Technol.*, **19** (1984), 321.
66. Boyadzhiev, L.; Bezenshek, E.; *J. Membr. Sci.*, **14** (1983), 13.
67. Izatt, R.; Johnes, M.; Lamb, J.; Bradshaw, J.; Christensen, J.; *J. Membr. Sci.*, **26** (1986), 241.
68. Biel, M.; Izatt, R.; Lamb, J.; Christensen, J.; *Sep. Sci. Technol.*, **17** (1982), 289.
69. Tanigaki, M.; Shiode, T.; Ueda, M.; Eguchi, W.; *Sep. Sci. Technol.*, **23** (1988), 1145.
70. Izatt, R.; Bruening, R.; Wu, G.; Moon, H.; Christensen, J.; *Anal. Chem.*, **59** (1987), 2405.
71. Gu, Z.; Wasan, D.; Li, N.N.; *Sep. Sci. Technol.*, **20** (1985), 599.
72. De santa G.; Di Casa, M.; Seghi, B.; Fabbriizzi, L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1989), 2422.
73. Chiarizia, R.; Castagnola, A.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **2** (1984), 479.
74. Reichley, Y.; Danesi, P.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **3** (1985), 49.
75. Biel, M.; Izatt, R.; Lamb, J.; Christensen, J.; *Sep. Sci. Technol.*, **17** (1982), 289.
76. Tanigaki, M.; Shiode, T.; Ueda, M.; Eguchi, W.; *Sep. Sci. Technol.*, **23** (1988), 1145.
77. Izatt, R.; Bruening, R.; Wu, G.; Moon, H.; Christensen, J.; *Anal. Chem.*, **59** (1987), 2405.
78. Gu, Z.; Wasan, D.; Li, N.N.; *Sep. Sci. Technol.*, **20** (1985), 599.
79. Chiarizia, R.; Castagnola, A.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **2** (1984), 479.
80. Reichley, Y.; Danesi, P.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **3** (1985), 49.
81. Shimidzu, T.; Okushita, H.; *J. Membr. Sci.*, **27** (1986), 349.
82. Danesi, P.R.; Cianetti, C.; Horwitz, E.P.; *Solv. Extr. Ion Exch.*, **1** (1983), 299.
83. Araki, T.; Kubo, Y.; Takata, M.; Gohbara, S.; Yamamoto, T.; *Chem. Lett.*, **6** (1987), 1011.
84. Yan, N.X.; Huang, S.A.; Shi, Y.J.; *Sep. Sci. Technol.*, **22** (1987), 801.
85. O'Brien, D.; Senske, G.; *Sep. Sci. Technol.*, **4** (1989), 617.
86. Yamaguchi, T.; Nishimura, K.; Shinbo, T.; Sugiura, M.; *Chem. Lett.*, **10** (1985), 1549.
87. Rebek, J.; Askew, B.; Nemeth, D.; Parris, K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **109** (1987), 2432.
88. Scrimin, P.; Tonellato, U.; Zanta, N.; *Tetrahedron Letters*, **29** (1988), 4967.
89. Audunsson, G.; *Anal. Chem.*, **58** (1986), 2714.
90. Audunsson, G.; *Anal. Chem.*, **60** (1988), 1340.

91. Shinbo, T.; Nishimura, K.; Yamaguchi, T.; Sugiura, M.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1986), 350.
92. Sugiura, M.; Yamaguchi, T.; *Sep. Sci. Technol.*, **19** (1984), 623.
93. Yamaguchi, K.; Kuboniwa, H.; Murakami, N.; Hirao, A.; Nakahama, S.; Yamazaki, N.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62** (1989), 1097.
94. Lamb, J.; Bruening, R.; Linsley, D.; Smith, C.; Izatt, R.; *Sep. Sci. Technol.*, **25** (1990), 13.
95. Wienk, M.; Stolwijk, T.; Sudholter, E.; Reinhoudt, D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990), 797.
96. Nakamura, S.; Ohashi, S.; Akiba, K.; *Sep. Sci. Technol.*, **27** (1982), 863.
97. Wodzki, R.; Wyszynska, A.; Narebska, A.; *Sep. Sci. Technol.*, **25** (1990), 1175.
98. Takigawa, D.; *Sep. Sci. Technol.*, **27** (1992), 325.
99. Izatt, R.; Bruening, R.; Bruening, M.; Lindh, G.; Christensen, J.; *Anal. Chem.*, **61** (1989), 1140.
100. Takahashi, S.; *Sep. Sci. Technol.*, **26** (1991), 1495.
101. Teramoto, M.; Tohno, N.; Ohnishi, N.; Matsuyama, H.; *Sep. Sci. Technol.*, **24** (1989), 981.
102. Saito, T.; *Sep. Sci. Technol.*, **25** (1990), 581.
103. Shiau, C.; *Sep. Sci. Technol.*, **26** (1991), 1519.
104. Boyadzhiev, L.; *Sep. Sci. Technol.*, **25** (1990), 187.
105. Boyadzhiev, L.; Alexandrova, S.; *Sep. Sci. Technol.*, **27** (1992), 1307.
106. Lazarova, Z.; Sapundshiev, T.; Boyadzhiev, L.; *Sep. Sci. Technol.*, **27** (1992), 493.
107. Lazarova, Z.; Boyadzhiev, L.; *Talanta*, **39** (1992), 931.
108. Gadekar, P.; Mukkolath, A.; Triwari, K.; *Sep. Sci. Technol.*, **27** (1992), 427.
109. Deblay, F.; Delepine, S.; Minier, M.; Renon, H.; *Sep. Sci. Technol.*, **26** (1991), 97.

APÊNDICE II

Rotinas gerais em linguagem MATLAB e exemplo de cálculo via OLS

- **Centrar na média**

Para centrar os dados na média usam-se os comandos

```
[n,m] = size(X);  
Xm = mean(X);  
Xcm = X - ones(n,1)*Xm;
```

onde X_m é o vetor das médias das colunas de X , e X_{cm} é a matriz resultante dos dados centrados na média. O sinal “;” nas expressões acima é usado para indicar que as respostas não devem ser mostradas na tela.

- **Autoescalamento**

Para autoescalar os dados são usados os seguintes comandos

```
Xstd = std(X);  
Xa = Xcm./(ones(n,1)*Xstd);
```

onde X_{std} é o vetor contendo os desvios padrões das colunas de X , e X_a é a matriz dos dados originais autoescalados. As expressões “mean” e “std” são funções internas do software que calculam as médias e desvios padrões das colunas de X .

- **Comandos para o cálculo de variância percentual em cada componente principal**

```
s=diag(S).^2;  
vart=sum(s);
```

$$\text{VAR\%PC}=(s/\text{vart})*100;$$

- **Cálculo de vetores de regressão**

$$\text{beta} = \text{V}(:, 1:k) * \text{inv}(\text{S}(1:k, 1:k)) * \text{U}(:, 1:k)' * \text{y}$$

onde $\text{V}(:, 1:k)$ significa tomar todas as linhas e as colunas de 1 até k da matriz V; $\text{inv}(\text{S}(1:k, 1:k))$ significa calcular a inversa da matriz quadrada formada pelas linhas e as colunas de 1 a k da matriz S e finalmente $\text{U}(:, 1:k)'$ calcula a transposta daquela matriz obtida tomando-se todas as linhas e as colunas de 1 a k da matriz U.

- **Validação cruzada**

Na linguagem do MATLAB, para a j-ésima componente principal temos:

```
X=[X(1:i-1,:);X(i+1:n,:)];      % i-ésima amostra excluída do conjunto de dados
x=X(i,:);                        % dados referentes à i-ésima amostra
cest=x*beta(:,j);                % concentração estimada para a i-ésima amostra
EP(i,j)=(c-cest);                % erro de previsão calculado para a i-ésima amostra
```

O processo é repetido para $i=1:n$

```
PRESS=sum(EP(:,j).^2);
RMSEP=(sum(EP(:,j))/n).^0.5;
```

- **Cálculo da "leverage" e resíduos de Student para o q-ésimo analito.**

```
lev = zeros(n,1);                % cria vetor com n linhas e uma coluna contendo somente zeros
```

```
h = V(:,1:k)*inv(T(:,1:k)'*T(:,1:k))*T(:,1:k)';
```

```
for i = 1:n                        % cálculo da "leverage" para as n amostras
```

```
    lev(i) = X(i,:)*h(:,i);
```

```
end
```

```
res=X*beta-Y;                      % conc. Estimadas – conc. Experimentais
```

```
lresc(q)=sqrt((1/(n-1)*((ones(n,1)-lev).^(-2)).*res(:,q))*res(:,q))
```

```
res_st(:,q) = res(:,q)/(lresc(q)*sqrt(ones(n,1)-lev));                % resíduos de Student
```

para o q-ésimo analito

- **Regressão linear**

```

function[G]=linear(C,T);           % nomeia a função como "linear"
% Calcula coeficiente angular (a), linear (b) e de correlação (r)
% para os dados de cinética
% I/O : [G]=linear(C,T);          % indica o formato de entrada / saída (I/O)

MT=mean(T);                        % calcula a média dos tempos
XMT = T - MT;                      % centra os tempos na média
MC= mean(C);                       % calcula a média das concentrações
YMC = C - MC;                      % centra as concentrações na média
Prod = XMT.*YMC;                   % multiplica cada elemento de X centrada na média
                                   % pelos elementos de Y centrada na média
SXY=sum(Prod);                     % Faz o somatório dos produtos calculados
XMT2=XMT.^2;                       % eleva ao quadrado cada elemento de X centrada na média
SX2 =sum(XMT2);                    % faz o somatório dos quadrados de X centrada na média
sx = std(T);                       % calcula o desvio-padrão dos dados de tempo
sy = std(C);                       % calcula o desvio-padrão dos dados de concentração
K = (XMT)/sx;                      % autoescala os valores de tempo
L = (YMC)/sy;                      % autoescala os valores de concentração
H=sum(K.*L);                       % multiplica cada elemento de K por cada elemento de L
[m,n] = size(C);                   % define como m o número de linhas da matriz das concentrações
                                   % e como n o número de colunas desta matriz
a=SXY/SX2;                         % calcula o coeficiente angular
b=MC - (a*MT);                    % calcula o coeficiente linear
r=1/(m-1)*H;                      % calcula o coeficiente de correlação
G=[a,b,r];                         % coloca os três valores num vetor linha com três colunas

```

O cálculo dos coeficientes foi feito baseando-se no descrito em um livro básico de estatística [121].

Quando mais de um composto deve ser quantificado basta usar as rotinas **dlinear** (2 compostos) e **tlinear** (3 compostos), derivadas da anterior.

Os resultados obtidos através destes comandos no MATLABTM são idênticos aos conseguidos com programas mais populares como o Origin 5.0, por exemplo. Uma vantagem de usar diretamente o MATLAB é não ser necessário sair do programa que se está usando para fazer as quantificações todas nem ter que usar “Copiar & Colar” para levar dados para o Origin, o que às vezes causa alguns problemas.

Vale dizer que as três rotinas (**linear**, **dlinear** e **tlinear**) podem ser agrupadas numa única, capaz de reconhecer se se trata de um, dois, ou três compostos.

```
function[G2]=dlinear(C,T);
% Faz a regressão linear para os dados de
% cinética de dois compostos
% I/O : [G2]=dlinear(C,T);
```

```
MT=mean(T);
XMT = T - MT;
MC1= mean(C(:,1));
MC2 = mean(C(:,2));
YMC1 = C(:,1) - mean(C(:,1));
YMC2 = C(:,2) - mean(C(:,2));
Prod1 = XMT.*YMC1;
Prod2 = XMT.*YMC2;
SXY1=sum(Prod1);
SXY2=sum(Prod2);
XMT2=XMT.^2;
SX2 =sum(XMT2);
sx = std(T);
sy = std(C);
K1 = (XMT)/sx;
L1 = (YMC1)/sy(:,1);
K2 = (XMT)/sx;
L2 = (YMC2)/sy(:,2);
H1=sum(K1.*L1);
H2=sum(K2.*L2);
[m,n] = size(C);
a1=SXY1/SX2;
a2=SXY2/SX2;
b1=MC1 - (a1*MT);
b2=MC2 - (a2*MT);
r1=1/(m-1)*H1;
r2=1/(m-1)*H2;
G2=[a1,b1,r1;a2,b2,r2];
```

```
function[G3]=tlinear(C,T);
% Faz a regressão linear para os dados de
% cinética de três compostos
% I/O : [G3]=tlinear(C,T);
```

```
MT=mean(T);
XMT = T - MT;
MC1= mean(C(:,1));
MC2 = mean(C(:,2));
MC3 = mean(C(:,3));
YMC1 = C(:,1) - mean(C(:,1));
YMC2 = C(:,2) - mean(C(:,2));
YMC3 = C(:,3) - mean(C(:,3));
Prod1 = XMT.*YMC1;
Prod2 = XMT.*YMC2;
Prod3 = XMT.*YMC3;
SXY1=sum(Prod1);
SXY2=sum(Prod2);
SXY3=sum(Prod3);
XMT2=XMT.^2;
SX2 =sum(XMT2);
sx = std(T);
sy = std(C);
K1 = (XMT)/sx;
L1 = (YMC1)/sy(:,1);
K2 = (XMT)/sx;
L2 = (YMC2)/sy(:,2);
K3 = (XMT)/sx;
L3 = (YMC3)/sy(:,3);
H1=sum(K1.*L1);
H2=sum(K2.*L2);
H3=sum(K3.*L3);
[m,n] = size(C);
a1=SXY1/SX2;
```

$$a2=SXY2/SX2;$$

$$a3=SXY3/SX2;$$

$$b1=MC1 - (a1*MT);$$

$$b2=MC2 - (a2*MT);$$

$$b3=MC3 - (a3*MT);$$

$$r1=1/(m-1)*H1;$$

$$r2=1/(m-1)*H2;$$

$$r3=1/(m-1)*H3;$$

$$G3=[a1,b1,r1;a2,b2,r2;a3,b3,r3];$$

• **Escolher a melhor região espectral para usar o TLD**

Como exemplo, usando quatro matrizes criadas com os espectros registrados em intervalos regulares de tempo em quatro experimentos de cinética

```

L=5; % indica que serão considerados sempre 5 componentes principais
k=0;
for i=20:40
    for j = 70:135
        Mh=[A(i:j,10:60)' B(i:j,10:60)' C(i:j,10:60)' D(i:j,10:60)']; % dispõe as matrizes lado a lado
                                                (posição horizontal)
        Mv=[A(i:j,10:60)'; B(i:j,10:60)'; C(i:j,10:60)'; D(i:j,10:60)']; % dispõe as matrizes na
                                                posição vertical

        [Uv Sv Vv]=svd(Mv); % faz a deconvolução de valor singular da matriz Mv
        [Uh Sh Vh]=svd(Mh); % faz a deconvolução de valor singular da matriz Mh
        sv=diag(Sv); % cria uma matriz com a diagonal de Sv
        sh=diag(Sh); % cria uma matriz com a diagonal de Sh
        svh=[sv(1:L) sh(1:L)]; % cria uma matriz com os valores singulares em duas colunas
        k=k+1;
        d(1:L,k)=abs([(svh(:,1))-(svh(:,2))]); % Calcula a diferença (em módulo) entre os valores
                                                singulares calculados com os dados na
                                                horizontal e na vertical, para até 5 componentes
                                                principais

        VSV(1:L,k)=[svh(:,1)];
        VSH(1:L,k)=[svh(:,2)];
    end
end

[m,n]=min(d) % Indica o menor valor absoluto para a diferença
              e em qual coluna é encontrado

d % mostra a matriz d
VSV % mostra a matriz VSV (valores singulares com justaposição vertical)
VSH % mostra a matriz VSH (valores singulares com justaposição horizontal)
clear m n d VSH VSV % apaga os valores de d m n VSH e VSV

```

- Para escolher a melhor faixa de tempos (detalhes semelhantes aos apresentados acima)

```

L=5;
k=0;
for i=1:10
    for j = 15:60
        Mv=[M1(55:120,i:j)';M2(55:120,i:j)';M3(55:120,i:j)';M4(55:120,i:j)'];
        Mh=[M1(55:120,i:j)' M2(55:120,i:j)' M3(55:120,i:j)' M4(55:120,i:j)'];
        [Uv Sv Vv]=svd(Mv);
        [Uh Sh Vh]=svd(Mh);
        sv=diag(Sv);
        sh=diag(Sh);
        svh=[sv(1:L) sh(1:L)];
        k=k+1;
        d(1:L,k)=abs([(svh(:,1))-(svh(:,2))]);
        VSV(1:L,k)=[svh(:,1)];
        VSH(1:L,k)=[svh(:,2)];
    end
end
[m,n]=min(d')
d
VSV
VSH
clear m n d VSH VSV

```

- Colocando os resultados de TLD na mesma escala do OLS

Como exemplo:

- ✓ mistura de dois compostos (M e N);
- ✓ experimentos de cinética com três misturas (A, B e C);
- ✓ faixa espectral de 25 a 290 e tempos de 1 a 60 (= 215 a 480 nm e de 0,5 a 30 min)

```

t=[0.5:0.5:30]; % Define o vetor com os tempos
[X Y Z]=tld_blk([A(25:290,1:60);B(25:290,1:60);C(25:290,1:60)],3,2); % TLD
olsA=inv(E(25:290,:) * E(25:290,:)) * E(25:290,:) * A(25:290,1:60); % OLS para a
mistura A
olsM2=olsA(1,:); % Separa os resultados do OLS do primeiro composto (M)
tldM=(-Y(:,1)); % Separa os resultados do TLD do primeiro composto (M)
olsM3=olsM2-(ones(60,1)*olsM2(1)); % Acerta a linha base dos dados do OLS
tldM2=tldM-(ones(60,1)*tldM(1)); % Acerta a linha base dos dados do TLD
[GtldM2]=linear(tldM2,t); % Faz a regressão dos dados de TLD (originais)
[GolsM3]=linear(olsM3,t); % Faz a regressão dos dados de OLS
taxas=GtldM2(1,1)/GolsM3(1,1); % Calcula a razão entre as taxas de transporte
via TLD e OLS
ratio=olsM2./tldM; % Calcula a razão entre OLS e TLD em cada tempo
h=mean(ratio); % Faz a média da razão acima
h2=GtldM2(1,1)*h; % Multiplica a taxa original do TLD pelo fator calculado acima
h3=h2.*t; % Coloca os valores de TLD na escala do OLS
[taxatldM]=linear(h3,t); % Calcula a taxa de transporte para o TLD, na nova escala
[taxaolsM]=GolsM3; % Renomeia a taxa de transporte do OLS

```

O OLS é calculado apenas para a mistura A, neste exemplo, pois os valores encontrados por este método para cada mistura devem ser muito próximos (isto deve ser verificado antes de fazer o TLD, pois isto é muito importante)

Para o segundo composto (N), basta substituir M por N na rotina acima

• **Rotina para PLS (Obtida com a Profa. Dra. Márcia M. C. Ferreira)**

% Calibração por PLS para o primeiro analito

xm=espcal2'-ones(11,1)*mean(espcal2');

cm=concal-ones(11,1)*mean(concal);

cm1=cm(:,1)

for i=1:3

w=xm*cm1/(cm1'*cm1)

W(:,i)=w/((w'*w)^.5)

T(:,i)=xm*W(:,i)

v(i)=T(:,i)'*cm1/(T(:,i)'*T(:,i))

B(:,i)=xm*T(:,i)/(T(:,i)'*T(:,i))

E=xm-T(:,i)*B(:,i)';

ee=cm1 - v(i)*T(:,i)

xm=E;

cm=ee;

end

b=W(:,1:3)*inv(B(:,1:3)*W(:,1:3))*v(1:3)';

beta1=b;

% Para o segundo analito

xm=espcal2'-ones(11,1)*mean(espcal2');

cm=concal-ones(11,1)*mean(concal);

cm2=cm(:,2);

for i=1:3

w=xm*cm2/(cm2'*cm2);

W(:,i)=w/((w'*w)^.5);

T(:,i)=xm*W(:,i);

v(i)=T(:,i)'*cm2/(T(:,i)'*T(:,i));

B(:,i)=xm*T(:,i)/(T(:,i)'*T(:,i));

E=xm-T(:,i)*B(:,i)';

ee=cm2 - v(i)*T(:,i);

xm=E;

cm=ee;

```

end
b=W(:,1:3)*inv(B(:,1:3)'*W(:,1:3))*v(1:3)';
beta2=b;

% Para o terceiro analito
xm=espcal2'-ones(11,1)*mean(espcal2');
cm=concal-ones(11,1)*mean(concal);
cm3=cm(:,3);
for i=1:3
w=xm'*cm3/(cm3'*cm3);
W(:,i)=w/((w'*w)^.5);
T(:,i)=xm*W(:,i);
v(i)=T(:,i)'*cm3/(T(:,i)'*T(:,i));
B(:,i)=xm'*T(:,i)/(T(:,i)'*T(:,i));
E=xm-T(:,i)*B(:,i)';
ee=cm3 - v(i)*T(:,i);
xm=E;
cm=ee;
end
b=W(:,1:3)*inv(B(:,1:3)'*W(:,1:3))*v(1:3)';
beta3=b;
plot(x,beta1,'k')
hold
plot(x,beta2,'k-')
plot(x,beta3,'k--')
%title('Vetores de Regressao (3 variaveis latentes)')
xlabel('Comprimentos de onda (nm)')
ylabel('Coeficientes de Regressao')
gtext('- 1 analito')
gtext('-.- 2 analito')
gtext('—3analito')

```

```
% Residuos de Student
```

```
xm=espcal2'-ones(11,1)*mean(espcal2');
cm=concal-ones(11,1)*mean(concal);
[n,m]=size(xm);
[n1,m1]=size(cm); %(m1 = numero de analitos)
res=-(xm*beta-cm);
lresc = zeros(1,m1);
tres = zeros(n,m1);
ecv = zeros(n,m1);
for i = 1:m1
    lresc(i)=sqrt((1/(n-1)*((ones(n,1)-lev).^(-2))'.*res(:,i))*res(:,i))
    r_est(:,i) = res(:,i)/(lresc(i)*sqrt(ones(n,1)-lev));
end
```

```
% Leverage por PLS
```

```
r = W*inv(B'*W)*inv(T'*T)*T';
xm=espcal2'-ones(11,1)*mean(espcal2');
cm=concal-ones(11,1)*mean(concal);
lev = zeros(n,1);
for i = 1:n
    lev(i) = xm(i,:)*r(:,i);
end
```

```
% Leverage por PCR
```

```
[u s v]=svd(xm);
t=u*s;
rinv = v(:,1:3)*inv(t(:,1:3)'*t(:,1:3))*t(:,1:3)';

xm=espcal2'-ones(11,1)*mean(espcal2');
cm=concal-ones(11,1)*mean(concal);
lev = zeros(n,1);
for i = 1:n
    lev(i) = xm(i,:)*rinv(:,i);
end
```

```
% Plot leverage X residuos de Student
```

```
plot(lev,r_est,'k+')
for i = 1:smx
    for j = 1:sny
        s = int2str(i);
        text(lev(i),r_est(i,j),s)
    end
end
xlabel('Leverage')
ylabel('Residuos de Student')
```

- **Cálculo de concentrações via OLS: um exemplo usando vitaminas B₂ e C**

Tendo os espectros das duas vitaminas em separado (AB e AC), obtidos a partir de soluções de concentração conhecida *cb* e *cc*, obtêm-se os valores de coeficiente de absorvidade molar de cada composto em todos os comprimentos de onda apenas dividindo-se cada valor de absorbância pela concentração (da lei de Beer, considerando caminho óptico unitário). Em linguagem MATLAB:

```
E=[AB./cb AC./cc]; % Cria a matriz 911 x 2 (911 comprimentos de onda – de 190 a 1100 nm
de 1 em 1 nm, para dois compostos) com os coef. absorpt. molar
```

Com o conjunto de espectros registrados durante o transporte, **ABC** (uma matriz 911 x 61, ou seja, com as absorbâncias em 911 comprimentos de onda obtidos em 61 intervalos de tempo) calcula-se as concentrações de cada composto em cada tempo:

```
CB=inv(E(:,1)' * E(:,1)) * E(:,1)' * ABC; % Faz o OLS para a vitamina B2 (está usando a
primeira coluna de E – veja destaque em
verde na linha de comando)
```

```
CC=inv(E(:,2)' * E(:,2)) * E(:,2)' * ABC; % Faz o OLS para a vitamina C (está usando agora
a segunda coluna de E)
```

Tendo as concentrações basta fazer a regressão linear com os tempos para ter as taxas de transporte, neste caso em $\text{mol.L}^{-1} \text{s}^{-1}$

```
C=[CB CC]; % Coloca as concentrações em uma matriz, que terá tamanho 61 x 2
```

```
t=[0:20:1200]'; % Cria um vetor com os tempos de zero a 20 minutos, em intervalos de 20s
```

```
[Taxas]=dlinear(C,t); % Calcula coef. angular, linear e de correlação para as duas regressões
```

APÊNDICE III

Referências sobre os métodos quimiométricos

1. Thomas, E.V.; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 795A.
2. Cummins, D.J.; Andrews, C.W.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 489.
3. Zhu, E.; Barnes, R.M.; *J. Chemom.* **9** (1995), 363.
4. Rännar, S.; Lindgren, F.; Geladi, P.; Wold, S.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 111.
5. Rännar, S.; Geladi, P.; Lindgren, F.; Wold, S.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 459.
6. Lindgren, F.; Geladi, P.; Wold, S.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 377.
7. Lindgren, F.; Geladi, P.; Rännar, S.; Wold, S.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 349.
8. Lindgren, F.; Geladi, P.; Berglund, A.; Sjöström, M.; Wold, S.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 331.
9. Thomas, E.V.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 471.
10. Sun, J.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 21.
11. Höskuldsson, A.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 91.
12. Langsrud, O.; Naes, T.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 483.
13. de Jong, S.; ter Braak, C.J.F.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 169.
14. de Jong, S.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 323.
15. de Jong, S.; Farebrother, R.W.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **25** (1994), 179.
16. Wang, Z.; Isaksson, T.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 249.
17. Ge, Z.; Cavinato, A.G.; Callis, J.B.; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 1354.
18. Herrero, A.; Ortiz, M.C.; Arcos, J.; Lopez Palacios, J.; Sarabia, L.; *Anal. Chim. Acta*, **293** (1994), 277.
19. Bechmann, I.E.; Norgaard, L.; Ridder, C.; *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995), 229.
20. Campins-Falco, P.; Verdu-Andres, J.; Bosch-Reig, F.; Molins-Legua, C.; *Anal. Chem.* **302** (1993), 323.
21. Verdu-Andres, J.; Campins-Falco, P.; Bosch-Reig, F.; *Talanta*, **41** (1994), 1569.
22. Campins-Falco, P.; Verdu-Andres, J.; Bosch-Reig, F.; *Analyst*, **119** (1994), 2123.
23. Campins-Falco, P.; Verdu-Andres, J.; Bosch-Reig, F.; *Anal. Chim. Acta*, **315** (1995), 26778.
24. Calvente, J.J.; Aparicio, R.; *Anal. Chim. Acta*, **312** (1995), 281.
25. Xie, Y.L.; Liang, Y.; Jiang, J.H.; Yu, R.-Q.; *Anal. Chim. Acta*, **313** (1995), 185.
26. Greip, M.I.; Wakeling, I.N.; Vankeerberghen, P.; Massart, D.L.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **29** (1995), 375.
27. Brown, P.J.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **28** (1995), 139.
28. Brown, P.J.; *J. Chemom.*, **7** (1993), 255.
29. Oman, S.D.; Naes, T.; Zube, A.; *J. Chemom.*, **7** (1993), 195.
30. Ruyken, M.A.; Visser, J.A.; Smilde, A.; *Anal. Chem.*, **67** (1995), 2170.
31. Walczak, B.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **29** (1995), 63.
32. Walczak, B.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **28** (1994), 259.
33. Kalantar, A.H.; Gelb, R.I.; Alper, J.S.; *Talanta*, **42** (1995), 597.
34. Rajiko, R.; *Anal. Lett.*, **27** (1994), 215.
35. Vigneau, E.; Deveaux, M.F.; Safar, M.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 125.
36. Perez-Arribas, L.V.; Navarro-Villoslada, F.; Leon-Gonzales, M.E.; Polo-Diaz, L.M.; *J. Chemom.*, **7** (1993), 267.
37. Navarro-Villoslada, F.; Perez-Arribas, L.V.; Leon-Gonzales, M.E.; Polo-Diaz, L.M.; *Anal. Chim. Acta*, **308** (1995), 238.
38. Navarro-Villoslada, F.; Perez-Arribas, L.V.; Leon-Gonzalez, M.E.; Polo-Diaz, L.M.; *Anal. Chim. Acta*, **313** (1995), 93.
39. Keller, H.R.; Roettele, J.; Bartels, H.; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 937.

40. Forina, M.; Drava, G.; Boggia, R.; Lanteri, S.; Conti, P.; *Anal. Chim. Acta*, **295** (1994), 109.
41. Grung, B.; Kvalheim, O.M.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **22** (1994), 115.
42. Wang, Z.; Dean, T.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.*, **67** (1995), 2379.
43. Faber, N.M.; Buydens, L.M.C.; Kateman, G.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 181.
44. Booksh, K.; Kowalski, B.R.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 45.
45. Poe, R.B.; Rutan, S.C.; *Anal. Chim. Acta*, **283** (1993), 845.
46. Smilde, A.; Wang, Y.; Kowalski, B.R.; *J. Chemom.*, **8** (1994), 21.
47. Wang, Y.; Borgen, O.; Kowalski, B.R.; *J. Chemom.*, **7** (1993), 439.
48. Xie, Y.; Wang, J.; Liang, Y.; Ge, K.; Yu, R.; *Anal. Chim. Acta.*, **281** (1983), 207.
49. Booksh, K.; Henshaw, J.M.; Burgess, L.W.; Kowalski, B.R.; *J. Chemom.*, **9** (1995), 263.
50. Lin, Z.; Booksh, K.S.; Burgess, L.W.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 2552.
51. Booksh, K.S.; Lin, Z.; Wang, Z.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 2561.
52. Heise, H.M.; Bittner, A.; *J. Mol. Struct.*, **348** (1995), 127.
53. Heise, H.M.; Bittner, A.; *J. Mol. Struct.*, **348** (1995), 21.
54. Bark, J.; Larsen, A.; *Appl. Spectrosc.*, **49** (1995), 437.
55. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspocho, S.; de la Pezuela, C.; Russo, E.; *Anal. Chim. Acta*, **298** (1994), 183.
56. Havel, J.; Jimenez, F.; Bautista, R.D.; Leon, J.J.A.; *Analyst*, **118** (1993), 1355.
57. Chikoti, A.; Schmierer, A.E.; Perez-Luna, V.H.; Ratner, B.D.; *Anal. Chem.*, **67** (1995), 2883.
58. Faber, K.; Kowalski, B.R.; *J. Chemom.*, **11** (1997), 181.
59. Kleinknecht, R.E.; *J. Chemom.*, **10** (1996), 687.
60. De Vries, S.; Ter Braak, C.J.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **30** (1995), 239.
61. Faber, K.; Kowalski, B.R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **34** (1996), 283.
62. Faber, K.; Kowalski, B.R.; *Appl. Spectrosc.*, **51** (1997), 660.
63. Xu, L.; Schechter, I.; *Anal. Chem.*, **68** (1996), 2392.
64. Wold, S.; Kettaneh, N.; Tjessen, K.; *J. Chemom.*, **10** (1996), 463.
65. Despaigne, F.; Massart, D.L.; de Noord, O.E.; *Anal. Chem.*, **69** (1997), 3391.
66. Berglund, A.; Wold, S.; *J. Chemom.*, **11** (1997), 141.
67. Booksh, K.S.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chim. Acta*, **348** (1997), 1.
68. Faber, K.; Kowalski, B.R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **34** (1996), 293.
69. Xu, L.; Schechter, I.; *Anal. Chem.*, **69** (1997), 3722.
70. Lin, J.; Lo, S.C.; Brown, C.W.; *Anal. Chim. Acta*, **349** (1997), 263.
71. Gemperline, P.J.; Cho, J.H.; Aldridge, P.K.; Sekulic, S.S.; *Anal. Chem.*, **68** (1996), 2913.
72. Herrero, A.; Ortiz, M.C.; *Anal. Chim. Acta*, **348** (1997), 51.
73. Andrews, D.T.; Wentzell, P.D.; *Anal. Chim. Acta*, **350** (1997), 341.
74. Anti, H.; Sjostrom, M.; Wallbacks, L.; *J. Chemom.*, **10** (1996), 591.
75. Cooper, J.B.; Wise, K.L.; Welch, W.T.; *Anal. Chem.*, **67** (1995), 4096.
76. Lindblom, T.; Christy, A.A.; Libnau, F.O.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **29** (1995), 243.
77. Bautista, R.D.; Jimenez, A.I.; Jimenez, F.; Arias, J.J.; *Anal. Lett.*, **29** (1996), 2645.
78. Blanco, M.; Coelho, J.; Iturriaga, H.; Maspocho, S.; de la Pezuela, C.; *Anal. Chim. Acta*, **333** (1996), 147.
79. Wrobel, K.; Wrobel, K.; Lopez-Alba, P.L.; Lopez-Martinez, L.; *Anal. Lett.*, **30** (1997), 717.
80. Rambla, F.J.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta*, **344** (1997), 41.

APÊNDICE IV

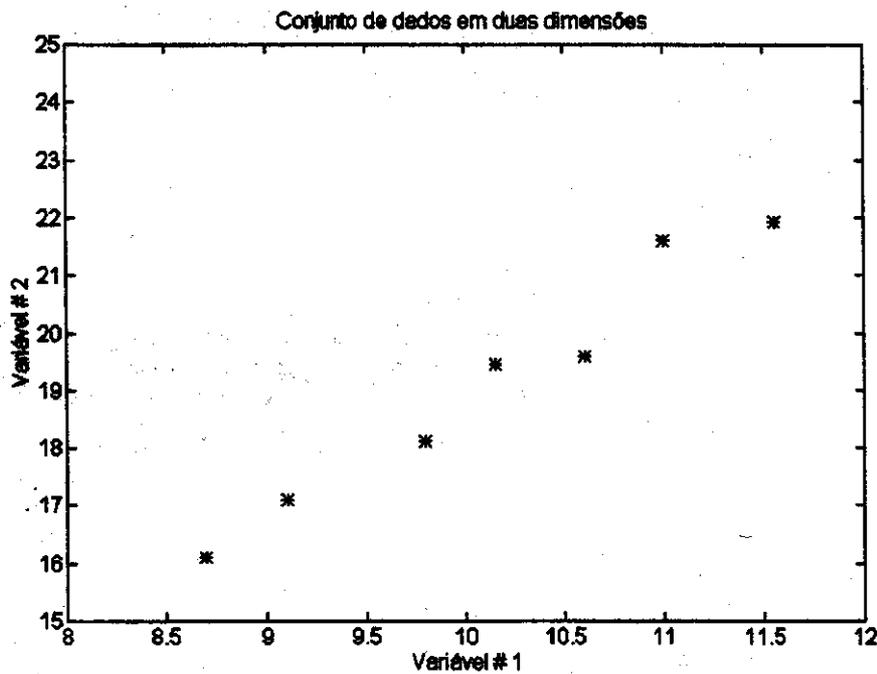
Cálculo de “scores” e “loadings” (um problema de autovetores e autovalores)

Seja o conjunto de pontos dado pela matriz X:

$$X = \begin{bmatrix} 10.15 & 19.45 \\ 10.60 & 19.60 \\ 11.55 & 21.93 \\ 8.70 & 16.10 \\ 9.80 & 18.11 \\ 9.10 & 17.10 \\ 11.00 & 21.60 \end{bmatrix}$$

A primeira coluna representa as abscissas; a segunda coluna tem as ordenadas.

Graficando esta matriz obtém-se



Inicialmente é necessário centrar os pontos de cada coluna na média (de cada ponto será subtraída a média da coluna):

Média dos valores da primeira coluna: $\bar{a}_1 = 10.129$

Média dos valores da segunda coluna: $\bar{a}_2 = 19.127$

$$X_{CM} = \begin{bmatrix} 0.021 & 0.323 \\ 0.471 & 0.473 \\ 1.421 & 2.803 \\ -1.429 & -3.027 \\ -0.329 & -1.017 \\ -1.029 & -2.027 \\ 0.871 & 2.473 \end{bmatrix}$$

Autoescalando os dados (dividir cada coluna pelo respectivo desvio-padrão)

Desvio-padrão da primeira coluna: $std a_1 = 1.017$

Desvio-padrão da segunda coluna: $std a_2 = 2.184$

$$X_{AS} = \begin{bmatrix} 0.021 & 0.148 \\ 0.463 & 0.217 \\ 1.397 & 1.284 \\ -1.404 & -1.386 \\ -0.323 & -0.468 \\ -1.011 & -0.928 \\ 0.857 & 1.133 \end{bmatrix}$$

Calculando a correlação: $corr = \frac{1}{n-1} X'_{AS} X_{AS}$

(transposta de X_{AS} multiplicada por X_{AS})

$$corr = \frac{1}{6} \begin{bmatrix} 6 & 5.903 \\ 5.903 & 6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0.984 \\ 0.984 & 1 \end{bmatrix}$$

Autovetores e autovalores: é preciso resolver a equação

$$\begin{bmatrix} 1 & 0.984 \\ 0.984 & 1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} l_{11} \\ l_{21} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} l_{11} & l_{12} \\ l_{21} & l_{22} \end{bmatrix}$$

autovetores autovalores

$$\left(\begin{bmatrix} 1 & 0.984 \\ 0.984 & 1 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{bmatrix} \right) * \begin{bmatrix} l_{11} & l_{12} \\ l_{21} & l_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} 1-\lambda & 0.984 \\ 0.984 & 1-\lambda \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} l_{11} & l_{12} \\ l_{21} & l_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Fazendo o determinante da primeira matriz ser nulo:

$$(1-\lambda)^2 - (0.984)^2 = 0 \quad \Rightarrow \lambda_1 = 1.984 \quad \lambda_2 = 0.016$$

$$\lambda_1 + \lambda_2 = 2.000 \quad \Rightarrow \quad \%PC_1 = \frac{1.984}{2.000} * 100 = 99.2\% \quad \%PC_2 = \frac{0.016}{2.000} * 100 = 0.8\%$$

A primeira componente principal explica 99,2% da variância dos dados e a segunda explica os 0,8% restantes.

Para o cálculo dos "loadings":

$$\begin{bmatrix} 1-1.984 & 0.984 \\ 0.984 & 1-0.016 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} l_{11} & l_{12} \\ l_{21} & l_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$-0.984 l_{11} + 0.984 l_{21} = 0 \quad \rightarrow \text{loadings da } PC_1$$

Normalizando: $l_{11}^2 + l_{21}^2 = 1$ Assim, resolvendo as duas equações: $l_{11} = l_{21} = \frac{1}{\sqrt{2}}$

$$L_1 = \begin{pmatrix} l_{11} \\ l_{21} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/\sqrt{2} \\ 1/\sqrt{2} \end{pmatrix}$$

Fazendo o mesmo procedimento para a segunda componente principal:

$$L_{21} = \begin{pmatrix} l_{12} \\ l_{22} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/\sqrt{2} \\ -1/\sqrt{2} \end{pmatrix}$$

Os autovetores são, portanto: $L = \begin{bmatrix} 1/\sqrt{2} & 1/\sqrt{2} \\ 1/\sqrt{2} & -1/\sqrt{2} \end{bmatrix}$

$$\text{Assim, } \begin{cases} PC1: 1/\sqrt{2} a_1 + 1/\sqrt{2} a_2 \\ PC2: 1/\sqrt{2} a_1 - 1/\sqrt{2} a_2 \end{cases}$$

Calculando finalmente os "scores"

$$\text{Amostra 1: } \begin{cases} PC1: 1/\sqrt{2} (0.021) + 1/\sqrt{2} (0.148) = 0.119 \\ PC2: 1/\sqrt{2} (0.021) - 1/\sqrt{2} (0.148) = -0.090 \end{cases}$$

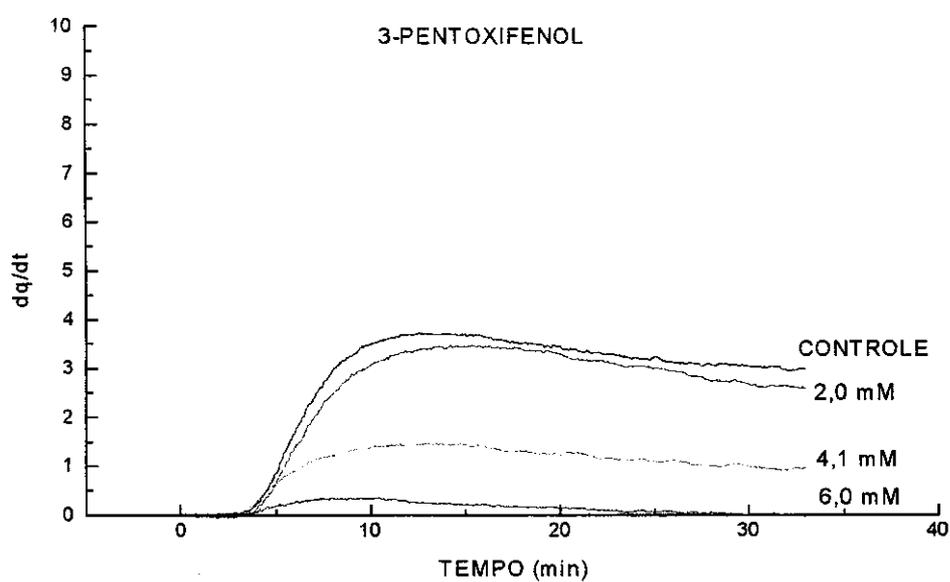
$$\text{Amostra 2: } \begin{cases} PC1: 1/\sqrt{2} (0.463) + 1/\sqrt{2} (0.217) = 0.480 \\ PC2: 1/\sqrt{2} (0.463) - 1/\sqrt{2} (0.217) = 0.174 \end{cases}$$

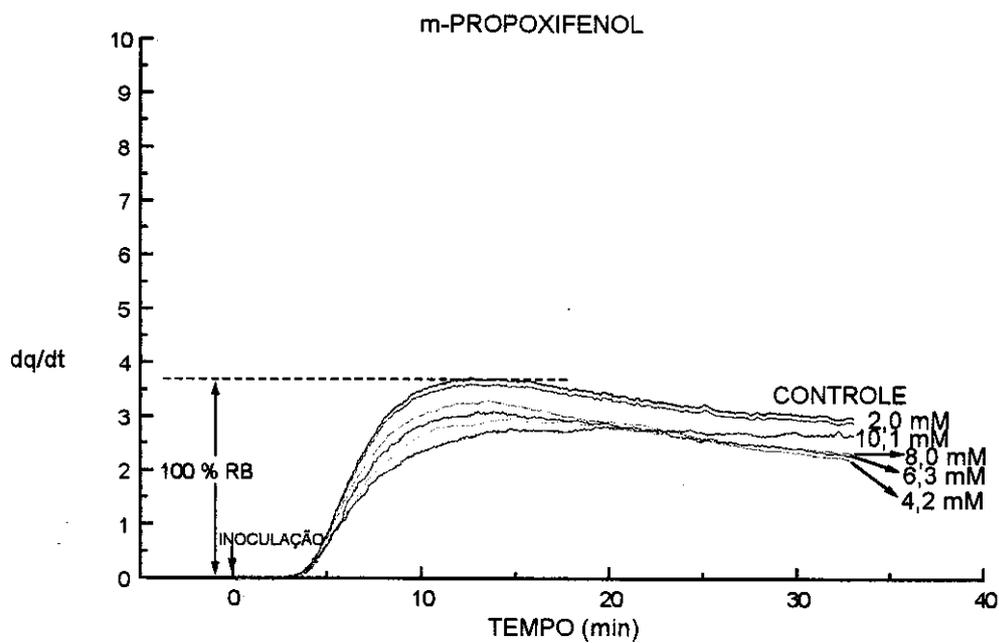
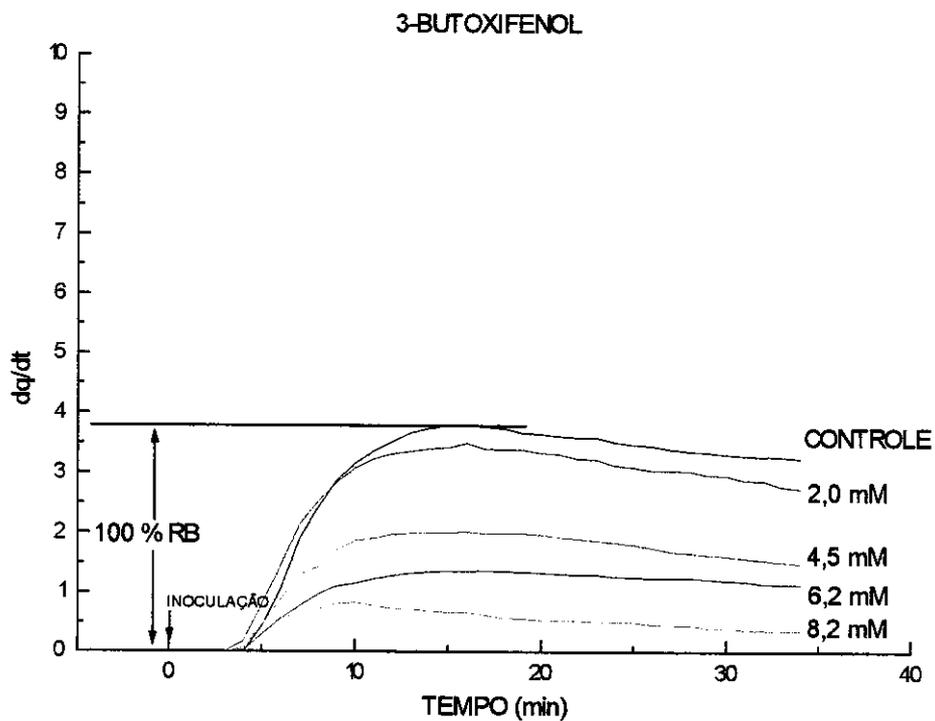
e assim por diante. Os valores de a_1 e a_2 são os que estão na matriz X_{AS}

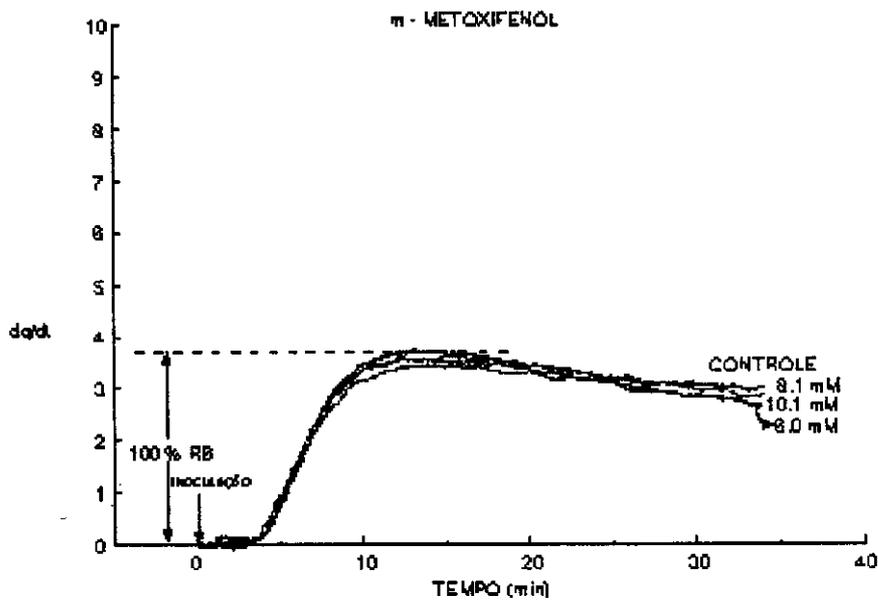
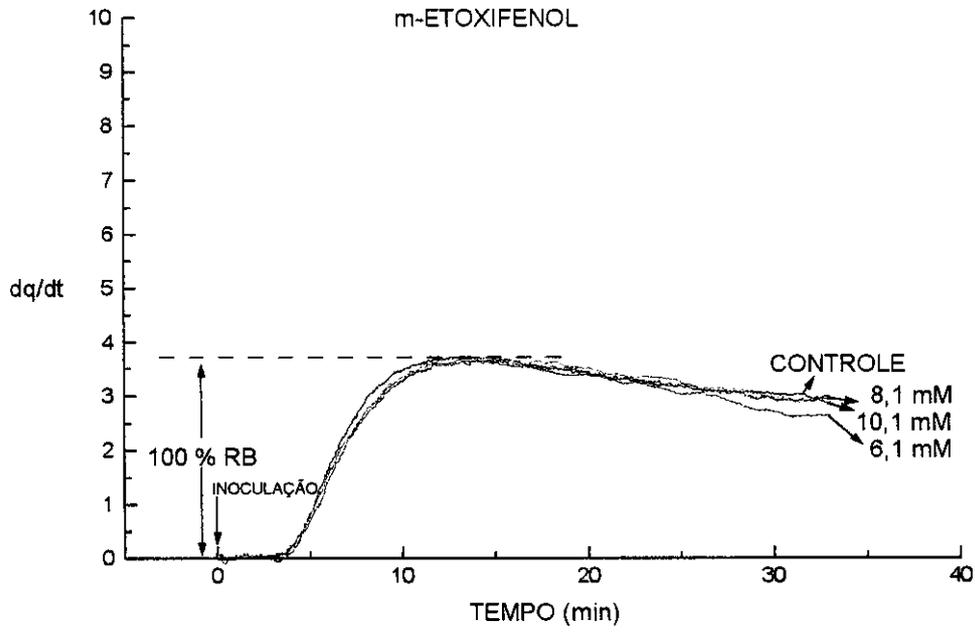
Conforme foi verificado, apenas uma componente principal explica a maior parte da variância dos dados. Isto é confirmado ao observar que os dados originais estão muito dispersos numa direção e muito pouco dispersos em outra. Neste caso, onde só há duas dimensões, a análise é facilmente feita de maneira visual (apenas uma estimativa de quantas componentes devem ser necessárias, claro); em casos de muitas dimensões isto se torna impossível.

APÊNDICE V

Termogramas mostrando o efeito da inoculação de bactericidas em várias concentrações sobre *S. cerevisiae*

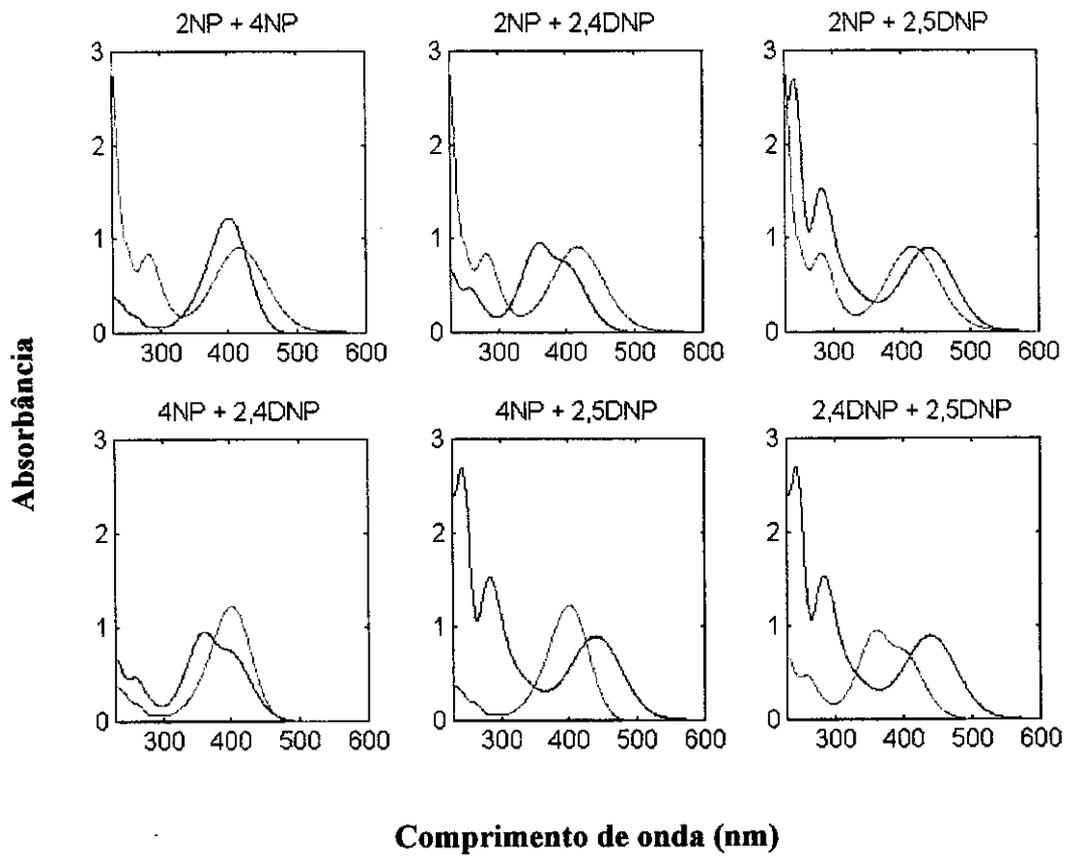






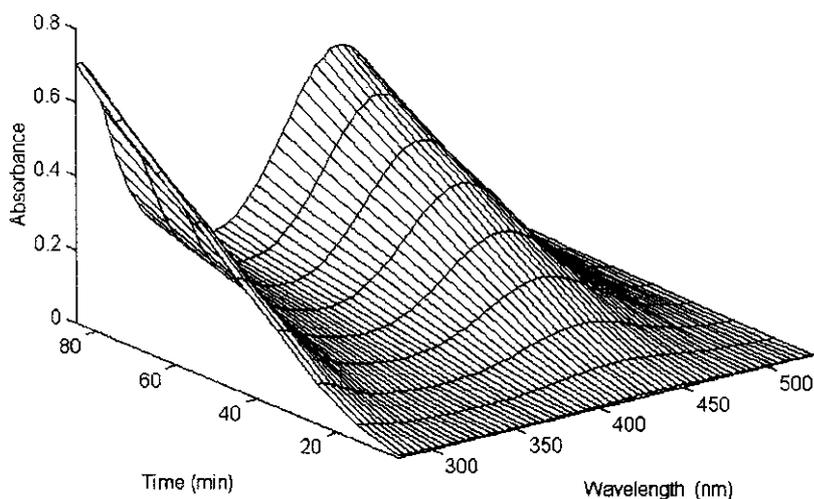
APÊNDICE VI

A superposição de espectros dos nitrofenolatos



APÊNDICE VII

Os espectros registrados em vários tempos formam uma superfície como a mostrada abaixo [94]; observem-se as três dimensões (absorbância x tempo x comprimento de onda).



Colocando-se em seqüência vários destes conjuntos de dados (por exemplo, se forem usadas três misturas serão colocados três conjuntos) é criado um conjunto maior, em três dimensões, que é usado para fazer a decomposição trilinear (TLD).

A próxima figura mostra esquematicamente como é feita esta operação. Os comandos na linguagem MATLAB são os seguintes:

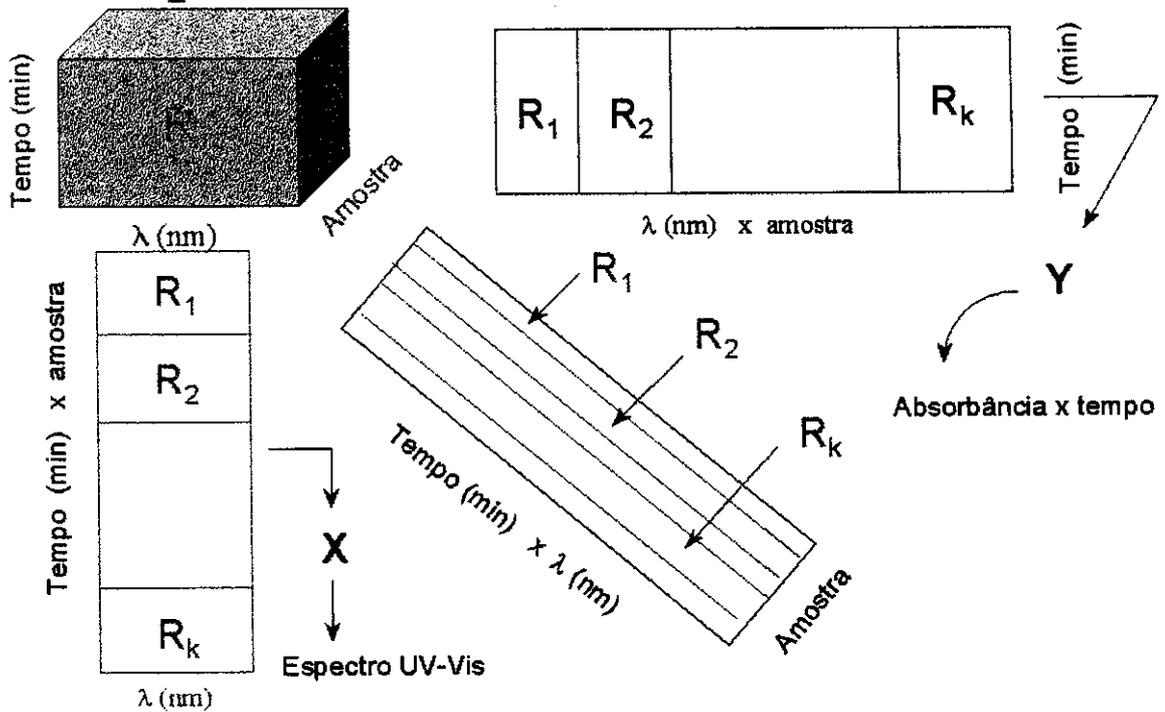
Considerem-se três misturas **A**, **B** e **C** (cada matriz tem, por exemplo, 400 x 31 – 400 comprimentos de onda em 31 tempos), provenientes do transporte de duas substâncias.

$t=[0:0.5:15]'$; % Cria um vetor com os tempos de zero a 15 minutos, com intervalos de 30 segundos

```
[X Y Z]=tld_blk([ A(:,5:31); B(:,5:31); C(:,5:31)],3,2);
```

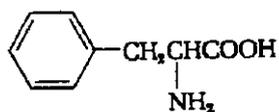
% Faz o TLD para as três misturas usando os tempos de 2,5 a 15 minutos (faixa 5:31, em verde), calculando espectros (espaço X) e relação concentração x tempo (espaço Y) para dois compostos.

Decomposição de um tensor de 3ª ordem

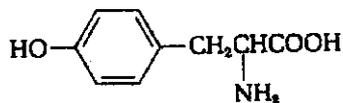


APÊNDICE VIII

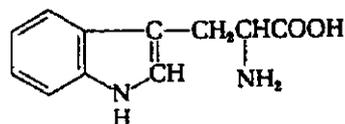
Estruturas e espectros UV - Vis dos aminoácidos



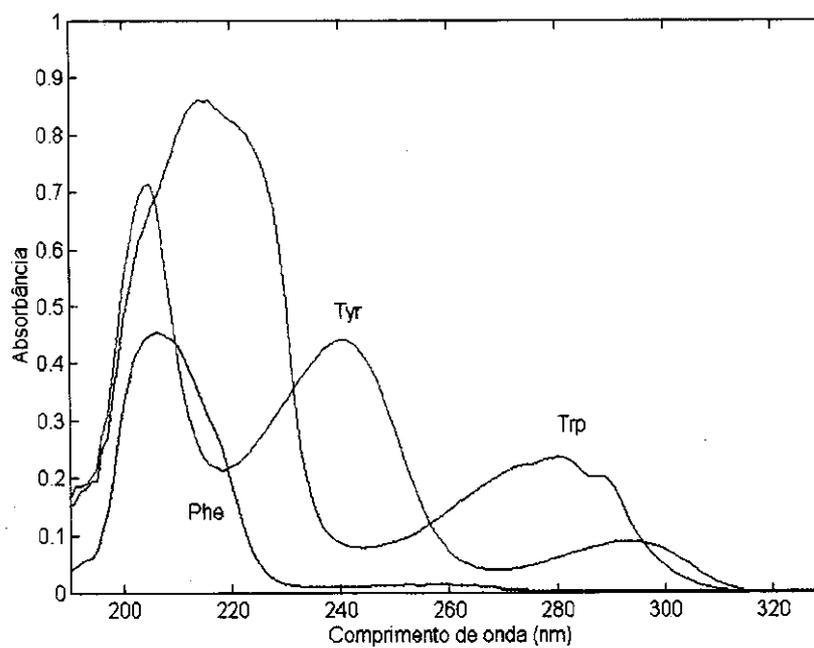
Fenilalanina



Tirosina

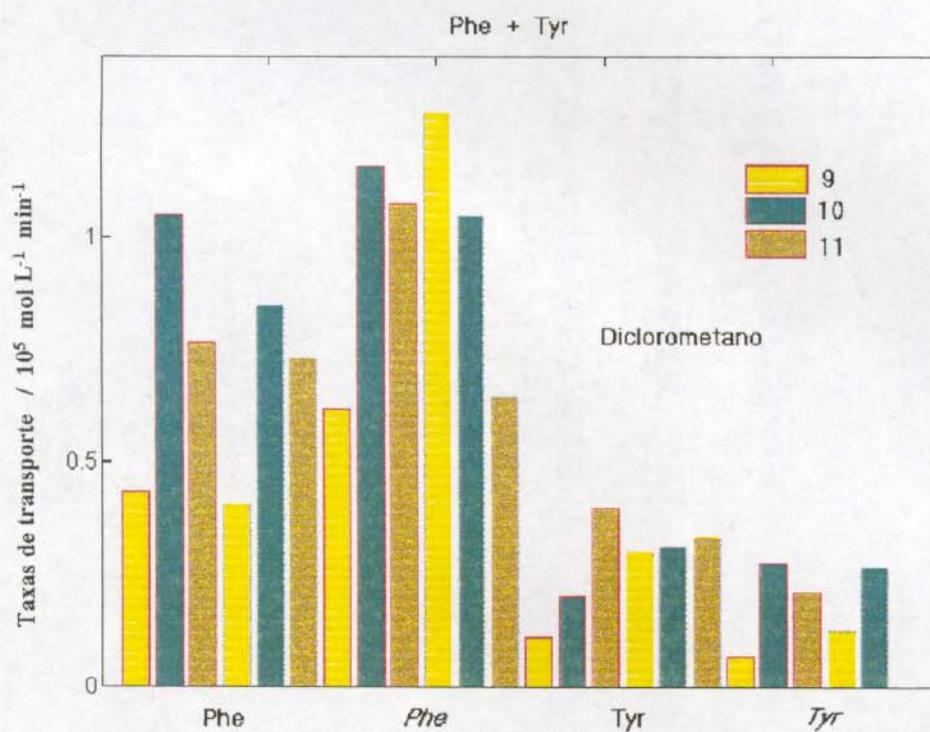


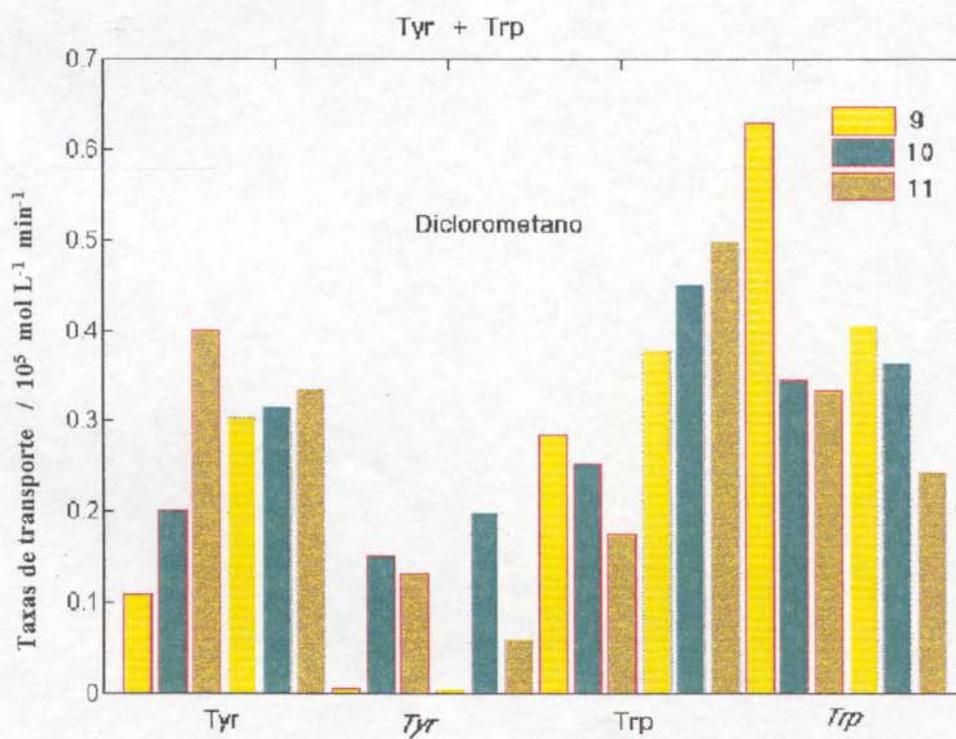
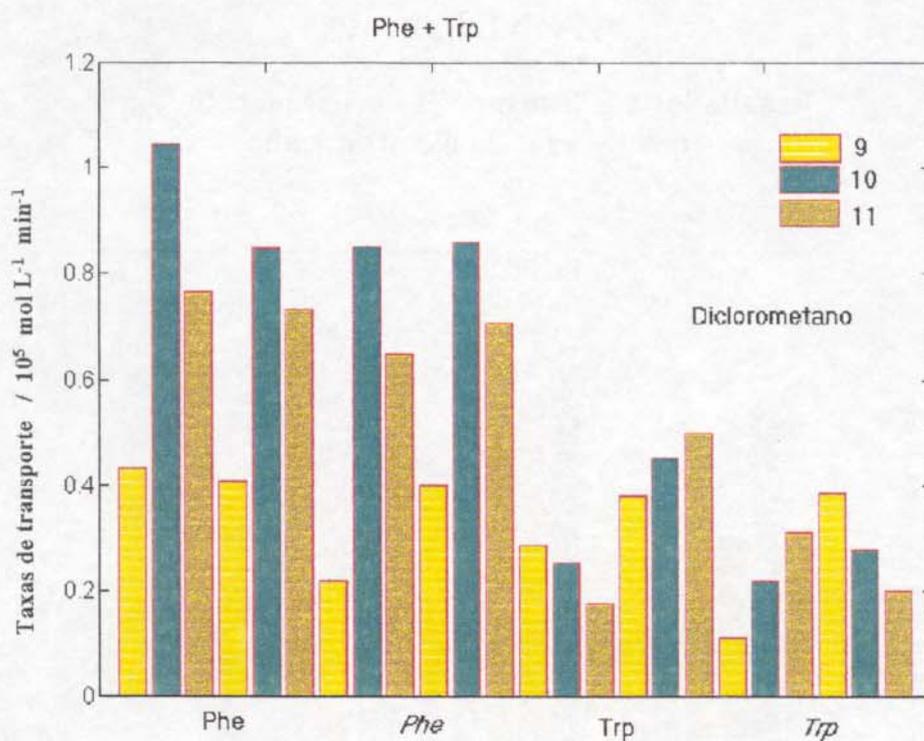
Triptofano



APÊNDICE IX

Resultados dos transportes de aminoácidos em membranas de diclorometano





APÊNDICE X

Planejamento 2⁵ usado no estudo com vitamina C

Experimento	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-
11	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-
17	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	+
19	-	+	-	-	+
20	+	+	-	-	+
21	-	-	+	-	+
22	+	-	+	-	+
23	-	+	+	-	+
24	+	+	+	-	+
25	-	-	-	+	+
26	+	-	-	+	+
27	-	+	-	+	+
28	+	+	-	+	+
29	-	-	+	+	+
30	+	-	+	+	+
31	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+

Em seguida são mostrados os sinais usados para o cálculo dos efeitos de interação neste fatorial e um exemplo de cálculo dos efeitos

Chamando as respostas de cada experimento de R1, R2, R3,..., R32 será mostrada a maneira de calcular o efeito de interação ABD (coluna em azul). Este cálculo é uma média das respostas positivas e negativas, de acordo com a tabela das interações mostrada acima.

$$ABD = \bar{R}_+ - \bar{R}_-$$

(média das respostas positivas menos a média das respostas negativas)

$$ABD = \frac{R_2 + R_3 + R_6 + R_7 + R_9 + R_{12} + R_{13} + R_{16} + R_{18} + R_{19} + R_{22} + R_{23} + R_{25} + R_{28} + R_{29} + R_{32}}{16}$$

$$\frac{R_1 + R_4 + R_5 + R_8 + R_{10} + R_{11} + R_{14} + R_{15} + R_{17} + R_{20} + R_{21} + R_{24} + R_{26} + R_{78} + R_{30} + R_{31}}{16}$$

Para saber quais serão os sinais de cada coluna de interação basta multiplicar os sinais de cada coluna individual. Por exemplo, no caso acima foram multiplicados os sinais das colunas A, B e D



A	B	D	ABD
-	-	-	-
+	-	-	+
-	+	-	+
+	+	-	-
-	-	-	-
+	-	-	+
-	+	-	+
+	+	-	-
-	-	+	+
+	-	+	-
-	+	+	-
+	+	+	+
-	-	+	-
+	-	+	-
-	+	+	+

- Linha 1: (-) * (-) = (+); (+) * (-) = (-)
- Linha 2: (+) * (-) = (-); (-) * (-) = (+)
- Linha 3: (-) * (+) = (-); (-) * (-) = (+)

e assim por diante até o experimento 32

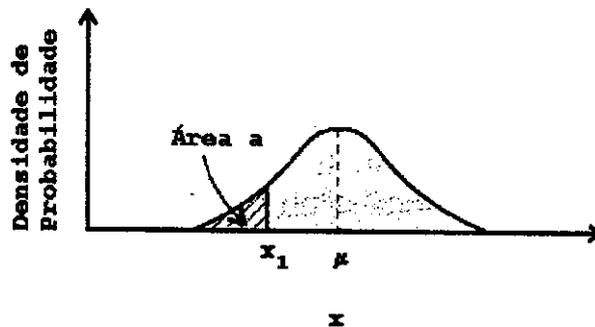
APÊNDICE XI

A distribuição normal e seus gráficos

Uma variável aleatória x , que se distribua normalmente, obedece à equação

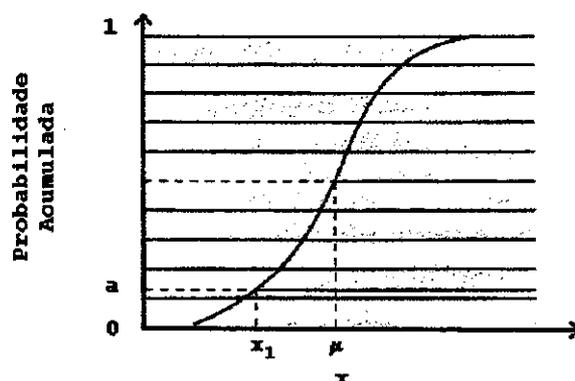
$$f(x) dx = \left[\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \right] e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} dx$$

A representação gráfica desta equação é uma curva em forma de sino, como pode ser observado abaixo:



A distribuição normal

Considere-se um valor numérico específico (x_1) para a variável em estudo (x). A área da cauda à esquerda de x_1 é a probabilidade cumulativa (ou acumulada) do valor x_1 , que corresponde à probabilidade de se encontrar um valor de x menor ou igual a x_1 ; esta probabilidade vai aumentando, obviamente, à medida que x se desloca para a direita (a probabilidade cumulativa é uma função monotônica crescente de x , que tende a 1 quando x tende ao infinito). O gráfico da probabilidade cumulativa em uma distribuição normal tem o formato de uma sigmóide, tendendo assintoticamente para 0 à esquerda e para 1 à direita, como visto na próxima figura.



Probabilidade cumulativa em distribuições normais

Usando um procedimento semelhante ao que é empregado na fabricação do papel logarítmico pode-se modificar a escala do eixo das ordenadas, de modo a transformar a sigmóide numa reta (expande-se a escala simetricamente em torno do ponto $0,5 = 50\%$ de probabilidade acumulada). Se x se distribui normalmente a sigmóide representativa das probabilidades acumuladas será uma reta num papel de probabilidade normal. Neste gráfico, as probabilidades de 0 e de 100% não podem ser mostradas, uma vez que elas correspondem a $x = -\infty$ e $x = +\infty$, respectivamente, e a escala é finita.

APÊNDICE XII

Informações sobre os espectros RMN ¹H

Alexandre Volpe-2 nov23 a1aH1				Alexandre Volpe-8 nov23 a1aH4			
Pulse Sequence: s2pu1				Pulse Sequence: s2pu1			
[AFB] = 2 mmol.L ⁻¹				[AFB] = 8 mmol.L ⁻¹			
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2482.900	8.274	16.7	1	2484.523	8.280	17.0
2	2476.307	8.253	16.0	2	2483.058	8.275	23.9
3	2474.843	8.248	14.5	3	2476.466	8.253	22.8
4	2327.983	7.758	7.9	4	2475.001	8.248	20.1
5	2321.391	7.736	8.2	5	2328.874	7.761	8.6
6	2286.232	7.619	10.2	6	2322.282	7.739	8.8
7	2284.401	7.613	3.5	7	2320.817	7.734	7.6
8	2279.274	7.596	7.5	8	2295.913	7.651	3.4
9	2265.723	7.551	16.4	9	2294.448	7.646	5.3
10	2258.032	7.525	21.8	10	2292.983	7.642	3.7
11	2251.440	7.503	13.1	11	2289.687	7.631	4.9
12	2244.848	7.481	6.1	12	2287.123	7.622	13.5
13	2234.960	7.448	10.4	13	2284.559	7.613	5.8
14	2227.269	7.423	11.6	14	2281.263	7.603	8.2
15	2220.677	7.401	3.9	15	2279.798	7.598	12.1
16	2181.490	7.270	96.1	16	2277.967	7.592	6.7
17	2180.757	7.268	83.5	17	2265.882	7.551	19.5
18	1389.327	4.630	26.1	18	2260.022	7.532	18.9
19	473.744	1.579	151.2	19	2258.557	7.527	26.5
20	464.588	1.548	3.9	20	2255.261	7.516	4.4
				21	2251.965	7.505	16.2
				22	2250.500	7.500	8.8
				23	2246.471	7.487	5.3
				24	2245.006	7.482	8.5
				25	2243.541	7.477	4.5
				26	2235.118	7.449	11.5
				27	2234.019	7.445	5.8
				28	2229.258	7.429	9.1
				29	2227.793	7.424	11.6
				30	2221.201	7.402	5.0
				31	2219.370	7.396	3.5
				32	2181.648	7.271	108.6
				33	1393.880	4.645	28.2
				34	475.367	1.584	151.2

Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 INOVA-500 "nmrsun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 0.200 sec
 Pulse 40.3 degrees
 Acq. time 2.667 sec Width 6000.0 Hz

128 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0673537 MHz
 DATA PROCESSING FT size 32768
 Total time 6 min, 8 sec