UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

UM MODELO PARA DETOXIFICAÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS:
EFEITO DE MICELAS E VESÍCULAS NA OXIMÓLISE DE
p-NITROFENILDIFENILFOSFATO.

Larissa Martins Gonçalves
Dissertação de Mestrado

Orientador: Hernan Chaimovich

SÃO PAULO

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 10/07/2006

(Dez de julho de dois mil e seis)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho para o meu amado Prof. Dr. José Kenichi Mizukoshi, da Universidade Federal do ABC, pela disciplina que me passa e pelo apoio diário.

Também dedico à empresa Nova Ética, em especial ao Sr. Sebastião Sene Junior, que durante todos esses anos demonstrou um caráter sem igual e me apoiou tanto nas atividades profissionais quanto nas minhas necessidades acadêmicas.

Por fim, dedico aos meus pais, Márcia Alas Martins e Antônio Aparecido Gonçalves, pessoas extraordinárias que me ofereceram todas as possibilidades para chegar onde estou.

AGRADECIMENTOS

Não tenho como não começar agradecendo aos meus professores, Prof^ª. Iolanda Midea Cuccovia e Prof. Hernan Chaimovich, pessoas maravilhosas que me acolheram no laboratório desde “criancinha”, pesquisadores extraordinários que até hoje me orientam cientificamente. É muito bom ter pessoas competentes como exemplo.

Agradeço a empresa Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos e a Hexis Científica, que me apoiaram durante o meu mestrado na experiência fantástica de trabalhar e estudar simultaneamente. Em especial a pessoa empreendedora do Sr. Sebastião Sene Junior, da empresa Nova Ética, que sempre me apoiou.

Tenho um agradecimento muito especial para a Prof^ª. Teresinha de Jesus Andreoli Pinto, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, amiga, empreendedora, professora e exemplo de humildade. Uma pessoa como poucas no mundo, que demonstra através de ações a sua força e seus ideais. E ao pessoal do Confar, sempre amigos.

Agradeço ao pessoal do B10T pela convivência e pela conversa: Claudia Celli, Marcos, Maurício, Flávio, Márcia, Fabinho, Luis Gustavo, Guilherme, Tatiana, Cléo, Neusa, Teresa, Mimi. Especialmente a Talita, aluna de IC, que me ajudou nos resultados experimentais.

Ao Xuds, Prof. Politi, sempre disposto a conversar sobre físico-química.

À Prof^ª. Lígia Gomes, FCF-USP, minha primeira orientadora de Iniciação Científica, que me apoiou e me apresentou a Prof. Iolanda, o Prof. Hernan e o Prof. Pedro, do IQ-USP, B10T.

Agradeço ao Prof. Walter Colli e ao Prof. Robert Ivan Schumacher, pelos momentos de monitoria que me proporcionaram um enorme conhecimento além da ótima companhia.

Também preciso mencionar o prazer de conhecer o Prof. Bayardo Torres, uma experiência sem igual, um exemplo de pessoa e mestre.

Por fim, agradeço ao meu companheiro Kenichi pelo amor e carinho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MICELAS E LIPOSSOMOS	1
1.2 REAÇÃO DE OXIMÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO	4
2. SEÇÃO TEÓRICA	13
2.1. Reações em Micelas.....	13
2.2. Tratamento pelo Modelo de Pseudofase para Reações Bimoleculares.....	15
3. SEÇÃO EXPERIMENTAL	19
3.1. Materiais	19
3.2. Métodos	21
3.2.1. Preparação das Vesículas de DODAC	21
3.2.2. Medida da Constante de Incorporação da Oxima I (K_{HA}).....	21
3.2.3. Determinação do pK_a	21
3.2.4. Determinação do pK_{ap} nos agregados	23
3.2.5. Cinéticas com PNPDP	23
3.2.6.Cálculo do Ajuste da Teoria de Pseudofase com considerações de Troca Iônica aos dados experimentais	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Determinação das constantes de Incorporação de oximas, K_{HA} , em Micelas e Lipossomos	24
4.2. Determinação do pK_a das Oximas em Água.....	25
4.3. Medidas de pK_a aparente (pK_{ap}) de oximas em micelas e lipossomos	27
4.4. Determinação das Constantes de Velocidade de Segunda Ordem de Hidrólise e de Oximólise do PNPDP	32
4.5. Hidrólise de PNPDP em Micelas e Lipossomos	35
4.6. Oximólise de PNPDP em Micelas e Lipossomos.....	37
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - (A) Micelas; (B) Lipossomos.....	3
Esquema 2 - Esquema ilustrando uma micela catiônica, monômeros ( ) e contraíons (-); estão identificadas as camadas de Stern e Gouy-Chapman.	4
Esquema 3 - Fórmula Geral dos ésteres organofosforados.....	5
Esquema 4 - Compostos organofosforados tóxicos. Estruturas de (A) agentes neurotóxicos do tipo G; (B) agentes neurotóxicos do tipo V; (C) pesticidas e inseticidas.	5
Esquema 5 - (A) Sítio ativo da enzima acetilcolinesterase; (B) Sítio ativo da AChE inibido por organofosforado (OP) por ligação covalente na Serina 203; (C) Esquema de ligação de OP na serina ativa da enzima AChE.....	6
Esquema 6 - Hidrólise Alcalina de p-Nitrofenildifenilfosfato (PNPDPP) em solução aquosa contendo surfactante levando a formação do íon p-nitrofenóxido. ²³	8
Esquema 7 - Reação do agente químico neurotóxico VX com íons hidróxido.	8
Esquema 8 - Algumas espécies que apresentam o efeito α em processos nucleofílicos.	9
Esquema 9 - Reação de organofosforado com íon oximato.	10
Esquema 10 - A espécie desprotonada da oxima é a espécie ativa.	11
Esquema 11 - Ilustração da espécie ativa da oxima reagindo com o OP ligado a serina, levando a regeneração da acetilcolinesterase.	11
Esquema 12 - (A) Ilustração de uma micela de HPS, ⁵⁵ (B) orientação do dipolo da cabeça polar do HPS. ⁵⁴	13
Esquema 13 - Ilustração da distribuição do substrato nas fases aquosa e micelar e as respectivas constantes de velocidade.	13
Esquema 14 - Distribuição de S e N entre micelas e meio aquoso.	15
Esquema 15 - pK_{ap} de um ácido fraco H^+A^- na presença de anfifílico positivo D^+Y^-	17
Esquema 16 - Nome e estrutura dos surfactantes utilizados neste trabalho.	19
Esquema 17 - Nome e estrutura das oximas utilizadas nesse trabalho.	20
Esquema 18 - Equilíbrio entre as formas protonada e desprotonada da oxima.	22
Esquema 19 - Estrutura de ressonância da pralidoxima desprotonada, forma isomérica E. ⁹⁰	42
Esquema 20 - Estruturas de oximas (1 a 20) e de substratos organofosforados (a-d) descritos na literatura.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Espectros da Oxima I, HCl $1,0 \times 10^{-3}$ M, OXIMA I $6,7 \times 10^{-5}$ M. (a) sem detergente, $\lambda_{\max}$ em 241 nm; (b) CTAC 0,1 M, $\lambda_{\max}$ em 246 nm. 24
- Figura 2** – Determinação da constante de associação da Oxima I em CTAC. Oxima I $2,23 \times 10^{-5}$ M, HCl 1×10^{-3} M. 25
- Figura 3** – (A) Espectro da oxima I em HCl 0,01 M (a) e em NaOH 0,1 M (b), [oxima I] $6,7 \times 10^{-5}$ M; (B) Espectro da Oxima V em HCl 0,1 M (a) e em NaOH 0,1 M (b), [oxima V] $1,7 \times 10^{-5}$ M. 26
- Figura 4** – Efeito das CTAC no pK_{ap} das Oximas. Símbolos são dados experimentais e linhas são ajustes usando PIE. Oxima I em tampão TEA/HCl 0,02 M pH 11,3 ($\cdots\circ\cdots$), II ($--\square--$) e III ($--x--$) TEA/HCl 0,020 M pH 11,7, IV em Tris/HCl 0,01 M pH 7,5 ($--\triangle--$) e V em Borato 0,02 M pH 8,5 ($--\diamond--$). [OXIMA] $6,7 \times 10^{-5}$ M para I, II, IV e V e $1,0 \times 10^{-4}$ para a oxima III. 27
- Figura 5** – Efeito de DODAC no pK_{ap} das Oximas. Símbolos correspondem dados experimentais e linhas são ajustes teóricos segundo PIE. Oxima I em tampão TEA/HCl 0,02 M pH 11,3 ($\cdots\circ\cdots$) e IV em Tris/HCl 0,01 M pH 7,5 ($--\triangle--$). [OXIMA] $6,7 \times 10^{-5}$ M. Os parâmetros utilizados no ajuste teórico foram: 29
- Figura 6** – Efeito de HPS no pK_{ap} das Oximas. Símbolos correspondem a dados experimentais e linhas a ajustes teóricos segundo modelo PP, Equação 4. Oxima II ($--\square--$) e III ($--x--$) em NaOH 0,05 M e IV ($--\triangle--$) em Tris/HCl 0,01 M pH 7,7. A concentração das oximas I, II, IV e V foi de $6,7 \times 10^{-5}$ M, e da oxima III foi $1,0 \times 10^{-4}$ 30
- Figura 8** – Efeito da [NaOH] na reação de hidrólise alcalina de PNDPP. [PNDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M. . 32
- Figura 9** – Determinação do k_{ox}^2 da [Oxima I]. [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M, tampão bicarbonato 0,05 M, pH 11,1. 34
- Figura 10** – Determinação do k_{ox}^2 da [Oxima V]. [PNPDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M, Tampão Borato 0,01 M, pH=8,3. 34
- Figura 11** – Efeito de micelas de [CTAC] na hidrólise alcalina do PNDPP em vários tampões. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PIE, Equação 6. MES 0,01, pH 6,0 ($--\diamond--$); Tris/HCl 0,01, pH 7,0 ($--\triangle--$); Tris/HCl 0,01, pH 9,0 ($\cdots\circ\cdots$) e Borato 0,01, pH 9,6 ($--\square--$). [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M. 35
- Figura 12** – Efeito de lipossomos de [DODAC] na hidrólise alcalina do PNDPP em vários tampões. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PIE, Equação 6. MES 0,01 M, pH 6,5 ($--\triangle--$) e Borato 0,01 M, pH 8,5 ($\cdots\circ\cdots$). [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M. 35
- Figura 13** – Efeito de micelas de HPS na hidrólise alcalina do PNDPP em vários tampões. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PP, Equação 5. Tampão Borato 0,020 M pH 10,2 ($\cdots\circ\cdots$); tampão Borato 0,020 M pH 10,0 ($--\square--$); tampão Borato 0,020 M pH 9,0 ($--\diamond--$); tampão Tris/HCl 0,010 M pH 8,5 ($--x--$) e tampão Tris/HCl 0,020 M pH 7,5 ($--\triangle--$). [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M. 36
- Figura 14** – Efeito de CTAC na k_{ψ} das Oximas I e IV. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PIE. Oxima I, Tris/HCl 0,01 M pH 9,0 ($\cdots\bullet\cdots$) e Borato 0,01 M pH 9,6 ($--\blacksquare--$). Oxima IV em MES 0,01 M pH 6,0 ($--\blacklozenge--$) e Tris/HCl 0,01 M pH 7,0 ($--\blacktriangle--$). [OXIMA] = $6,7 \times 10^{-5}$ M, [PNPDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M. 37
- Figura 15** – Oximólise de PNDPP em lipossomos de DODAC e oximas I e IV. Símbolos são experimentais e linhas são teóricas segundo modelo PIE, equação 7. Oxima I, tampão Borato 0,02 M pH 8,7 ($\cdots\bullet\cdots$) e Oxima IV, tampão MES 0,01 M pH 6,0 ($--\blacklozenge--$) e MES 0,01 M pH 6,5 ($--\blacktriangle--$). [OXIMA] = $6,7 \times 10^{-5}$ M, [PNPDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M. 39
- Figura 16** – Cinética de Oximas II, III e IV em HPS. Símbolos são experimentais e linhas teóricas. Oxima II, tampão Borato 0,02 M pH 10,0 ($\cdots\bullet\cdots$); Oxima III, tampão Borato 0,02 M pH 10,2 ($--\blacksquare--$), oxima IV em Tris/HCl 0,02 M pH 7,5 ($--\blacktriangle--$) e Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 ($--x--$). [OXIMA] = $6,7 \times 10^{-5}$ M, [PNPDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M. Inseto: Efeito da [Tris/HCl] pH 8,5: 0,010 M ($--\blacktriangle--$), 0,018 M ($\blacklozenge$), 0,025 M (+), 0,050 M (x) e 0,010 M com 0,050 M de NaCl ($\blacktriangledown$). 40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados nas curvas teóricas de pK_{ap} em CTAC.	28
Tabela 2 - Parâmetros utilizados no ajuste do pK_{ap} em DODAC.	29
Tabela 3 - Parâmetros utilizados nas curvas teóricas de pK_{ap} em HPS	30
$K_a = 1,12 \times 10^{-12}$ (OXIMAS II E III); $K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMAS IV).	30
Tabela 4 - Efeito da concentração do tampão Tris/HCl, pH 8,5, nos parâmetros teóricos utilizados no ajuste de pK_{ap} da oxima IV em HPS.....	31
Tabela 5 - Constantes de segunda ordem de hidrólise alcalina, k_{OH}^2 , e de oximólise, k_{ox}^2 , de PNPDP.	33
Tabela 6 - Hidrólise de PNPDP em micelas e vesículas.	36
Tabela 7 - Parâmetros utilizados no ajuste teóricos das cinéticas de oximólise em CTAC. ..	38
Tabela 8 - Parâmetros utilizados no ajuste teóricos das cinéticas de oximólise em DODAC.	39
Tabela 9 - Parâmetros utilizados no ajuste teóricos das cinéticas de oximólise em HPS.	41
Tabela 10 - Compilação de parâmetros experimentais e calculados obtidos.	45
Tabela 11 - Dados comparativos dos resultados publicados na literatura obtidos para a reação de oximólise de organofosforados em micelas a 25°C.	47

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A - forma desprotonada do ácido fraco;

Abs_{HOx} - absorbância da forma protonada da oxima;

Abs_{Ox^-} - absorbância da forma desprotonada da oxima;

Abs_{ψ} - absorbância da oxima a um pH fixo;

Ache - acetilcolinesterase;

AF - fator de aceleração ($k_{\psi_{MAX}} / k_{\psi}^o$);

AFM - fator de aceleração na micela (k_m^2 / k_{OX}^2);

α - grau de dissociação da micela;

b - subscrito corresponde à forma ligada às micelas;

$[BY]_T$ - concentração total de sal adicionado;

C_D - concentração de detergente total menos a CMC;

CMC - concentração micelar crítica;

CTAC - cloreto de hexadeciltrimetilamônio;

DGP - dihexadecilfosfato;

D_h - diâmetro hidrodinâmico;

DODAC - Cloreto de dioctadecildimetilamônio;

Efeito α - aumento da reatividade de nucleófilos;

f - subscrito corresponde à substância livre (free) em fase aquosa;

$[H^+]$ - a concentração de H^+ livre em fase aquosa;

HA - forma desprotonada do ácido fraco;

HOx - espécie protonada da oxima;

HPS - N-Hexadecil-N,N-dimetil-1-propanosulfato;

K_A - constante de incorporação da forma desprotonada de um ácido fraco;

K_{HA} - constante de incorporação da forma protonada de um ácido fraco;

$K_{OH/Y}$ - constante de troca do íon OH^- com o contra-íon da micela;

K_w - constante de equilíbrio da água (Produto Iônico da Água);

K_a - constante de equilíbrio de um ácido fraco em água;

K_s - constante de incorporação do substrato neutro;

$K_{A/Y}$ - constante de troca da espécie aniônica do ácido fraco com o contra-íon da micela;

k_w - constante de velocidade de primeira ordem em água;

k_m - constante de velocidade de primeira ordem em micelas;

k_ψ - constante de velocidade de pseudo-primeira ordem observada para a oximólise de PNPDP;
de PNPDP;

k_m^2 - constante de velocidade de segunda ordem de oximólise de PNPDP em micelas ou vesículas;

k_w^2 - constante de velocidade de segunda ordem da reação em fase aquosa;

k_{OH}^2 - constante de velocidade de segunda ordem de hidrólise alcalina de PNPDP em água;

k_{OX}^2 - constante de velocidade de segunda ordem para oximólise de PNPDP em água;

k_ψ^o - constante de velocidade observada em água;

$k_{\psi_{MAX}}$ - máxima constante de velocidade de pseudo-primeira ordem observada para a oximólise de PNPDP;

$\lambda_{máx}$ - valor do comprimento de onda de máxima absorção;

m - subscrito corresponde à fase micelar;

N - reagente nucleófilo (oxima);

$[N_T]$ - concentração total de reagente;

OP - organofosforado;

Ox^- - espécie desprotonada da oxima, íon oximato;

Oxima I - acetofenoxima;

Oxima II - ácido 10-fenil-10-hidroxiiminodecanóico;

Oxima III - 4-(9-carboxinonil)-1-(9-carboxi-1-hidroxiiminononil) benzeno;

Oxima IV - cloreto de N-dodecilpiridina;

Oxima V - cloreto de N-metilpiridina 2-aldoxima;

pH_{Exp} - é o pH no experimental qual a substância se encontra parcialmente ionizada.

PIE - teoria pseudofase com considerações de troca iônica;

pK_a - $-\log$ de K_a ;

pK_{ap} - pK_a aparente, constante de equilíbrio de um ácido fraco na presença de concentrações definidas de micelas (C_D);

PNPDPP - *p*-Nitrofenildifenilfosfato;

PP - teoria de pseudofase;

S - substrato (PNPDPP);

$[S_m]$ - concentração de substrato micelizado;

$[S_w]$ - concentração de substrato no meio aquoso;

$[S_T]$ - concentração total do substrato;

$t_{1/2}$ - meia vida de uma reação;

TEA - Trietilamina;

Tris - tris(hidroximetil)aminometano;

$\bar{V}$ - volume molar do detergente micelizado;

w - subscrito corresponde à fase aquosa;

Y - concentração do contra-íon da micela;

RESUMO

Oximas têm sido extensivamente usadas como antídoto para envenenamento por organofosforados e como descontaminante. Micelas e vesículas, utilizadas como catalisadores e transportadores de drogas, constituem agentes potenciais para tratamento e descontaminação. Neste trabalho descrevemos a reação de *p*-Nitrofenildifenilfosfato (PNPDPP), um substrato modelo para organofosforado, com: acetofenoxima (I); ácido 10-fenil-10-hidroxiiminodecanóico (II); 4-(9-carboxinonanil)-1-(9-carboxi-1-hidroxiimino nonanil) benzeno (III); cloreto de N-dodecilpiridina (IV); cloreto N-metilpiridina 2-aldoxima (V), na presença de micelas catiônicas e zwitteriônicas de cloreto de hexadeciltrimetilamônio, CTAC e N-Hexadecil-N,N-dimetil-1-propano sulfonato, HPS, respectivamente, e vesículas catiônicas de dioctadecildimetilamônio, DODAC.

O pK_a aparente, pK_{ap} , das oximas em agregados de anfifílicos, a constante de velocidade de segunda ordem de oximólise em micelas ou vesículas, k_m^2 , e as constantes de velocidade observadas para a oximólise de PNPDPP, k_ψ , foram determinadas espectrofotometricamente, a pH constante, variando-se a concentração dos anfifílicos. Os resultados foram analisados usando as teorias: modelo de pseudofase (PP) e modelo de pseudofase com considerações de troca iônica (PIE), descrita na literatura pelo nosso grupo.

As constantes de segunda ordem para oximólise de PNPDPP em água, k_{OX}^2 , determinadas foram $6,5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (I, II e III) e $2,8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (IV e V). O k_ψ máximo em micelas e vesículas, $k_{\psi_{MAX}}$, e o k_ψ em água, k_w , no mesmo pH, foram utilizadas para calcular o fator de aceleração máxima, AF, para cada anfifílico ($AF = k_{\psi_{MAX}} / k_w$). Os agregados catalisam a decomposição de PNPDPP e os valores de AF (e k_m^2) foram da ordem de 10^4 (32 min^{-1}), 10^4 (125 min^{-1}) e 10^6 (80 min^{-1}) para a reação da oxima IV com CTAC, HPS e DODAC, respectivamente. A análise quantitativa da dependência da concentração de agregados anfifílicos na oximólise mostrou um considerável aumento da constante de velocidade da reação produzido por micelas e vesículas (maior que 8×10^6 vezes). Esse efeito é parcialmente devido a: concentração local dos reagentes, efeitos nos pK_a dos nucleófilos e, mais importante, mudança na reatividade intrínseca das oximas.

ABSTRACT

Oximes have been extensively used as antidotes and decontaminants of organophosphates. Micelles and vesicles, catalysts and drug transport agents, constitute potential vehicles for Oxime treatment. Here we describe the reaction of p-Nitrophenyldiphenylphosphate (PNPDPP) with: acetophenoxime (I); 10-phenyl-10-hydroxyiminodecanoic acid (II); 4-(9-carboxynonyl)-1-(9-carboxy-1-hydroxyiminononyl) benzene (III); N-dodecylpyridinium chloride (IV); N-methylpyridinium 2-aldoxime chloride (V), in the presence of cationic and zwitterionic micelles, hexadecyltrimethylammonium chloride, CTAC and N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-1-propanesulfate, HPS, respectively, and cationic vesicles of dioctadecyldimethylammonium, DODAC.

The apparent pK_a , pK_{ap} , of the oximes in the amphiphile aggregates, the second order rate constants of oximolysis in micelles and vesicles, k_m , and the observed rate constants for PNPDPP oximolysis, k_ψ , were determined spectrophotometrically at constant pH varying amphiphilic concentrations. The results were analyzed using the pseudo-phase theory (PP) and pseudo-phase/ion exchange (PIE).

The second order rate constant for (uncatalyzed) oximolysis of PNPDPP were $6.5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (I, II and III) and $2.77 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (IV and V). From the maximum value of k_ψ in micelles and vesicles, $k_{\psi_{MAX}}$, and the value of k_ψ in water, k_w , at the same pH, the maximum acceleration factor, AF, were calculated ($AF = k_{\psi_{MAX}} / k_w$). The amphiphiles catalyzed the oximolysis of PNPDPP and the values of AF (and k_m^2) were ca 10^4 (32 min^{-1}), 10^4 (125 min^{-1}) and 10^6 (80 min^{-1}) for the reactions of Oxime IV in CTAC, HPS and DODAC, respectively. Quantitative analysis of the amphiphile concentration-dependence of rates demonstrated that the considerable rate increase produced by micelles and vesicles on the rate of oximolysis (up to 8×10^6 fold) is partly due to reagent concentration in the aggregate, effects on the pK_a of the nucleophiles and, more importantly, catalysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 MICELAS E LIPOSSOMOS

Em 1913, McBain¹ postulou que soluções diluídas de sais de ácidos graxos formam, espontaneamente, agregados dinâmicos, chamados de micelas, Esquema 1. A agregação ocorre cooperativamente em soluções de anfifílicos naturais ou sintéticos. Esses compostos, também chamados de surfactantes, agentes tensoativos ou detergentes, são moléculas anfifílicas que possuem cadeias de hidrocarbonetos (região hidrofóbica) ligadas a grupos iônicos ou polares (região hidrofílica). Dependendo da estrutura dos grupos polares, os surfactantes podem ser neutros, catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos. A porção apolar pode diferir no comprimento, na presença de insaturações e/ou consistir de duas ou mais cadeias carbônicas.²

Surfactantes de cadeias simples se agregam formando micelas, Esquema 1, pequenas estruturas que espalham luz em comprimentos de onda abaixo de 400 nm.²

Acima de um estreito limite de concentração ocorre uma repentina mudança das propriedades físicas das soluções de surfactantes em água. Essa transição, que corresponde à formação de agregados, é definida como concentração micelar crítica (CMC). Quando a concentração do surfactante excede a CMC, a concentração de monômero livre permanece relativamente constante e todo o surfactante adicional forma micelas.³

Em soluções diluídas, micelas iônicas são aproximadamente esféricas, mas em altas concentrações de surfactantes ou com a adição de sal, os agregados podem se tornar elípticos ou cilíndricos. A CMC e a forma das micelas podem ser alteradas pelo comprimento da cadeia do surfactante, pela estrutura e carga da cabeça, pelo tipo e concentração do contra-íon e pela adição de solventes.^{2,4,5}

Foi em 1964 que Bangham e Horne⁶ primeiramente descreveram as vesículas, formadas por bicamadas fechadas compostas por fosfolipídios, Esquema 1. O trabalho de Kunitake e colaboradores,⁷ mostra que um anfifílico sintético, brometo de dioctadecildimetilamônio, DODAB, forma vesículas, marcando o início da química de membranas biomiméticas. Logo depois o universo das vesículas formadas por anfifílicos sintéticos foi estendido para anfifílicos negativos, o dihexadecilfosfato, DCP, descrito por Chaimovich e colaboradores.⁸

Lipossomos são vesículas formadas a partir de fosfolipídios. Os agregados formados por anfifílicos sintéticos são chamados de vesículas de surfactantes.³ Vesículas de surfactantes, especialmente aquelas contendo duas cadeias alquílicas, se comportam

de forma muito semelhante aos lipossomos. Uma vez formadas são estáveis em solução aquosa contendo eletrólitos em concentrações não superiores a 10^{-2} M. Porém, em tempos longos, pode ocorrer fusão vesícula-vesícula, assim como ocorre com os lipossomos. Nesse trabalho trataremos vesículas de anfifílicos como sendo lipossomos.

Os lipossomos são formados pela hidratação de filmes lipídicos secos resultando na formação espontânea de lipossomos multilamelares. Um filme é depositado num frasco com a evaporação de uma solução de clorofórmio contendo lipídios. O solvente é completamente removido em dessecador sob vácuo por algumas horas. O filme lipídico seco é, então, ressuspensão por agitação em vórtice com solução apropriada. Esse método foi desenvolvido por Bangham.⁹

Lipossomos unilamelares com distribuição de tamanho uniforme podem ser mais apropriados e podem ser preparados pelo método de sonicação.⁸ Num dos métodos uma sonda de titânio do sonicador é diretamente inserida na amostra de lipossomos multilamelares. A inserção da sonda diretamente na dispersão lipídica resulta em grande energia aplicada e também em curtos períodos de sonicação, se comparado a sonicação em banho. Fragmentos de titânio liberados precisam ser removidos por centrifugação. A temperatura é mantida acima da temperatura de transição de fase do lipídio, pois a sonicação em temperatura abaixo da transição de fase leva a formação de lipossomos com defeitos estruturais.³ Este método, dependendo do tempo de sonicação, forma lipossomos, na sua maioria, unilamelares e com diâmetros da ordem de 250 Å.

As propriedades dos lipossomos estão intimamente relacionadas com a natureza e composição dos anfifílicos usados na preparação, diferentes grupos polares têm diferentes conformações e mobilidades. A conformação das cabeças polares é alterada como consequência da transição de fase, adição de eletrólitos e substratos.

A transição de fase gel-fluido de vesículas de DODAC ocorre em temperaturas de pré-transição de 30°C e transição de 50°C, porém, podem variar com as condições experimentais.^{3,11}

O número de moléculas de água que hidratam as cabeças lipídicas e as forças da interação água-lipídio influenciam fortemente a formação e as propriedades dos lipossomos. Vários tipos de interações água-lipídio podem ser distinguidos. Moléculas de água hidratam uma porção da bicamada, cabeças polares e poucos carbonos da cadeia alquílica. Outras moléculas de água, que ocupam a maior porção do lipossomo, podem estar encapsuladas no compartimento aquoso interno. As forças de hidratação provocam uma barreira energética que previne a aproximação de um lipossomo com outro.^{12, 13}

Interações hidrofóbicas entre as cadeias de hidrocarbonetos e repulsões eletrostáticas entre os grupos polares – forças de repulsão¹⁴ – são responsáveis pela auto-associação entre lipídios. Baseado na geometria do monômero a formação de vesículas

requer surfactantes com duas cadeias alquílicas enquanto que surfactantes com uma cadeia alquílica se associam formando micelas. Existem, porém, vários exemplos em que anfífilos com uma única cadeia podem se associar, em condições estritas, para formar vesículas e lipossomos.^{15, 16}

Dependendo do raio da vesícula, a monocamada interna pode possuir menos lipídios que a monocamada externa e a espessura de uma bicamada de lipídios é da ordem de 5 nm.¹⁷ Modelos estruturais apropriados precisam levar em consideração as interações cadeia-cadeia, cabeça-cabeça e cadeia-cabeça nas bicamadas.^{10, 18}

A organização dos anfífilos em água cria agregados que possuem propriedades únicas em solução e podem assumir várias formas, dependendo da estrutura do anfílico e da composição da solução, mas todos têm como característica comum, regiões interfaciais separando a fase aquosa polar da região apolar de hidrocarbonetos.

Esquema 1 - (A) Micelas; (B) Lipossomos.

Micelas e outros agregados coloidais, como os lipossomos, podem agir como “microreatores”, compartimentalizando, concentrando ou separando reagentes e alterando as constantes de velocidade e de equilíbrio de reações químicas.²

A carga elétrica de uma micela é parcialmente neutralizada por contra-íons. A camada aquosa imediatamente adjacente à superfície é chamada de camada de Stern. Nessa camada os contra-íons estão fortemente adsorvidos e migram com a micela. De acordo com o modelo mais aceito, os grupos polares das moléculas de surfactantes também se situam nesta camada. A segunda camada, camada difusa (Gouy-Chapman) contém, na ausência de sal adicionado, os contra-íons que mantêm o sistema electricamente neutro. A diminuição da concentração local a partir da Camada de Stern é exponencial.

A catálise micelar decorre, sobretudo, pelo aumento da concentração dos reagentes no pequeno volume da camada de Stern.

Assim, micelas catiônicas aumentam a velocidade de reações nucleofílicas entre um substrato não iônico e nucleófilos aniônicos.²

Esquema 2 - Esquema ilustrando uma micela catiônica, monômeros (🧴) e contra-íons (-); estão identificadas as camadas de Stern e Gouy-Chapman.

A camada de Stern, Esquema 2, tem a espessura aproximada do tamanho da cabeça polar do anfifílico, contra-íons (0.6-0.9 contra-íons/monômero) e água. A camada de Stern é uma região extremamente anisotrópica com propriedades intermediárias entre água e hidrocarboneto.

1.2 REAÇÃO DE OXIMÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO

Alguns derivados orgânicos do ácido fosfórico são tóxicos e têm penetração cutânea, em maior ou menor extensão. Esses produtos, além dos inseticidas, são utilizados como gases de guerra, e na forma granulada são usados clandestinamente como raticidas.¹⁹

A fórmula geral dos OP pode ser representada por:¹⁹

Esquema 3 – Fórmula Geral dos ésteres organofosforados.

O desenvolvimento de gases de guerra, como os agentes G e V, está intimamente ligado ao desenvolvimento dos inseticidas, como Paraoxon e Paration.²⁰

As estruturas de agentes químicos neurotóxicos tipicamente utilizados estão mostradas a seguir:

Esquema 4 – Compostos organofosforados tóxicos. Estruturas de (A) agentes neurotóxicos do tipo G; (B) agentes neurotóxicos do tipo V; (C) pesticidas e inseticidas.

Os organofosforados (OP) inibem a ação da enzima acetilcolinesterase,²¹ esquema 5A. Esses se ligam fortemente ao centro esterásico da acetilcolinesterase (Ache), esquema 5B e 5C, impossibilitando-a de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina. O acúmulo de acetilcolina nas sinapses provoca uma hiperatividade nervosa e conseqüente colapso do sistema nervoso.

Esquema 5 – (A) Sítio ativo da enzima acetilcolinesterase; (B) Sítio ativo da AChE inibido por organofosforado (OP) por ligação covalente na Serina 203; (C) Esquema de ligação de OP na serina ativa da enzima AChE.

Um grande número de OP, substâncias químicas neurotóxicas, são potenciais candidatos a detoxificação, desde pesticidas, inseticidas a agentes químicos de guerra.

Na detoxificação o agente é quimicamente transformado num composto (ou compostos) não tóxico ou menos tóxico. A descontaminação é mais genérica e pode se referir à destruição química (detoxificação) ou simplesmente à remoção física da área de interesse.

OP podem ser detoxificados oxidativamente em solução aquosa. Como resultados de uma série de estudos, um número de oxidantes contendo peróxido de hidrogênio e monoperoxiftalato são usados como sendo efetivos para degradar alguns tipos dessas substâncias. Uma solução aquosa de um oxidante comercial, Oxone (componente ativo: KHSO₅), é recomendada para detoxificar e destruir VX em larga escala

(mais que 51 g). A solução aquosa de Oxone age como um tampão ácido (pH 1,9) podendo dissolver grandes quantidades de VX seguido por uma rápida oxidação da ligação P-S. Porém, para agentes neurotóxicos do tipo G, os quais possuem ligações P-F, reações com Oxone são relativamente lentas. Portanto, Oxone consegue descontaminar agentes neurotóxicos do tipo V, mas não conseguem detoxificar rapidamente agentes G.²⁰

Como alternativa, a hidrólise básica é uma das mais extensivas classes de reações estudadas para a descontaminação de substâncias tóxicas como os organofosforados.²²

A eliminação de agentes químicos de guerra tóxicos é uma necessidade no campo de batalha, bem como em laboratórios, plantas piloto, produção de agentes químicos, estoques e sítios de destruição. A maior parte da pesquisa está focada nas condições de campo de batalha, onde a facilidade e a agilidade da aplicação de descontaminantes são essenciais.²⁰

Embora muitas reações químicas possam ser empregadas para detoxificar agentes químicos de guerra, somente algumas na prática podem ser utilizadas em uma neutralização, porque essas reações precisam ser simples e os reagentes empregados devem ser estáveis e baratos.²³

As cinéticas e os mecanismos de reação são fortemente afetados pelas propriedades dos solventes, o meio de reação é uma importante variável a ser controlada para uma reação de descontaminação. O meio de reação ótimo é aquele que tem a capacidade de dissolver os reagentes e promover a reação desejada.

Desta forma, os agregados anfílicos podem ser utilizados como meio de dissolução e de reação, uma vez que os agentes químicos a serem descontaminados, geralmente, têm solubilidade limitada em água. O sistema de surfactantes, portanto, contém as características essenciais para poder solubilizar quantidades de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas e também funcionar como meio de reação, que podem ocorrer em velocidades bem razoáveis.²²

p-Nitrofenil difenil fosfato, PNPDPF, é um dos mais utilizados modelos de compostos fosforados tóxicos.²⁴ Existem muitas razões pelas quais este substrato é muito conveniente. Ele é razoavelmente estável e rapidamente preparado em quantidades suficientes para os estudos cinéticos. É sólido, podendo ser facilmente pesado, e a reação pode ser seguida espectrofotometricamente, como resultado da formação do íon *p*-nitrofenóxido, a 400 nm.²⁵ A solubilidade de PNPDPF em água é muito baixa, o que assegura a sua completa solubilização nos agregados anfífilos.

Esquema 6 – Hidrólise Alcalina de *p*-Nitrofenildifenilfosfato (PNPDPP) em solução aquosa contendo surfactante levando a formação do íon *p*-nitrofenóxido.²³

As reações químicas empregadas para descontaminar ou neutralizar esses agentes são, normalmente, hidrólise, substituição nucleofílica ou oxidação usando reagentes em meio aquoso, como hidróxido ou sais de hipoclorito. Um método bastante eficiente para detoxificar quantidades pequenas desses compostos em superfícies contaminadas ou contêineres consiste no uso de uma solução líquida contendo excesso de reagentes para converter rapidamente, e à temperatura ambiente, os compostos em produtos significativamente menos tóxicos. Entretanto, esse procedimento não é eficiente para a destruição de todos os agentes neurotóxicos. Como exemplo, o VX, esquema 7, tem solubilidade limitada em meio básico, reage lentamente com íons hidróxido ($t_{1/2} = 31$ min com NaOH 0,1 M a 22°C)²⁷ e ainda produz um subproduto estável e altamente tóxico, o ácido tióico.

Esquema 7 – Reação do agente químico neurotóxico VX com íons hidróxido.

Assim, o VX requer uma química diferente. Uma alternativa é o uso de oxidantes, porém, em geral, eles têm um $t_{1/2}$ curto. Uma estratégia alternativa consiste no uso de nucleófilos mais estáveis, que produzam clivagem quantitativa da ligação P-O. Dentro desta alternativa, a utilização de nucleófilos detentores de efeito α constitui uma estratégia vantajosa.²⁸

O efeito α é definido como o aumento da reatividade de nucleófilos que tem pares de elétrons não compartilhados sobre o átomo adjacente ao centro nucleofílico, quando comparados a um nucleófilo normal (nucleófilo que não possui efeito α) de mesma basicidade. Dentre as espécies que possuem esta reatividade inusitada, estão incluídas a hidroxilamina, a hidrazina, o ânion hipoclorito, os ácidos hidroxâmicos, as oximas, os hidroperóxidos, o nitrito e o sulfito.²⁸

Esquema 8 – Algumas espécies que apresentam o efeito α em processos nucleofílicos.

As oximas, forma geral $R_1R_2C=NOR_3$, são compostos orgânicos que apresentam o grupo hidroximiino. São derivadas das cetonas e dos aldeídos através de reação compreendida em duas etapas: a adição de hidroxilamina e a desidratação da carbinolamina, também denominada semicarbazona. As oximas são encontradas sob duas formas geométricas distintas, a forma E (rearranjo trans) e a forma Z (rearranjo cis).²⁹ Uma característica importante das formas isoméricas é a de que apresentam diferenças de reatividade na oximólise de ésteres aromáticos. Em média a constante de segunda ordem de oximólise da forma Z é cerca de 30 a 40 vezes maior que a forma E,³⁰ enquanto que a forma Z apresenta um pK_a cerca de uma unidade acima do correspondente isômero E,³¹ sendo este quatro vezes mais ácido que a forma Z.³² As oximas são nucleófilos e agentes eficientes para a detoxificação de ésteres de organofosforados tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para a reação de oximólise admite-se que ocorre a formação um intermediário tetraédrico. O ataque do nucleófilo à carbonila é a etapa determinante, sendo que a

decomposição do intermediário tetraédrico é rápida.³⁰ Os íons oximato são supernucleófilos de efeito α .³⁰ A seguir está apresentado um esquema para a formação e a quebra do intermediário oxima-fosforil:

Esquema 9 – Reação de organofosforado com íon oximato.

O esquema 9 mostra o produto de reação e o mecanismo das vias A e B de decomposição de PNPDP por íons oximato. A via A mostra a formação de p-nitrofenóxido ($PNPO^-$). A via B, formação de fenóxido (PhO^-), e tem pouca contribuição para a reação. Portanto, a reação é acompanhada pela variação da formação de produto colorido, via A, com absorção UV-Visível a 400 nm,⁴¹ que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção do p-nitrofenóxido, liberado da reação de hidrólise de PNPDP por íons oximato.

Devido ao efeito α , os íons oximato são da ordem de 100 vezes mais reativos que os íons fenolato de mesmo pK_a .³⁴

As oximas são reativadoras da Acetilcolinesterase. No Brasil, a Pralidoxima, uma oxima muito utilizada como antídoto contra envenenamento, está disponível sob o nome comercial de Contrathion (N-metil-alfa-piridilaldoxima). As oximas desprotonadas (Esquema 10) reagem diretamente com a enzima fosforilada, restabelecendo o centro ativo, por serem doadores de próton, H^+ , o que contribuirá para deslocar o radical fosfato ligado ao centro esterásico da acetilcolinesterase, Ache.

Esquema 10 – A espécie desprotonada da oxima é a espécie ativa.

Uma ilustração do mecanismo de regeneração da Ache, inibida por um organofosforado, pelo antídoto pralidoxima está mostrado no esquema 10.

Esquema 11 - Ilustração da espécie ativa da oxima reagindo com o OP ligado a serina, levando a regeneração da acetilcolinesterase.

O meio de reação deve ter a capacidade de dissolver os reagentes e promover a reação desejada. Isso não ocorre com facilidade na reação de PNPDP e Pralidoxima, uma vez que o éster tem característica hidrofóbica e o antídoto, a oxima, é hidrofílica. Portanto, as oximas em água não satisfazem as necessidades de decomposição rápida para ésteres organofosforados estáveis e tóxicos, como Paration e Vx.

Contudo, é conhecido na literatura, que a velocidade de oximólise do éster de fosfato é aumentada na presença de surfactantes catiônicos.³⁴⁻⁴⁸ Nessas condições, observa-se que, dependendo da solubilidade dos reagentes nas micelas, as constantes de velocidade aumentam notavelmente acima da CMC, chegando a um máximo e, então, decrescendo. Esse comportamento é classicamente explicado pelo modelo de pseudofase com considerações de troca iônica (PIE),^{49, 50} descrito na Seção Teórica. Esse modelo considera que ocorre uma competição pela interface da micela, onde a reação ocorre, entre o nucleófilo oximato e os contra-íons não reativos do surfactante.

Perguntas deste trabalho:

- Lipossomos, assim como as micelas, são agentes eficientes para acelerar a oximólise de triésteres de fosfato?
- Quais oximas são nucleófilos mais eficientes para decomposição do triésteres de fosfato modelo?

O tratamento teórico utilizado está descrito na primeira seção desta dissertação, Seção Teórica. A segunda seção trata dos materiais e métodos utilizados, Seção Experimental. A seguir temos os dados experimentais desse trabalho com os tratamentos teóricos que foram discutidos na primeira seção, Resultados. Segue a discussão dos resultados obtidos e a validade desses resultados em relação aos objetivos estabelecidos, Discussão e Conclusão. Por fim, uma seção contendo a literatura de apoio, Referências Bibliográficas.

2. SEÇÃO TEÓRICA

2.1. Reações em Micelas

Micelas ligam substratos hidrofóbicos e, adicionalmente, micelas catiônicas atraem íons OH^- e podem acelerar a velocidade de reações entre esses reagentes.^{46, 51-56} Micelas zwiteriônicas de HPS, apesar de neutras, atraem íons e substratos hidrofóbicos e também aumentam a velocidade de algumas reações.⁵⁴⁻⁵⁶

Esquema 12 – (A) Ilustração de uma micela de HPS,⁵⁵ (B) orientação do dipolo da cabeça polar do HPS.⁵⁴

Reação monomoleculares:

Considerando somente a distribuição de um substrato S , teremos:

Esquema 13 – Ilustração da distribuição do substrato nas fases aquosa e micelar e as respectivas constantes de velocidade.

onde, w e m subscritos correspondem a fase aquosa e pseudofase micelar, respectivamente, k_w e k_m são as constantes de velocidade de primeira ordem em fase aquosa e em fase micelar.

A ligação à micela de um substrato neutro, S , é descrita pela constante de ligação, K_s :

$$K_s = \frac{[S_m]}{[S_w][C_D]} \quad (1)$$

onde, $[S_m]$ é a concentração de substrato incorporado na micela, $[S_w]$ é a concentração de substrato na fase aquosa e $[C_D]$ é a concentração total de surfactante menos a CMC, ou seja, surfactante micelizado.

$$velocidade = k_\psi [S_T] = k_m [S_m] + k_w [S_w] \quad (2)$$

$$k_\psi = \frac{k_m K_s D_n + k_w}{1 + D_n K_s} \quad (3)$$

onde, $[S_T]$ é a concentração total do substrato, em mol/Litro e k_ψ é a constante de velocidade observada.

Sendo assim, seguimos com os modelos teóricos utilizados nesse trabalho.

2.2. Tratamento pelo Modelo de Pseudofase para Reações Bimoleculares

Duas premissas são comuns a todos os modelos cinéticos de pseudofase: micelas agem como uma fase separada do meio aquoso; mudanças na constante de velocidade observada, k_{ψ} (e k_2), devido à adição de surfactante e sal dependem grandemente da distribuição dos substratos S e N entre micelas e meio aquoso.

Esquema 14 – Distribuição de S e N entre micelas e meio aquoso.

As velocidades podem ser tratadas como a soma das velocidades de reações concorrentes em cada fase, aquosa e micelar, esquema 14, onde, k_w^2 e k_m^2 são as constantes de velocidade de segunda ordem em meio aquoso e em micelas (ou lipossomos), respectivamente.

Muitas reações estudadas em soluções micelares têm mecanismos bem conhecidos e a maioria dos tratamentos cinéticos é baseada no modelo de pseudofase (PP).^{57, 58} Esse modelo é aceito para a maioria das reações químicas, em que a transferência de material entre água e micelas é tão rápida que a reação não perturba o equilíbrio de distribuição dos reagentes entre as fases.

A catálise micelar de reações bimoleculares fundamenta-se principalmente no fenômeno de aumento da concentração dos reagentes no pequeno volume da micela onde ocorre a reação entre o substrato e o nucleófilo.

A reação estudada nesta dissertação é a reação de oximólise de PNPDPP. O PNPDPP é um composto neutro (equivale ao S) e enquanto que a oxima pode existir na forma protonada (AH) e desprotonada (A). Apenas a forma desprotonada reage com o PNPDPP.

Uma forma de avaliar a reatividade de nucleófilos provenientes da ionização de ácidos fracos quando estes reagem com ésteres de p-nitrofenila é

através de seus respectivos valores de pK_a . A força de um ácido depende de uma série de fatores como: estrutura molecular da forma ácida, forma ionizada e solvente. A constante de ionização de um ácido é diretamente proporcional a basicidade do solvente e, portanto, o valor da constante depende necessariamente do meio.⁵⁹ Para que uma constante de equilíbrio tenha um valor absoluto, é necessário defini-la em termos das atividades das espécies em equilíbrio, pois desta forma, independem do meio.⁶⁰ A variação da constante de dissociação aparente de um ácido, com a concentração de micelas, segundo o modelo de Berezin e col.,^{54,55} é dada por:

$$K_{ap} = K_a \frac{1 + K_A[C_D]}{1 + K_{HA}[C_D]} \quad (4)$$

onde, K_{HA} é a constante de associação da forma protonada do ácido fraco, K_A é a constante de associação da forma desprotonada do ácido fraco. Reagentes entre [] se referem a concentrações molares. $[C_D]$ é a concentração de detergente micelizado (detergente total, $[C_T]$, menos a CMC), K_a é a constante de dissociação do ácido fraco em água e K_{ap} é a constante de dissociação do ácido fraco na presença de $[C_D]$. A equação 5 descreve a velocidade da reação observada nesses sistemas:^{57, 58}

$$k_\psi = \frac{k_m^2 K_A K_S [C_D] + k_w^2}{(1 + K_A [C_D])(1 + K_S [C_D])(1 + [H^+] / K_{ap})} \quad (5)$$

onde, $[H^+]$ é a concentração de H^+ livre em fase aquosa.

Porém, esse modelo não considera trocas iônicas entre o contra-íon do surfactante iônico e o meio.

No modelo de pseudofase com considerações de troca iônica, PIE, micelas são tratadas como trocadores iônicos seletivos saturados com contra-íons.^{49, 61, 62}

Levando em consideração o presente modelo de troca iônica, os seguintes equilíbrios são suficientes para caracterizar a dissociação de reagentes ácidos fracos $H^+ A^-$ e a partição de HA , OH^- e A^- entre as fases aquosas e micelar:

Esquema 15 - pK_{ap} de um ácido fraco H^+A^- na presença de anfifílico positivo D^+Y^- .

onde, f e b referem-se as formas em fase aquosa e ligadas as micelas, respectivamente e os. HA e A são as formas protonadas e desprotonadas do ácido fraco, α é o grau de dissociação da micela, Y é o contra-íon da micela, $K_{OH/Y}$ é a constante de troca do OH^- e Y , $K_{A/Y}$ é a constante de troca da forma aniônica do ácido fraco e Y e $[BY]_T$ é a concentração de sal com o mesmo contraion da micela adicionado.

Uma vez que o equilíbrio está mantido entre as fases, a velocidade de reação observada, k_ψ , será a soma das velocidades relativas em água e em micelas e, portanto, dependerá da distribuição dos reagentes e de uma constante de velocidade apropriada em cada uma das fases aquosa e micelar, segundo as equações:

$$k_\psi = [HA]_T K_a \frac{(k_m^2/\bar{V})(K_S K_{A/Y})(Y_b/Y_f) + k_w^2}{(1 + K_{HA}C_D)([H^+] + K_{ap})(1 + K_S C_D)} \quad (6)$$

$$[HA]_T = [A_b] + [A_f] + [HA_b] + [HA_f] \quad (7)$$

onde, k_{ψ} é a constante de velocidade observada sob condições de pseudo-primeira ordem, $[HA]_T$ concentração total de ácido fraco, $\bar{V}$ é o volume molar do detergente micelizado.

3. SEÇÃO EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

O cloreto de N-hexadecil-N,N,N-trimetilamônio (CTAC) foi obtido da Merck e recristizado 3 vezes de metanol/acetona.⁶³

O N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS) utilizado (Sigma e Aldrich) foi recristalizado de metanol/acetona.

O DODAC foi obtido por cromatografia de troca iônica a partir de DODAB (Aldrich) utilizando-se uma resina Dowex 21K, na forma Cl^- (Fluka) (1,2 mEquivalentes/ml) em metanol. Utilizaram-se 12 g de DODAB para 114 g de resina. A recristalização foi feita em metanol/acetona. Foram obtidos 10,22 g de DODAC (Esquema 17).

SURFACTANTE	ESTRUTURA
CTAC Cloreto de N-hexadecil-N,N,N-trimetilamônio	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_{15}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_3$ (Cl^-)
HPS N-hexadecil-N,N-dimetil-3-Amônio-1-propanosulfonato	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_{11}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
DODAB/DODAC Brometo/Cloreto de Dimetildiocadecilamonio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ $(\text{Br}^-, \text{Cl}^-)$

Esquema 16 – Nome e estrutura dos surfactantes utilizados neste trabalho.

O p-nitrofenildifenilfosfato (PNPDPP) foi cedido pelo Prof. Dr. C. Bunton da Califórnia University, Sta Bárbara. O PNPDPP foi solubilizado em acetonitrila, numa concentração final 10^{-3} M.

Os solventes usados foram tiveram as seguintes procedências: acetonitrila e clorofórmio, da J.T. Backer, grau P.A., etanol, acetona e metanol da Merck, destilados no laboratório quando necessário.

Para a preparação dos tampões foram utilizados: cloreto de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Merck), ácido bórico (Reagen), trietilamina (Aldrich), MES (Sigma), bicarbonato (Mallinckrodt), ácido acético glacial (Merck) e tris(hidroximetil)aminometano, TRIZMA® Base (Sigma), HCl e NaCl (Sigma), todos utilizados sem purificação prévia.

Todas as soluções aquosas foram preparadas em água bidestilada e deionizada (deionizador Milli-Q, Millipore).

Vesículas de DODAC foram preparadas por sonicação utilizando-se um sonicador Bransonic 1510 (B. Braun Melsungen AG), com tip de titânio.

O diâmetro hidrodinâmico (Dh) das vesículas de DODAC foi determinado em equipamento ZetaPALS com Particle Sizing Software Ver. 2.29 (Brookhaven Instruments). Todas as amostras foram filtradas previamente em filtros de polycarbonato (0,45 μm).

Espectros de absorção foram feitos usando um espectrofotômetro Cary 50 Probe ou 3E (Varian). As celas eram de quartzo, com 1 cm de caminho ótico.

As oximas: acetofenoxima (oxima I), Ácido-10-fenil-10-hidroxiiminodecanóico (oxima II), 4-(9-carboxinonanil)-1-(9-carboxi-1-hidroxiiminononanil) benzeno (oxima III) e N-dodecil-Pralidoxima (oxima IV), foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Dino Zanette (Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química) conforme descrito na literatura⁴⁷ e a Pralidoxima (oxima V) comercializada (Sigma), foram usadas sem outra purificação.

Na síntese dessas oximas houve a preocupação de se caracterizar a forma isomérica, uma vez que ambas apresentam reatividades distintas.³⁰ As evidências de que a oxima sintetizada corresponde a uma única forma isomérica, a forma E, estão descritas por Dino Zanette.⁴⁷

A oxima I foi dissolvida em acetonitrila, a oxima II e III em etanol, a oxima IV em uma mistura de metanol e acetonitrila (1:4) e a oxima V em metanol, concentração final 10^{-2} M.

Acetofenoxima, Oxima I	Ácido-10-fenil-10-hidroxiiminodecanóico, Oxima II

4-(9-carboxinonanil)-1-(9-carboxi-1-hidroxiiminononanil) benzeno, Oxima III

N-dodecil-Pralidoxima, Oxima IV	Pralidoxima, Oxima V

Esquema 17 – Nome e estrutura das oximas utilizadas nesse trabalho.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das Vesículas de DODAC

Vesículas de DODAC foram preparadas por sonicação com tip de titânio, por 15 minutos a 90 W sem controle de temperatura. Após a sonicação a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min para retirar fragmentos de titânio.

O diâmetro hidrodinâmico (Dh) das vesículas de DODAC foi determinado e uma média dos resultados está referenciado no item 4.4, em Resultados. Todas as amostras foram filtradas previamente em filtros de polycarbonato (0,45 µm).

A quantidade de Cl^- nas soluções utilizadas e nas amostras de CTAC e de DODAC foi determinada por titulação com $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ em HNO_3 0,04 M⁶⁴. Os valores obtidos nas titulações das soluções foram utilizados como parâmetros de quantidade de sal adicionado comum ao meio, $[\text{BY}]_T$, nos tratamentos teóricos de PIE para CTAC e DODAC. Por outro lado, os valores obtidos nas titulações de Cloreto para as amostras de CTAC e de DODAC foram utilizados para acertar as concentrações de micelas e lipossomos.

3.2.2. Medida da Constante de Incorporação da Oxima I (K_{HA})

O espectro de absorção da Oxima I em água muda quando se adicionam concentrações crescentes de CTAC indicando que a Oxima I é solubilizada na fase micelar. A determinação da constante de associação da oxima protonada com as micelas de CTAC, K_{HA} , foi feita, em HCl 0,001M, medindo-se a variação de absorbância a 270 nm, comprimento de onda no qual ocorre a maior variação entre a absorção da forma ligada e livre da oxima I.

A equação abaixo foi utilizada no cálculo do K_{HA} , corresponde à forma linearizada do efeito de detergente no espectro de absorção da oxima.⁶⁵

$$\frac{1}{(Abs_{\psi} - Abs_f)} = \frac{1}{(Abs_b - Abs_f)} + \left(\frac{1}{(Abs_b - Abs_f) K_{HA}} \right) \left(\frac{1}{C_D} \right) \quad (8)$$

3.2.3. Determinação do pK_a

As determinações de pK_a 's e os espectros de absorção foram feitos em espectrofotômetro com celas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Todas as medidas foram realizadas a 30°C.

A determinação do pK_a das oximas em água relaciona-se com o equilíbrio ácido-básico:

Esquema 18 – Equilíbrio entre as formas protonada e desprotonada da oxima.

Os espectros de absorção das espécies HOx e Ox^- são suficientemente diferentes para permitir o uso do método espectrofotométrico com a finalidade de medir as concentrações das espécies HOx e Ox^- .

O cálculo do pK_a foi feito através da equação:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Ox}^-]}{[\text{HOx}]} \quad (9)$$

onde, $[\text{HOx}]$ refere-se a concentração molar de oxima protonada e $[\text{Ox}^-]$ à concentração molar de oximato.

Os pK_a 's da oximas em micelas e vesículas foram determinados usando-se comprimento de onda fixo, selecionado de forma que a diferença de absorção entre as formas protonada e desprotonada do grupo a ser titulado fosse a maior possível, λ_{Exp} . Nem sempre a maior diferença de absorção ocorre no comprimento de absorção máximo, λ_{max} , de uma das formas.

A seleção do λ_{Exp} da oximas em água foram determinados medindo os espectros de absorção na faixa de 350 a 220 nm das espécies protonada e desprotonada. Os registros foram feitos após a adição de 10 μl de oxima 0,01 M em cubetas contendo 1,5 ml de solução de NaOH 1M (Ox^-) e outra 1,5 ml de HCl 0,01 M (HOx).

Os comprimentos de onda usados, λ_{Exp} , foram: 275 nm para a Oxima I, 282 nm para a Oxima II, 285 nm para a Oxima III, 350 nm para a oxima IV e 340 nm para a oxima V.

Os pK_a 's foram calculados segundo a equação a seguir:⁴¹

$$\text{p}K_a = \text{pH}_{\text{Exp}} - \log \frac{\text{Abs}_{\psi} - \text{Abs}_{\text{HOx}}}{\text{Abs}_{\text{Ox}^-} - \text{Abs}_{\psi}} \quad (10)$$

onde, Abs_{HOx} e Abs_{Ox^-} referem-se a absorbância da forma protonada e da forma dissociada das oximas, respectivamente, e Abs_{ψ} refere-se a absorbância da oxima a um pH fixo, pH_{Exp} no qual o grupo em questão se encontra parcialmente

ionizado. A concentração de oxima utilizada foi de $6,7 \times 10^{-5}$ M e foi mantida fixa para todas as medidas.

3.2.4. Determinação do pK_{ap} nos agregados

Lipossomos e micelas produzem mudanças no grau de dissociação de ácidos e bases fracas.⁶⁶⁻⁷⁰ Portanto, a determinação do efeito desses agregados nos valores das constantes de dissociação aparentes, K_{ap} , é essencial para analisar reações nas quais as espécies dissociadas de ácidos fracos são nucleófilos.

Na presença de micelas de CTAC e HPS e vesículas de DODAC, o pK_a aparente, pK_{ap} , pode ser definido pela equação 11, onde Abs_{HOx} e Abs_{Ox^-} referem-se às absorbâncias das espécies protonada e dissociada das oximas, respectivamente e Abs_{ψ} é a absorbância da oxima na presença de micelas ou lipossomos, a um pH fixo.

3.2.5. Cinéticas com PNPDP

Todas as cinéticas foram feitas em espectrofotômetro com celas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Todas as medidas foram realizadas a 30°C.

Cinéticas de hidrólise e oximólise do PNPDP pelas oximas: I, II, III, IV e V (esquema 18) em presença de micelas de CTAC e HPS e vesículas de DODAC, foram acompanhadas medindo a absorbância resultante do aparecimento do íon *p*-nitrofenóxido em 400 nm,⁴¹ a pH fixo.

As reações de oximólise foram iniciadas pela adição de 10 μ L de PNPDP 0,001 M (em acetonitrila) e 10 μ L de oxima 0,01 M em 1,5 mL contendo os outros reagentes. A constante de incorporação do substrato PNPDP, K_s , está descrita na literatura como sendo $1,5 \times 10^4$ M⁻¹, portanto, o substrato PNPDP está totalmente incorporado nas micelas e lipossomos mesmo a baixas concentrações de anfifílicos.

As concentrações finais foram $6,7 \times 10^{-6}$ M de PNPDP e $6,7 \times 10^{-5}$ M de oxima, condições de pseudo-primeira ordem. Todas as cinéticas foram feitas com concentrações fixas de oxima e PNPDP, exceto quando mencionado.

3.2.6. Cálculo do Ajuste da Teoria de Pseudofase com considerações de Troca Iônica aos dados experimentais

As curvas foram ajustadas utilizando-se o programa "Micell", desenvolvido por Ricardo Furlan, utilizando-se as equações da teoria de pseudofase com considerações de troca iônica.⁶² A análise dos dados foi efetuada através do programa Microcal Origin®.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação das constantes de Incorporação de oximas, K_{HA} , em Micelas e Lipossomos

Os espectros da Oxima I em HCl $1,0 \times 10^{-3}$ M com e sem CTAC são mostrados na Figura 1. Observa-se que ocorre um deslocamento do $\lambda_{\max}$ da oxima para comprimento de onda maior quando em micelas (de 241 para 246 nm).

Figura 1 – Espectros da Oxima I, HCl $1,0 \times 10^{-3}$ M, OXIMA I $6,7 \times 10^{-5}$ M. (a) sem detergente, $\lambda_{\max}$ em 241 nm; (b) CTAC 0,1 M, $\lambda_{\max}$ em 246 nm.

Selecionamos o comprimento de onda de 270 nm para a determinação de K_{HA} já que nesse comprimento de onda a diferença de absorção era maior. K_{HA} foi determinada através da equação 9, em Métodos, e o valor obtido foi de 187 M^{-1} (Figura 2).

No trabalho em que publica a síntese da oximas I, II e III, Dino Zanette descreve em resultados o valor de 110 M^{-1} para a K_{HA} da Oxima I em micelas de CTAB. O valor de K_{HA} para as Oximas II e III não foram medidos porque os valores das constantes é muito alto.

Figura 2 - Determinação da constante de associação da Oxima I em CTAC. Oxima I $2,23 \times 10^{-5}$ M, HCl 1×10^{-3} M.

Os valores de K_{HA} em DODAC para as oximas I e IV, e em HPS para as oximas II, III e IV foram estimados a partir dos dados cinéticos. Os parâmetros teóricos que melhor ajustaram as cinéticas estão apresentados nas tabelas a seguir.

4.2. Determinação do pK_a das Oximas em Água

Os pK_a 's das oximas que se agregam em solução aquosa, como II, III e IV, não podem ser determinados em água nas concentrações onde estas se encontram na forma monomérica e portanto, os análogos solúveis foram usados como referência.⁷¹ O pK_a da oxima I foi usado como referência para as oximas II e III, e o da oxima V para a oxima IV. Estes pK_a 's foram medidos determinando os efeitos do pH no espectro da oxima protonada (HOx) e do íon oximato (Ox^-).

Os espectros das formas protonadas e desprotonadas das oximas I e V são mostrados na Figura 3. Nota-se que a forma protonada da oxima I possui λ_{max} próximo a 240 nm, enquanto o λ_{max} da forma desprotonada foi deslocado para aproximadamente 265 nm. Do mesmo modo, a forma protonada da oxima V, tem λ_{max} próximo a 295 nm e na forma desprotonada λ_{max} está deslocada para 340 nm.

Os valores de pK_a foram 11,68 para a oxima I,⁴⁷ e 8,35 para a oxima V.

Figura 3 – (A) Espectro da oxima I em HCl 0,01 M (a) e em NaOH 0,1 M (b), [oxima I] $6,7 \times 10^{-5}$ M; (B) Espectro da Oxima V em HCl 0,1 M (a) e em NaOH 0,1 M (b), [oxima V] $1,7 \times 10^{-5}$ M.

4.3. Medidas de pK_a aparente (pK_{ap}) de oximas em micelas e lipossomos

O pK_{ap} na presença de agregados foi definido como descrito na equação 11. A figura 4 mostra a variação do pK_{ap} das oximas I a V em função da concentração de CTAC.

A curva de pK_{ap} versus [CTAC] para a Oxima I apresenta um mínimo em baixas concentrações de detergente e o pK_{ap} aumenta com o aumento [CTAC]. Para as oximas II e III o pK_{ap} também apresenta mínimo, porém menos pronunciado do que para a oxima I. O valor mínimo de pK_{ap} para a Oxima I é cerca de 11 enquanto que para as oximas II e III é cerca de 11,8. Observa-se também que em concentrações altas de CTAC os pK_{ap} 's das Oximas II e III chegam a valores maiores que o pK_a da Oxima I em água.

Para a oxima V não se observa variação de pK_{ap} com o aumento [CTAC] enquanto que para a oxima IV, que possui uma cadeia alquílica de 12 carbonos, observa-se um mínimo nos valores de pK_{ap} (por volta de 7,2) seguido de um aumento, porém, não ultrapassando o valor de pK_a em água ($pK_a = 8,35$) até cerca de 0,1 M de CTAC.

Figura 4 - Efeito das CTAC no pK_{ap} das Oximas. Símbolos são dados experimentais e linhas são ajustes usando PIE. Oxima I em tampão TEA/HCl 0,02 M pH 11,3 ($\circ\circ\circ$), II ($\square\square\square$) e III ($\times\times\times$) TEA/HCl 0,020 M pH 11,7, IV em Tris/HCl 0,01 M pH 7,5 ($\triangle\triangle\triangle$) e V em Borato 0,02 M pH 8,5 ($\diamond\diamond\diamond$). [OXIMA] $6,7 \times 10^{-5}$ M para I, II, IV e V e $1,0 \times 10^{-4}$ para a oxima III.

Os dados experimentais foram utilizados no cálculo de linhas teóricas, modelo PIE, equação 6. Os parâmetros utilizados nos ajustes estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados nas curvas teóricas de pK_{ap} em CTAC.

	Oxima I	Oxima II	Oxima III	Oxima IV	Oxima V
[BY]t	$5,5 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$	8×10^{-3}	1×10^{-3}
[BA]t	$6,5 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-5}$
$K_{OH/a}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	10
K_{HA}	187	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$	30
[TAMPÃO], pH	TEA/HCl 0,01M, pH 11,3	TEA/HCl 0,01M, pH 11,7	TEA/HCl 0,01M, pH 11,7	Tris/HCl 0,01M, pH 7,5	Borato 0,02M pH 8,5

$k_{OH/Cl} = 0,14$; ^{46, 68} $\alpha = 0,37$; $CMC = 9,0 \times 10^{-4}$; $K_a = 1,12 \times 10^{-12}$ (OXIMA I, II e III); $K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMA VI E V)

O efeito de vesículas de DODAC no pK_{ap} das Oximas I e IV é mostrado na figura 5. Nota-se que o pK_{ap} para a oxima I é praticamente constante e os valores se mantêm próximos aos encontrados para o pK_a água. Os valores de pK_{ap} para a Oxima IV chegam a um mínimo que se mantém constante com o aumento da [DODAC]. É interessante notar que a concentração de CTAC necessária para alcançar o mínimo no pK_{ap} é dez vezes maior que a de DODAC.

As linhas na figura 5 foram calculadas segundo o modelo PIE utilizando-se a esquema 16. Neste caso, como as vesículas são formadas por uma dupla camada de anfífilos, assume-se que a concentração de DODAC acessível as oximas é apenas a fração externa da bicamada. Portanto a [DODAC] foi corrigida para 60% da concentração analítica tomando-se em conta um diâmetro de aproximadamente 400 Å, segundo resultados de espalhamento de luz dinâmico, e uma área por cabeça de 80 Å².⁷⁴

Figura 5 - Efeito de DODAC no pK_{ap} das Oximas. Símbolos correspondem dados experimentais e linhas são ajustes teóricos segundo PIE. Oxima I em tampão TEA/HCl 0,02 M pH 11,3 ($\cdots\circ\cdots$) e IV em Tris/HCl 0,01 M pH 7,5 ($\cdots\triangle\cdots$). [OXIMA] $6,7 \times 10^{-5}$ M. Os parâmetros utilizados no ajuste teórico foram:

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no ajuste do pK_{ap} em DODAC.

	Oxima I	Oxima IV
[BY]t	$5,5 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$
[Oxima]t	$6,6 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-5}$
$K_{OH/A}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-5}$
K_{HA}	800	$1,3 \times 10^4$
TAMPÃO, pH	TEA/HCl 0,01 M, pH 11,3	Tris/HCl 0,01 M, pH 7,5

$$k_{OH/Cl} = 0,14;^{49, 72, 73} \alpha = 0,13;^{75} \text{CMC} = \text{zero}; K_a = 1,12 \times 10^{-12} \text{ (OXIMA I)}; K_a = 4,47 \times 10^{-9} \text{ (OXIMA VI)}$$

A figura 6 mostra a variação do pK_{ap} das oximas II, III e IV em função da concentração de HPS. Observa-se um comportamento diferente, o pK_{ap} das oximas aumenta chegando a um máximo em baixas concentrações de detergente mantendo-se constante com o aumento da [HPS] para as oximas II e III. Não foi observada variação significativa para a oxima IV.

Esses resultados foram analisados utilizando-se o modelo de pseudofase sem considerações de troca iônica equação 4.

Figura 6 - Efeito de HPS no pK_{ap} das Oximas. Símbolos correspondem a dados experimentais e linhas a ajustes teóricos segundo modelo PP, Equação 4. Oxima II (—□—) e III (—x—) em NaOH 0,05 M e IV (—△—) em Tris/HCl 0,01 M pH 7,7. A concentração das oximas I, II, IV e V foi de $6,7 \times 10^{-5}$ M, e da oxima III foi $1,0 \times 10^{-4}$.

Os parâmetros utilizados no ajuste estão na Tabela 3:

Tabela 3 - Parâmetros utilizados nas curvas teóricas de pK_{ap} em HPS

	Oxima II	Oxima III	Oxima IV
K_a	$1,12 \times 10^{-12}$	$1,12 \times 10^{-12}$	$4,47 \times 10^{-9}$
K_{HA}	500	$4,2 \times 10^3$	1000
K_A	$3,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
TAMPÃO, pH	NaOH 0,05 M, 12,5	NaOH 0,05 M, 12,7	Tris/HCl 0,01 M, 7,7

$K_a = 1,12 \times 10^{-12}$ (OXIMAS II E III); $K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMAS IV).

O efeito de HPS no pK_{ap} da oxima IV foi estudado com mais detalhes variando-se a concentração de tampão Tris/HCl, e, conseqüentemente, $[Cl^-]$, figura 7. O pK_{ap} apresenta um valor máximo em baixas concentrações de detergente mantendo-se constante com o aumento da $[HPS]$. Pode-se observar que os valores de pK_{ap} aumentam com a concentração de Tris/HCl sendo que em 0,010 M o pK_{ap} é 8,5 e em 0,050 M Tris/HCl chega a 8,8.

Estes resultados foram analisados segundo o modelo PP e os parâmetros utilizados no ajuste estão na Tabela 5.

Figura 7- Efeito de HPS no pK_{ap} da Oxima IV. Símbolos correspondem a dados experimentais e linhas são ajustes teóricos segundo PP, Equação 4. [Tris/HCl], pH 8,5: 0,010 M ($\cdots\circ\cdots$); 0,018 M ($--\diamond--$); 0,025 M ($--\square--$) e 0,050 M ($--\triangle--$). [OXIMA] $6,7 \cdot 10^{-5}$ M.

Na tabela 4 estão os parâmetros de K_{HA} utilizados para ajustar o modelo teórico aos resultados de pK_{ap} da oxima IV em HPS.

Tabela 4 – Efeito da concentração do tampão Tris/HCl, pH 8,5, nos parâmetros teóricos utilizados no ajuste de pK_{ap} da oxima IV em HPS.

Tris/HCl (M), pH 8,5	0,010	0,018	0,025	0,050
K_{HA}	1000	1000	1000	1000
K_A	1500	2500	3000	3000

$K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMA IV).

4.4. Determinação das Constantes de Velocidade de Segunda Ordem de Hidrólise e de Oximólise do PNPDP

A reação de oximólise de PNPDP pelas oximas I a V em água foi estudada em vários pHs. Para a reação de PNPDP em meio alcalino e em presença de oximas a constante da velocidade observada da reação, k_{ψ} , é dada por:

$$k_{\psi} = k_{Ox}^2 [Ox^-] + k_{OH}^2 [OH^-] + k_w \quad (11)$$

onde, k_{ψ} é a constante de reação observada, k_{Ox}^2 é a constante de segunda ordem da reação referente à oximólise, $[Ox^-]$ corresponde a concentração de oxima dissociada, k_{OH}^2 é a constante de velocidade de segunda ordem da reação da hidrólise alcalina, $[OH^-]$ a concentração de hidróxido e k_w é a constante de velocidade da reação na fase aquosa.

A k_{OH}^2 foi obtida variando-se a $[OH^-]$. O coeficiente angular corresponde à k_{OH}^2 e o intercepto corresponde à k_w^2 .

Figura 8 - Efeito da [NaOH] na reação de hidrólise alcalina de PNDPP. [PNDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M.

Para se obter o valor da constante de segunda ordem de oximólise, fixa-se o pH num valor onde a oxima esteja totalmente dissociada e, variando a concentração de

oxima, tem-se um gráfico de k_{ψ} versus [oxima]. Esse gráfico é uma reta cujo coeficiente angular corresponde à k_{Ox}^2 .

Na ausência de micelas ou lipossomos, a constante de velocidade de oximólise é da mesma ordem de magnitude da constante de hidrólise alcalina. As constantes de velocidade de segunda ordem de oximólise, k_{Ox}^2 , do PNPDP foram calculadas através da equação a seguir:

$$k_{Ox}^2 = \frac{k_{\psi} - k_{OH}^2[OH^-] - k_w^2}{[Ox]} \quad (12)$$

A concentração de oximato, Ox^- , foi calculada através da equação:

$$pH = pK_a + \log \frac{[Ox^-]}{([Ox]_T - [Ox^-])} \quad (13)$$

Nas Figuras 9 e 10 são mostrados os dados de k_{ψ} versus [oxima]. Da inclinação das retas foram obtidos os k_{Ox}^2 para as oximas I e V.

Na tabela 5 estão os valores de k_{OH}^2 e k_{Ox}^2 para as oximas I e V.

Tabela 5 – Constantes de segunda ordem de hidrólise alcalina, k_{OH}^2 , e de oximólise, k_{Ox}^2 , de PNPDP.

$k_{OH}^2, \text{ min}^{-1}$	28,8
k_{Ox}^2 (oxima I), min^{-1}	6,52
k_{Ox}^2 (oxima V), min^{-1}	2,77

Figura 9 - Determinação do k_{Ox}^2 da [Oxima I]. [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M, tampão bicarbonato 0,05 M, pH 11,1.

Figura 10 - Determinação do k_{Ox}^2 da [Oxima V]. [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M, Tampão Borato 0,01 M, $pH=8,3$.

4.5. Hidrólise de PNPDP em Micelas e Lipossomos

Micelas e vesículas de DODAC catalisam a hidrólise por OH^- de PNPDP. Nas figuras 11, 12 e 13 são mostrados os resultados da hidrólise alcalina de PNPDP em função da [CTAC], [DODAC] e [HPS] a vários pHs. Os valores das constantes de velocidade de hidrólise foram descontados dos valores de k_p das cinéticas de oximólise do item a seguir, 4.6.⁶⁵

Figura 11 - Efeito de micelas de [CTAC] na hidrólise alcalina do PNPDP em vários tampões. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PIE, Equação 6. MES 0,01, pH 6,0 ($--\diamond--$); Tris/HCl 0,01, pH 7,0 ($--\triangle--$); Tris/HCl 0,01, pH 9,0 ($--\circ--$) e Borato 0,01, pH 9,6 ($--\square--$). [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M.

Figura 12 - Efeito de lipossomos de [DODAC] na hidrólise alcalina do PNPDP em vários tampões. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PIE, Equação 6. MES 0,01 M, pH 6,5 ($--\triangle--$) e Borato 0,01 M, pH 8,5 ($--\circ--$). [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M.

Figura 13 - Efeito de micelas de HPS na hidrólise alcalina do PNPDP em vários tampões. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PP, Equação 5. Tampão Borato 0,020 M *pH* 10,2 (··○··); tampão Borato 0,020 M *pH* 10,0 (--□--); tampão Borato 0,020 M *pH* 9,0 (--◇--); tampão Tris/HCl 0,010 M *pH* 8,5 (—x—) e tampão Tris/HCl 0,020 M *pH* 7,5 (··△··). [PNPDPP] $6,7 \times 10^{-6}$ M.

Tabela 6 – Hidrólise de PNPDP em micelas e vesículas.

Anfifílico	CTAC ^a			DODAC ^b		HPS ^c				
Tampão M, pH	MES 0,01, 6,0	TRIS/HCl 0,01, 9,0	BORATO 0,01, 9,6	MES 0,01, 6,5	BORATO 0,02, 8,5	TRIS/HCl 0,02, 7,5	TRIS/HCl 0,01, 8,5	BORATO 0,02, 9,0	BORATO 0,02, 10,0	BORATO 0,02, 10,2
[Cl ⁻] ou eq.	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$6,8 \times 10^{-3}$	7×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	0	0	0
$k_{\psi\max}$	0,0066	0,0194	0,0258	0,011	0,239	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$
k_{ψ}^0	$4,23 \times 10^{-7}$	$4,23 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-3}$	$1,34 \times 10^{-6}$	$1,34 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-4}$	$4,23 \times 10^{-4}$	$4,23 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-3}$
$k_{\psi\max}/k_{\psi}^0$	15600	46	15,3	8222	1786	0,75	0,75	4,3	0,47	0,45
k_m^2	68	20	17	1600	125	20	20	125	21	8
k_m^2/k_{OH}^2	2,4	0,7	0,6	57	4,3	0,7	0,7	4,3	0,7	0,3

a. $\alpha = 0,37$; CMC = 9×10^{-5} M; $k_{OH/Cl} = 0,14^{46, 68, 70}$; $V = 0,32$ L/mol; $K_S = 1,5 \times 10^4$ M⁻¹. b. $\alpha = 0,37$; $k_{OH/Cl} = 0,14^{46, 68, 70}$; $V = 0,58$ L/mol; $K_S = 1,5 \times 10^4$ M⁻¹. c. CMC = $1,2 \times 10^{-5}$ M; $V = 0,39$ L/mol; $K_S = 1,5 \times 10^4$ M⁻¹. $k_{OH}^2 = 28,8$ min⁻¹.

4.6. Oximólise de PNPDP em Micelas e Lipossomos

A oximólise do PNPDP pelas oximas foi estudada em micelas de CTAC. Na figura 14 estão representados os efeitos CTAC sobre a oximólise do PNPDP pelas oximas I e IV em várias condições. Os valores de k_{OX} apresentados nas figuras foram obtidos subtraindo-se o valor de k_{OH} do valor de k_{ψ} obtendo-se assim o valor da constante de velocidade de oximólise observada. Para cada condição de concentração de tampão e pH foram feitas curvas sem oxima, somente hidrólise alcalina, e estes valores de k_{OH} foram descontados da k_{ψ} total.

Em todas as curvas se observa um máximo em regiões de baixa concentração de detergente, mais ou menos acentuado dependendo da oxima ou do meio de reação.

Observa-se que para a oxima I os resultados de k_{ψ} são baixos em relação as outras oximas. Por isso, é necessário um meio de reação com mais básico, pH maior que 9,0 para se observar diferenças de k_{ψ} entre reação de oximólise com a oxima I e a hidrólise alcalina do PNPDP.

Figura 14 – Efeito de CTAC na k_{ψ} das Oximas I e IV. Símbolos correspondem a dados experimentais e as linhas são teóricas segundo modelo PIE. Oxima I, Tris/HCl 0,01 M pH 9,0 ($\bullet\bullet\bullet$) e Borato 0,01 M pH 9,6 ($\blacksquare\blacksquare\blacksquare$). Oxima IV em MES 0,01 M pH 6,0 ($\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$) e Tris/HCl 0,01 M pH 7,0 ($\square\square\square$). $[OXIMA] = 6,7 \times 10^{-5}$ M, $[PNPDPP] = 6,7 \times 10^{-6}$ M..

Para a oxima IV observa-se um máximo de k_{ψ} vs CTAC em pH 7,0 ou menor. Portanto, os resultados mostram que a oxima IV foi muito mais eficiente do que

a oxima I para decompor o éster de fosfato estável, PNPDP. Em altas concentrações de CTAC as curvas tendem a valores de k_{ψ} comparáveis às de hidrólise.

Os resultados da Figura 14 foram analisados segundo o modelo de PIE. A constante de incorporação do substrato em micelas foi determinada para PNPDP por medidas de solubilidade-limite por Bunton⁵¹ ($1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), esse valor foi utilizado nos cálculos teóricos.

Os parâmetros utilizados para o ajuste das linhas teóricas aos dados experimentais estão na tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros utilizados no ajuste teóricos das cinéticas de oximólise em CTAC.

	Oxima I		Oxima IV	
[BY] _t	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-2}$	$2,75 \times 10^{-3}$
$K_{OH/A}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$
k_m^2	35	150	32	17
K_{HA}	186,8	186,8	33.000	33.000
TAMPÃO, pH	Tris 0,01 M, 9,0	Borato 0,01 M, 9,6	Tris 0,01 M, 7,0	MES 0,01 M, 6,0

$k_{OH/Cl} = 0,14$; ^{46, 68, 70} $\alpha = 0,37$; $CMC = 9,0 \times 10^{-4}$; $K_s = 1,5 \times 10^4$; $K_a = 1,12 \times 10^{-12}$ (OXIMA I); $K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMA VI); $k_{ox}^2 = 6,52 \text{ min}^{-1}$ (OXIMAS I); $k_{ox}^2 = 2,77 \text{ min}^{-1}$ (OXIMAS IV); $V = 0,32 \text{ M/L}$; $k_{HOH} = 1,47 \times 10^{-14}$; $[Oxima]_t = 6,7 \times 10^{-5}$.

Na figura 15 são apresentados os resultados do efeito da [DODAC] sobre a decomposição de PNPDP pelas oximas I e IV. Os valores de k_{ψ} apresentados são os das constantes de velocidade observada descontando-se a hidrólise alcalina, determinada na mesma condição de pH e [DODAC], mas na ausência de oxima.

Em todas as curvas observa-se um máximo em regiões de baixa concentração de lipossomos, dependendo da oxima ou do meio de reação. Porém, os resultados mostram que a oxima IV foi muito eficiente para decompor o PNPDP em *pH* próximos de 7.

Figura 15 – Oximólise de PNPDP em lipossomos de DODAC e oximas I e IV. Símbolos são experimentais e linhas são teóricas segundo modelo PIE, equação 7. Oxima I, tampão Borato 0,02 M pH 8,7 ($\bullet\bullet\bullet$) e Oxima IV, tampão MES 0,01 M pH 6,0 ($\diamond\diamond\diamond$) e MES 0,01 M pH 6,5 ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$). $[OXIMA] = 6,7 \times 10^{-5}$ M, $[PNPDPP] = 6,7 \times 10^{-6}$ M.

Os resultados foram analisados segundo o modelo de PIE e os parâmetros utilizados estão na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros utilizados no ajuste teóricos das cinéticas de oximólise em DODAC.

	Oxima I	Oxima IV	
$[BY]_t$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
$[Oxima]_t$	$6,7 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-5}$
$K_{OH/a}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$
k_m^2	600	50	80
K_{HA}	187	13.000	33.000
Tampão, pH	Borato 0,02 M 8,5	MES 0,01 M 6,0	MES 0,01 M 6,5

$k_{OH/Cl} = 0,14$; $\alpha = 0,37$; $CMC = ZERO$; $K_S = 1,5 \times 10^4$; $K_a = 1,12 \times 10^{-12}$ (OXIMA I); $K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMA VI); $k_{ox}^2 = 6,52 \text{ min}^{-1}$ (OXIMA I); $k_{ox}^2 = 2,77 \text{ min}^{-1}$ (OXIMA IV); $V = 0,58 \text{ M/L}$; $K_w = 1,47 \times 10^{-14}$.

Na figura 16 são apresentadas os dados de k_v da reação de oximólise (oximas II, III e IV) em função da [HPS]. Os valores apresentados são dados de oximólise descontando-se a hidrólise do PNDPP em DODAC.

Nos resultados obtidos com oxima IV observa-se um máximo em regiões de baixa concentração de detergente que depende do pH meio de reação. Os resultados mostram que a oxima IV foi muito eficiente para decompor o PNDPP, em meio próximo de pH 7, na presença de micelas zwiteriônicas.

O gráfico inserto na figura 16 mostra que a variação da concentração de tampão Tris, entre 0,010 M e 0,050 M, bem como a adição de NaCl, não altera significativamente os resultados cinéticos.

Os resultados da Figura 16 foram analisados através do modelo PP e os parâmetros que melhor ajustaram a curva teórica aos resultados estão na Tabela 9.

Com a oxima V, por ser curta e positivamente carregada não foi observada diferença nas velocidades de reação em água e em agregados.

Figura 16 – Cinética de Oximas II, III e IV em HPS. Símbolos são experimentais e linhas teóricas. Oxima II, tampão Borato 0,02 M pH 10,0 (•••••); Oxima III, tampão Borato 0,02 M pH 10,2 (•••••), oxima IV em Tris/HCl 0,02 M pH 7,5 (•••••) e Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 (•••••). [OXIMA]= $6,7 \times 10^{-5}$ M, [PNPDPP] = $6,7 \times 10^{-6}$ M. Inserto: Efeito da [Tris/HCl] pH 8,5: 0,010 M (•••••), 0,018 M (♦), 0,025 M (+), 0,050 M (x) e 0,010 M com 0,050 M de NaCl (▼)

Tabela 9 - Parâmetros utilizados no ajuste teóricos das cinéticas de oximólise em HPS.

	Oxima II		Oxima III	Oxima IV	
k_m^2	25	45	63	125	100
K_{HA}	500	500	$4,2 \times 10^3$	1000	1000
K_A	$3,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
TAMPÃO, pH	Borato 0,02 M pH 9,0	Borato 0,01 M pH 10,0	Borato 0,02M pH10,2	TRIS/HCl 0,02 M pH 7,5	TRIS/HCl 0,01 M pH8,5

$K_S = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $V = 0,397 \text{ M/L}$; $CMC = 1,2 \times 10^{-5}$; $k_{HOH} = 1,47 \times 10^{-14}$; $k_{ox}^2 = 6,52 \text{ min}^{-1}$ (OXIMAS I, II E III);

$k_{ox}^2 = 2,77 \text{ min}^{-1}$ (OXIMAS IV E V); $K_a = 1,12 \times 10^{-12}$ (OXIMAS I, II E III); $K_a = 4,47 \times 10^{-9}$ (OXIMAS IV E V)

5. DISCUSSÃO

Oximas de diferentes estruturas foram sintetizadas com a finalidade de se obterem compostos mais eficientes na detoxificação de organofosforados.⁷⁶⁻⁸⁹ As reações de oximólise de PNPDP, um composto modelo, foram estudadas em vários sistemas coloidais tendo em vista a obtenção de condições otimizadas para a decomposição de vários ésteres de fosfato, principalmente os utilizados como agentes pesticidas e gases neurotóxicos.

Ao se trabalhar com diferentes sistemas coloidais e diferentes oximas o conhecimento de vários parâmetros se torna necessário. As constantes de associação das formas protonadas das oximas, K_{HA} em micelas de CTAC e em lipossomos de DODAC, ambos catiônicos, foi determinada. Em CTAC, K_{HA} para a oxima I foi de 187 M^{-1} , esse resultado demonstra que houve a incorporação da oxima neutra em micelas de CTAC; e para a oxima II, substância análoga a oxima I, porém, com maior hidrofobicidade devido à inserção de um grupo decil em substituição do grupo acetil, foi de 12.000 M^{-1} (determinado cineticamente). Nota-se que a inserção de um grupo de maior hidrofobicidade aumentou em sessenta vezes o valor de K_{HA} . O K_{HA} da mesma oxima I, em lipossomos de DODAC foi de 800 M^{-1} . K_{HA} para a oxima V não foi determinada cineticamente, pois, nas condições experimentais usadas, a velocidade de oximólise observada foi menor que a velocidade de hidrólise alcalina de PNPDP em CTAC e DODAC.

O pK_a da Pralidoxima, Oxima V (8,35) é menor que o pK_a da Acetofenoxima, Oxima I (11,68). A ressonância da oxima V (Esquema 19) estabiliza a forma desprotonada, conduzindo a uma diminuição no pK_a :

Esquema 19 - Estrutura de ressonância da pralidoxima desprotonada, forma isomérica E.⁹⁰

Os pK_{ap} 's das oximas I, II, III, IV e V foram determinados na presença de vários anfifílicos. Em CTAC o perfil das curvas de pK_{ap} versus [CTAC] é similar ao obtido por Zanette,⁴⁷ para as oximas I, II e III em presença de CTAB. Observa-se que em CTAC os pK_{ap} 's das oximas, para todas as [CTAC], se mantém na ordem de 11

para a oxima I e na ordem de 12 para as oximas II e III. Isso mostra que, em pH 11, a oxima I está 50% dissociada, enquanto que as oximas II e III estarão na forma aniônica, em menos de 10%.

O pK_{ap} da oxima V praticamente não é afetado pela adição de CTAC, enquanto que a oxima IV tem o seu pK_{ap} diminuído por mais de uma unidade de pH, seguido de um aumento discreto.

O pK_{ap} da oxima I e IV em vesículas de DODAC foi determinado. Para a oxima I quase não se observou variação, porém, para a oxima IV em baixas concentrações de DODAC o pK_{ap} chega a um mínimo que se mantém constante. Esse fenômeno ocorre em CTAC, mas para DODAC é alcançado numa concentração dez vezes menor.

Para HPS, um surfactante zwitteriônico, o comportamento é diferente. Pode-se perceber que não houve variação no pK_{ap} para oxima IV, pois no pH 7,7 a maior parte da oxima está protonada, conferindo carga positiva a oxima, e assim, não conseguindo interagir com os agregados. Porém, as oximas II e III em NaOH estão desprotonadas, portanto, negativas, interagindo com os agregados, porém, diferentemente dos dados demonstrados até então, o pK_{ap} dessas oximas aumenta em baixas concentrações. Isso se deve a diferentes interações entre as oximas e os agregados catiônicos e zwitteriônicos.

Complementarmente a esse estudo de pK_{ap} foi verificado o efeito da concentração de tampão Tris/HCl, e conseqüentemente, a $[Cl^-]$, no pK_{ap} da oxima IV. Em pH 8,5, perto do pK_a , o comportamento da oxima IV se assemelha ao observado para as demais. O aumento da concentração do tampão, de 0,01 M para 0,05 M, provoca um discreto aumento (0,5 unidades de pH) no pK_{ap} .

Nas Figuras que mostram a variação de pK_{ap} com a concentração de anfifílico as linhas foram calculadas tomando-se como base os dados experimentais. Os parâmetros utilizados no ajuste estão nas tabelas.

Continuando nosso estudo com essas oximas determinamos as constantes de velocidade de segunda ordem de hidrólise alcalina e de oximólise de PNPDP (oximas I e V) (Figuras 8-10 e a Tabela 6). k_{OH}^2 foi da ordem de 30 min^{-1} , enquanto k_{ox}^2 para a oxima I foi cerca de 7 min^{-1} e k_{ox}^2 para a oxima V foi de aproximadamente 3 min^{-1} .

A hidrólise alcalina de PNPDP em micelas e lipossomos foi estudada (tópico 4.5) para separar os efeitos dos anfifílicos sobre a hidrólise e oximólise. Os dados de oximólise, discutidos a seguir, já estão tratados e descontados dos valores de hidrólise alcalina.

As reações de oximólise de PNPDP para I, II e III foram estudadas em CTAC e somente foi observada catálise para a oxima I, uma vez que para as oximas II e III a reação foi mais lenta que a respectiva hidrólise alcalina do PNPDP. A posição das oximas II e III, principalmente a oxima III, em CTAC e DODAC, pode ser diferente da posição de PNPDP e por isso não observamos reação nesses agregados. Por outro lado, em HPS, apesar do pK_{ap} das oximas aumentar com o aumento da [HPS], foi verificado um aumento da velocidade na reação de oximólise de PNPDP por II e III.

Para a oxima IV, a oximólise de PNPDP para todos os anfifílicos estudados foi caracterizada por fatores de aceleração, AF, expresso como $k_{\psi_{MAX}} / k_{\psi}^o$ variou de 10^4 a 10^7 . Além disso, a razão k_m^2 / k_{ox}^2 , que é a medida de catálise, variou entre 12 e 45, enquanto que para as demais oximas, I, II e III, variou entre 4 e 92. Os pH's utilizados para acompanhar as cinéticas de oximólise de PNPDP com IV tiveram que ser muito mais baixos que com as oximas I, II e III, pois as velocidades de reação eram muito altas para serem acompanhadas nas nossas condições experimentais. Neste trabalho utilizamos um equipamento que não nos permitiu acompanhar reações com $t_{1/2}$ menores que 3 segundos, por isso, não realizamos cinéticas comparáveis a algumas das descritas na literatura. Acertamos nossas condições experimentais a nossa realidade, porém, sabemos que essas reações podem ser muito mais rápidas.

Na tabela 10 segue a compilação dos resultados experimentais: constante de velocidade máxima observada em anfifílicos, $k_{\psi_{MAX}}$; constante de velocidade observada em água no pH do experimento, k_{ψ}^o ; fator de aceleração, $k_{\psi_{MAX}} / k_{\psi}^o$; constante velocidade de segunda ordem de micelização, k_m^2 . A razão entre as constantes de segunda ordem de oximólise em micelas e em água, k_m^2 / k_{OX}^2 , representa, como já dissemos, a medida de catálise, isto é, o efeito da transferência do ambiente de reação desde a solução à interface sobre a energia livre de ativação.

Neste trabalho, pela primeira vez, reportamos os dados de pK_a , hidrólise alcalina e catálise da oximólise de PNPDP utilizando lipossomos catiônicos, DODAC, e micelas zwitteriônicas, HPS, como microreatores. Por isso, vamos comparar os resultados deste trabalho com os da literatura, fazendo considerações e comparações com outros agregados catiônicos. Os dados referentes ao efeito de HPS sobre oximólise são reportados sem valores comparáveis por não haver publicação de dados similares na literatura.

Tabela 10 – Compilação de parâmetros experimentais e calculados obtidos.

OXIMA	ANFI-FÍLICO	TAMPÃO, M	pH	[OXIMA] _{iv} , M	$k_{\psi_{MÁX}}$ min ⁻¹	k_{ψ}^o min ⁻¹	$k_{\psi_{MÁX}} / k_{\psi}^o$	k_m^2 M ⁻¹ .min ⁻¹	k_m^2 / k_{ox}^2
I	CTAC	Borato 0,01	9,6	$6,7 \times 10^{-5}$	0,35	$3,06 \times 10^{-6}$	$1,14 \times 10^5$	150	23
		Tris/HCl 0,01	9,0	$6,7 \times 10^{-5}$	0,075	$7,75 \times 10^{-7}$	$9,67 \times 10^4$	35	5,4
	DODAC	Borato 0,02	8,5	$6,7 \times 10^{-5}$	0,5	$2,45 \times 10^{-7}$	$2,04 \times 10^6$	600	92
II	HPS	Borato 0,01	10,0	$3,75 \times 10^{-4}$	0,0059	$5,0 \times 10^{-5}$	118	45	6,9
		Borato 0,02	9,0	$6,7 \times 10^{-5}$	0,0055	$9,1 \times 10^{-7}$	$6,04 \times 10^3$	25	3,8
III	HPS	Borato 0,02	10,2	$2,7 \times 10^{-4}$	0,02	$5,62 \times 10^{-5}$	355	63	9,7
IV	CTAC	Tris/HCl 0,01	7,0	$6,7 \times 10^{-5}$	3,5	$1,74 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^4$	32	12
		Tris/HCl 0,02	7,5	$2,0 \times 10^{-4}$	2,26	$1,3 \times 10^{-4}$	$1,74 \times 10^4$	125	45
	HPS	Tris/HCl 0,01	8,5	$2,0 \times 10^{-4}$	5,30	$4,2 \times 10^{-4}$	$1,26 \times 10^4$	100	36
		MES 0,01	6,5	$6,7 \times 10^{-5}$	11,5	$5,7 \times 10^{-6}$	$2,02 \times 10^6$	80	29
	DODAC	MES 0,01	6,0	$6,7 \times 10^{-5}$	6,5	$8,3 \times 10^{-7}$	$7,8 \times 10^6$	50	18

$k_{ox}^2 = 6,52 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para as oximas I, II e III ($pK_a = 11,68$). $k_{ox}^2 = 2,77 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para a oxima IV ($pK_a = 8,35$).

A seguir estão apresentadas as estruturas publicadas (Esquema 20) e alguns dos resultados de revisão bibliográfica (Tabela 11) para a reação de oximólise de organofosforados em micelas.

RCH=NOH $\text{R} = \text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-$	RCH=NOH $\text{R} = \text{C}_5\text{H}_4\text{N}-$	RCH=NOH $\text{R} = \text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2-$
1. Anti-pirivaldeído 1-oximato	2. <i>p</i> -Nitrobenzaldoxima	3. 2-Piridinacarbaldoxima	4. 3-Piridinacarbaldoxima
RCH=NOH	RCH=NOH	C_{16}TAOx	$\text{RCO}\cdot\text{NPhO}^-$ $\text{R} = n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$
5. 4-Piridinacarbaldoxima	6. 2-Quinolinacarbaldoxima	7. Hexadecil trimetil amônio <i>anti</i> -pirivaldeído 1-oximato	8. (Z)-dodecano- <i>N</i> -phenylhydroxamate ion

9. N-tetradecilimidazol	10. N-tetradecil-Pralidoxima, Oxima IV	11	12

13	14	15	16. N-metil 2-aldoxima (pralidoxima), Oxima V

17. salicilaldoxima	18.	19. N-metil 4-aldoxima	20

a. PNPDP	b. PNPDT	c. PARAOXON	d. PARATION

Esquema 20 – Estruturas de oximas (1 a 20) e de substratos organofosforados (a-d) descritos na literatura.

Tabela 11 – Dados comparativos dos resultados publicados na literatura obtidos para a reação de oximólise de organofosforados em micelas a 25°C.

Substrato	$[S]_t$, M	Oxima	$[Oxima]_t$, M	pK_a	Anfifílico, M	Tampão, M	pH	$k_{\psi MAX}'$, s ⁻¹ (min ⁻¹)	k_{ψ}^o , s ⁻¹ (min ⁻¹)	$k_{\psi MAX}' / k_{\psi}^o$	k_m^2 , M ⁻¹ s ⁻¹ (M ⁻¹ min ⁻¹)	k_{OX}^2 , M ⁻¹ s ⁻¹ (M ⁻¹ min ⁻¹)	k_m^2 / k_{OX}^2	ref
a	2×10^{-6}	1	0,01	8,39	CTAO 0,01 (7)	Borato 0,010	8,0	1,2 (72)	$1,5 \times 10^{-3}$ (0,09)	800	0,76 (46)	0,52 (31)	1,45	31
b	1×10^{-6}		0,01	8,39				0,65 (39)	$4,6 \times 10^{-4}$ (0,028)	1413	0,39 (23)	0,16 (9,6)	2,4	
c	5×10^{-6}		0,01	8,39				0,007 (0,42)	$1,4 \times 10^{-5}$ ($8,3 \times 10^{-4}$)	467	0,005 (0,3)	0,0048 (0,29)	1,05	
a	1×10^{-6}	2	1×10^{-4}	9,90	CTAB 0,005	Borato 0,015	10,0	-----	-----	2340	3230 ($1,9 \times 10^5$)	1,38 (83)	2341	32
		3	1×10^{-3}	10,0				-----	-----	254	410 ($2,5 \times 10^4$)	1,60 (96)	256	
		4	1×10^{-3}	10,2				-----	-----	142	225 ($1,3 \times 10^4$)	1,58 (95)	142	
		5	1×10^{-3}	9,88				-----	-----	275	319 ($1,9 \times 10^4$)	1,16 (70)	275	
		6	5×10^{-5}	9,79*				-----	-----	3700	6940 ($4,2 \times 10^5$)	1,87 (112)	3711	
a	2×10^{-5}	8	$5,15 \times 10^{-3}$	-----	CTAB 0,081			0,038 (2,3)	$1,3 \times 10^{-3}$ (0,08)	28,4	0,60 (36)	0,26 (16)	2,3	34
a	$3,3 \times 10^{-5}$	9	$3,3 \times 10^{-4}$	10,15	CTAB 0,016	Borato 0,005, KCl 0,02	10,0	0,5 (30)	-----	-----	-----	1515 ($9,0 \times 10^4$)	-----	36
		10	$3,3 \times 10^{-4}$	8,10			10,0	$3,2 \times 10^{-3}$ (0,19)	-----	-----	-----	-----	-----	
		11	$3,3 \times 10^{-4}$	8,45			10,0	$8,54 \times 10^{-2}$ (0,09)	-----	-----	-----	-----	-----	
		12	$9,7 \times 10^{-4}$	10,61			10,6	$2,61 \times 10^{-2}$ (1,6)	-----	-----	-----	-----	-----	
		13	$1,31 \times 10^{-4}$	10,25			10,6	$7,0 \times 10^{-3}$ (0,42)	-----	-----	-----	-----	-----	
		14	$3,3 \times 10^{-4}$	12,05			10,0	$3,2 \times 10^{-3}$ (0,19)	-----	-----	-----	-----	-----	
		15	$3,3 \times 10^{-4}$	9,10			10,0	0,134 (8,0)	-----	-----	-----	-----	-----	
d	$3,3 \times 10^{-5}$	9	$3,3 \times 10^{-4}$	10,15	CTAB 0,0025	Borato 0,005, KCl 0,02	10,0	$6,8 \times 10^{-4}$ (0,04)	-----	-----	-----	-----	-----	36
		10		8,10				$4,65 \times 10^{-5}$ ($2,8 \times 10^{-3}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
		11		8,45				$5,32 \times 10^{-5}$ ($3,2 \times 10^{-3}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
		14		12,05				$4,9 \times 10^{-6}$ ($2,9 \times 10^{-3}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
		15		9,10				$2,53 \times 10^{-5}$ ($1,5 \times 10^{-3}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
		16		8,10				$6,5 \times 10^{-6}$ ($3,9 \times 10^{-4}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
		3		10,0				$2,7 \times 10^{-6}$ ($1,6 \times 10^{-4}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
		17		-----				$1,37 \times 10^{-5}$ ($8,2 \times 10^{-4}$)	-----	-----	-----	-----	-----	
a	$2,0 \times 10^{-5}$	18	$1,5 \times 10^{-3}$	9,9	CTAB 0,01	HEPES 0,05	7,2	$9,8 \times 10^{-3}$ (0,59)	$1,23 \times 10^{-4}$ ($7,4 \times 10^{-3}$)	80	-----	0,82 (49,2)	-----	42
		19	$1,5 \times 10^{-3}$	9,3		HEPES 0,05	7,2	$6,5 \times 10^{-3}$ (0,39)	$1,23 \times 10^{-4}$ ($7,4 \times 10^{-3}$)	53	-----	0,82 (49,2)	-----	
	$5,0 \times 10^{-6}$	20	$1,5 \times 10^{-3}$	9,3		HEPES 0,05	7,2	$1,23 \times 10^{-4}$ ($7,4 \times 10^{-3}$)	$1,23 \times 10^{-4}$ ($7,4 \times 10^{-3}$)	----	-----	0,82 (49,2)	-----	

--- Informações não encontradas no trabalho citado. Não foi possível calcular os valores omitidos a partir dos dados contidos nas publicações referenciadas.

Na década de 70 os estudos de reações em presença de anfílicos eram realizados em condições, muitas vezes, sem controles adequados e várias informações eram omitidas. Isso torna um pouco complicado comparar os resultados da literatura com os obtidos nesse trabalho. Porém, até onde podemos, estaremos comparando e argumentando.

Em grande parte dos artigos citados na tabela 11 foram encontrados os dados de $k_{\psi_{MAX}}$. Muitos trabalhos não citam a contribuição da hidrólise alcalina em reações de oximólise. É importante descontar essa contribuição para que $k_{\psi_{MAX}}$ seja expressa em termos de velocidade máxima somente de oximólise. No artigo de Bunton 1982, ele cita que os dados anteriores por ele publicados não correspondem aos dados de oximólise pois, até então, ele não considerava a contribuição da hidrólise alcalina nos dados de $k_{\psi_{MAX}}$. Além disso, ao analisar os dados experimentais, percebe-se que nos primeiros artigos os autores trabalhavam em condições muito diluídas, não acompanhando todo o comportamento de da reação numa faixa grande de concentração de anfílicos. Os dados de $k_{\psi_{MAX}}$ são confiáveis desde a hidrólise alcalina tenha sido descontada e a velocidade de reação tenha sido determinada desde a CMC até concentrações de detergente suficientes como para atingir a $k_{\psi_{MAX}}$.

O maior $k_{\psi_{MAX}}$ para a oximólise de PNPDP é da ordem de 72 min^{-1} , no trabalho de Courdec, na qual a oxima está em uma relação de 1:1 com CTAC formando CTAox. A concentração de oxima utilizada foi 0,01 M, em tampão Borato pH 8,0.

Porém, devemos considerar não somente $k_{\psi_{MAX}}$, mas o fator de aceleração ($k_{\psi_{MAX}} / k_{\psi}^o$) que expressa a contribuição real da oxima na catálise da reação. Para o $k_{\psi_{MAX}}$ de 72 min^{-1} , temos um AF de 800 na referência 31, porém, nossos dados da tabela 11, indicam que um $k_{\psi_{MAX}}$ de $11,5 \text{ min}^{-1}$ corresponde a um AF de 5 milhões. Isso se deve ao fato de que a oxima depende do meio para potencializar a sua reação com o éster organofosforado e que, dependendo do meio, existe competição pela camada de Stern pelos contra-íons, pelo hidróxido, e pelo próprio tampão, além da oxima. Portanto, não adianta tentar reagir altas concentrações de oxima sem controlar as condições experimentais, pois, desta forma, pode-se até observar um aumento da velocidade da reação, que não corresponde necessariamente a um grande fator de aceleração por oximólise. Assim, podemos utilizar uma concentração mínima do nucleófilo e ajustar as condições para que a catálise por oximas seja potencializada.

Mas se alguns valores de $k_{\nu_{MAX}}$ são pouco confiáveis, a determinação dos valores de k_m^2 constitui um problema bem mais sério. Isso porque em 1979 foi primeiramente descrita pelo nosso grupo a teoria de pseudofase com considerações de troca iônica. Esse modelo teórico aliou o conhecimento da teoria de pseudofase, anteriormente descrita por Martinek e colaboradores, aos conceitos de troca iônica necessários para descrever os sistemas nos quais estamos tratando. Porém, muitos artigos foram publicados sem esses tratamentos, gerando publicações experimentais sem padrão de controles ou considerações teóricas. É nessa fase que observamos valores de k_m^2 nada confiáveis.

O valor de k_m^2 é obtido através do ajuste dos dados experimentais com o respectivo modelo teórico e, deste modo, fazendo valer todas as condições em que o experimento foi realizado e todas as características relevantes das espécies envolvidas nessas reações.

Sendo assim, somente poderíamos considerar valores de k_m^2 comparáveis na literatura para aqueles artigos que consideram o ajuste teórico de acordo com os modelos experimentais.

As referências 32 e 34 não consideram a teoria e não informam como calculam k_m^2 ; as referências 36 e 42 simplesmente omitem k_m^2 e a referência 31 relata que a teoria não ajusta seus dados. Portanto, não temos valores publicados comparáveis aos valores de k_m^2 do nosso trabalho.

6. CONCLUSÕES

Foram estudadas as reações de oximólise de PNPDP em micelas positivas, CTAC, zwitteriônicas, HPS, e em vesículas, DODAC. Todos os sistemas foram analisados do ponto de vista teórico utilizando-se os modelos de PP, sem considerações de troca iônica e PIE, modelo em que a troca iônica é considerada, para determinar as constantes de velocidade de reação nas interfaces destes agregados.

Neste trabalho, foi realizada uma análise completa dos fatores que aceleram as reações de oximólise de PNPDP em diversos modelos biomiméticos, várias oximas foram utilizadas para encontrar o melhor sistema e diversas condições foram consideradas para determinar os melhores fatores de aceleração e de reação em agregados. Apresentamos dados completos das cinéticas das reações em presença de anfifílicos com todos os parâmetros teóricos utilizados a cada passo tais como a determinação de k_m^2 pelos ajustes das curvas de k_ψ vs [anfifílico]. Este é o trabalho mais completo no que diz respeito à catálise micelar e lipossomal em condições mais rápidas e brandas para reações de oximólise de ésteres de fosfato.

A oxima que demonstrou maior reatividade em condições brandas foi a IV, que reagiu com CTAC em pH 7,0 levando a um fator de aceleração, $k_{\psi_{MAX}}^o / k_\psi^o$ (AF), de 10^4 e um fator de catálise na micela, k_m^2 / k_{ox}^2 (AFM) de 7, assim como ocorreu com HPS em pH 7,5; a reação em DODAC em pH 6,5 resultou num AF de 10^7 e um AFM de aproximadamente 30. Esses resultados demonstram que a oxima IV é a mais eficiente para decompor ésteres organofosforados em condições que se aproximam as necessárias para considerar estes sistemas com potenciais aplicações práticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McBain, J. W., *Trans. Faraday Soc.* **1913**, 9, 99.
2. Bunton, C. A., Nome, F., Quina, F., Romsted, L., Ion Binding and Reactivity at Charged Aqueous Interfaces. *Accounts of Chemical Research* **1991**, 24, (12), 357-364.
3. Fendler, J. H., Membrane Mimetic Chemistry. Characterizations and Applications of Micelles, Microemulsions, Monolayers, Bilayers, Vesicles, Host-guest Systems, and Polyions. **1982**.
4. Dwars, T., Paetzold, E., and Oehme, G., Reactions on Micellar Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 7174-7199.
5. Tascioglu, S., Micellar Solutions as Reaction Media. *Tetrahedron* **1996**, 52, (34), 11113-11152.
6. Banghan, A. D., and Horne R. W., *Journal of Molecular Biology* **1964**, 8, 660-668.
7. Kunitake, T., Okahata, Y., Tamaki, K., Kumamura, F., and Takayanagi, M., Formation of Bilayer Membrane from a Series of Quarternary Ammonium Salts. *Chem. Lett.* **1977**, 387-390.
8. Mortara, R. A., Quina, F. H., Chaimovich, H., *Biochemical and Biophysical Journal.* **1978**.
9. Banghan, A. D., Stadinsk, M. M. and Watkins, J. C., Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, (13), 238-252.
10. Huang, C., Studies of Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and Physical Characteristics. *Biochemistry* **1969**, (8), 344-352.
11. Kano, K., Romero, A., Djermouni, B. and Fendler, J. H., Characterization of Surfactant Vesicles as Mimetic Agents. II. Temperature-Dependent Changes of the turbidity, Viscosity, Fluorescence Polarization of 2-Methylantracene, and Positron Annihilation in Sonicated Dioctadecyldimethylammonium Chloride. *Journal of American Chemical Society* **1979**, (101), 4030-4037.
12. Hauser, H. F. F., Lipids. *Water, A Comprehensive Treatise* **1975**, 4, 209-303.
13. Hauser, H. R. D. D., Water/Phospholipid Interactions. *Water Relations of Food* **1975**, 37-71.

14. Tanford, C., The Hidrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes, 2nd ed. **1980**.
15. Jung, H. T., Coldren, B., Zasadzinski, J. A., Lampietro, D. J., Kaler, E. W., The origins of stability of spontaneous vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, (4), 1353-1357.
16. Rosa, M., Rosa Infante, M., Miguel Mda, G., Lindman, B., Spontaneous formation of vesicles and dispersed cubic and hexagonal particles in amino acid-based catanionic surfactant systems. *Langmuir* **2006**, 22, (13), 5588-5596.
17. Chrzesczyk, A., Wishnia, A., Springer, C. S. Jr., The intrinsic structural asymmetry of highly curved phospholipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* **1977**, 470, (2), 161-169.
18. Bonosi, F., Gabrielli, G., DODAC in bidimensional states Monolayers, Langmuir-Blodgett films and vesicles. *Colloids and Surfaces A: Phisicochemical Eng. Aspects* **1991**, 52, 271-285.
19. Oumar-Mahamat, H., Slebocka-Tilk, H., and Brown, R. S., Long Chain β -aminoethanols as Micellar Catalysts for the Hydrolysis of diphenyl-*p*-nitrophenylphosphate. The Observation of an Unusual Enhancement of Catalysis in the Presence of Added Polyols. *Can. Journal Chem.* **1999**, 77, 1577-1588.
20. Yang, Y. B., J. A. and Ward, J. R., Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Chemical Review* **1992**, 92, (8), 1729-1743.
21. Aldridge, W. N. D., A.N., The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-esters of Phosphoric Acid. *Biochemical Journal* **1952**, 52, 663-669.
22. Mackay, R. A., Chemical Detoxification in Amphiphilic Systems. *Reactions and Syntesis in Surfactant Systems*. **2004**, 100, 373-383.
23. Yang, Y., *Chem. Ind.* **1995**, 334.
24. Athanassakis, V., Bunton, C. A., McKenzie, D. C., *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 5855-5862.
25. Bunton, C. A., Farber, S. J., Fendler E. J., The Hydrolysis of *p*-NitrophenylDiphenyl Phosphate. *The Journal of Organic Chemistry*. **1968**, 33, (1), 29-33.
26. de Souza, E. F., and Ionescu, L. G., Micellar-catalyzed Reactions of a Phosphate Ester: Effect of the Dielectric Constant of the Medium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **1999**, 149, 609-615.

27. Epstein, J., Callahan, J. J., Bauer, V.E., *Phosphorus* **1974**, 4, 157.
28. Domingos, J. B. L., Elisane; Machado, Vanderlei G. e Nome, Faruk, A Química dos Ésteres de Fosfato. *Quimica Nova* **2003**, 26, (5), 745-753.
29. Cahn, R. S., Ingold, C. K., Prelog, V., The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. *Experimentia* **1956**, 12, (3), 81 - 94.
30. Raoult, A., Vilkas, M., Reactivité des Aldoximes Aromatiques vis-à-vis des Acetates de p-nitrophényle et de p-nitrothiophényle. *Bull. Soc. Chim. France* **1968**, 8, 3315.
31. Brady, O. L., Goldstein, R. F., The isomerism of the oximes. Part XXV. The dissociation constants of some isomeric aldoximes. *Journal Chemical Society* **1926**, 1918-1924.
32. Brady, O. L., Chokshi, N. M., The isomerism of the oximes. Part XXXIV. The dissociation constants of isomertic oximes and their influence on the production of the isomerides in alkaline solution. *Journal Chemical Society* **1929**, 946-951.
33. Tarkka, M. R., and Buncel, E., Origin of Bell-Shaped α -Effect-Solvent Composition Plots. pKa-Solvent Dependence of the α -Effect at a Phosphorus Center. *Journal of American Chemical Society* **1995**, 117, 1503-1507.
34. Courdec, S. a. T., J., Catalysis of Phosphate Triester Hydrolysis by Micelles of Hexadecyltrimethylammonium *anti*-Pyrualdehyde 1-Oximate. *Langmuir* **2001**, 17, 3819-3828.
35. Bunton, C. A., Ihara, Y., Micellar Effects upon Dephosphorylation and Deacylation by Oximate Ions. *J. Org. Chem.* **1977**, 42, (17), 2865-2869.
36. Bunton, C. A., Hamed, F. H., Romsted, L. S., Quantitative Treatment of Reaction Rates in Functional Micelles and Comicelles. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 2103-2108.
37. Bunton, C. A., Gillitt, N. D., Foroudian, H.J., A Quantitative Treatment of Desphosphorylation by an Amphiphilic Hydroxamate Ion. The Role of Micellar Charge. *Langmuir* **1998**, 14, 4415-4421.
38. Bunton, C. A., Foroudian, H. J., Gillitt, N. D., Effects of Headgroup Struture on Dephosphorylation of *p*-Nitrophenyl Diphenyl Phosphate by Functional Oximate Comicelles. *Langmuir* **1999**, 15, 1067-1074.
39. Dai, Q., Huang, Q., Deng, Y., Synthesis and Reaction of a Powerful Nucleophilic Long-Chain Imidazole-2-aldoxime. *Chinese Journal of Organic Chemistry.* **2002**, 22, (2), 130-134.

40. Degorre, F., Kiffer, D., Terrier, F., Sulfur Derivatives of 2-Oxopropanal Oxime as Reactivators of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase in Vitro: Synthesis and Structure-Reactivity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **1988**, 31, (4), 757-763.
41. Epstein, J. K., J. J.; Bodor, N.; Enever, R.; Sowa, J.; and Higuchi T., Micellar Acceleration of Organophosphate Hydrolysis by Hydroximinomethylpyridinium Type Surfactants. *J. Org. Chem.* **1978**, Vol. 43, (No. 14), 2816-2832.
42. Ghosh, K. K., Satnami, M. L., and Sinha, D., Dephosphorilation of Paraoxon by Hydroxamate Ions in Micellar Media. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 9103-9105.
43. Ghosh, K. K., Sinha, D., Satnami, M. L., Dubey, D. K., Rodriguez-Dafonte, P., and Mundhara, G. L., Nucleophilic Dephosphorilation of *p*-Nitrophenyl Diphenyl Phosphate in Cationic Micellar Media. *Langmuir* **2005**, 21, 8664-8669.
44. Ghosh, K. K., Satnami, M. L., Nucleophilic Substitution Reaction of Carboxylate and Phosphate Esters with Hydroxamate Ions in Microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Eng. Aspects* **2006**, 274, 125-129.
45. Kotoucova, H., Cibulka, R., Hampl, F., LisKa, F., Amphiphilic Quaternary Pyridinium Ketoximes as Functional Hydrolytic Micellar Catalysts - Does the Nucleophilic Function Position Influence their Reactivity? *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2001**, 174, 59-62.
46. Quarti, N., Marques, A., Blagoeva, I., and Ruasse, M., Optimization of Micellar Catalysis of Nucleophilic Substitutions in Buffered Cetyltrimethylammonium Salt Solutions. 1. Buffers for the 9-10 pH Range. *Langmuir* **2000**, 16, 2157-2163.
47. Zanette, D. C., H., Effect of Hexadecyltrimethylammonium Bromide Micelles on the Rate of Oximolysis of Esters. *Journal of Physical Organic Chemistry* **1992**, 5, (6), 341-348.
48. Um, I.-H., Oh, S.-J., Kwon, D.-S., The Effect of Solvent on the α -Effect: Abnormal Nucleophilic Reactivity of Substituted Acetophenone Oximate in Aqueous DMSO. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, (38), 6903-6906.
49. Chaimovich, H., Bonilha, J.B.S., Politi, M.J. and Quina, F.H., Ion Exchange in Micellar Solutions. 2. Binding of Hydroxide Ion to Positive Micelles. *The Journal of Physical Chemistry*. **1979**, 84, (14), 1851-1854.
50. Menger, F. M., and Portnoy, C. E., On the Chemistry of Reactions Inside Molecular Aggregates. *Journal of American Chemical Society* **1967**, 89, (18), 4698-4703.

51. Bunton, C. A., Robinson, L., Micellar Effects upon the Reaction of *p*-NitrophenylDiphenyl Phosphate with Hydroxide and Fluoride Ions. *The Journal of Organic Chemistry* **1969**, 34, (4), 773-780.
52. Bunton, C. A., Moffatt, J. R., Micellar Effects upon Substitutions by Nucleophilic Anions. *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 2896-2902.
53. Biresaw, G., Bunton, C. A., Size vs. Reactivity in "Organized Assemblies": Deacylation and Dephosphorilation in Functionalized Assemblies. *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 5849-5853.
54. Baptista, M. S., Politi, M. J., Dipole Oriented Anion Binding and Exchange in zwitterionic Micelles. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 5936-5942.
55. Baptista, M. S., Cuccovia, I. M., Chaimovich, H., Politi, M. J., and Reed, W. F., Electrostatic Properties of Zwitterionic Micelles. *Journal of Physical Chemistry* **1992**, 96, 6442-6449.
56. Cuccovia, I. M., Romsted, L. S., Chaimovich, H., Determination of Halide Concentrations at the interface of Zwitterionic Micelles by Chemical Trapping. Influence of the Orientation of the Dipole and the Nature of the Cation. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 220, 96-102.
57. Martinek, K., Yatsimirski, A. K., Levashov, A. V., and Berezin, I. V., The Kinetic Theory and the Mechanisms of Micellar Effects on Chemical Reactions., 489-507.
58. Yatsimirski, A. K. M., K. and Berezin, I. V., Mechanism of Micellar Effects on Acylation of Aryl Oximes by *p*-Nitrophenyl Carboxilates. *Tetrahedron* **1971**, 27, 2855-2868.
59. Hine, J., Haworth, H. W., Ramsay, B., Polar Effects on Rates and Equilibria. VI. The Effect of Solvent on the Transmission of Polar Effects. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (10), 1473-1963.
60. Jenks, W. P., Catalysis in chemistry and Enzymology. *McGraw-Hill Series in Advanced Chemistry*. **1969**.
61. Bunton, C. A., Reactivity in Aqueous Association Colloids. Descriptive of the Pseudophase Model. *Journal of Molecular Liquids*. **1997**, 72, 231-249.
62. Quina, F. H. a. C., H., Ion Exchange in Micellar Solutions. 1. Conceptual Framework for Ion Exchange in Micellar Solutions. *Journal of Physical Chemistry* **1979**, 83, (14), 1844.

63. Chaimovich, H. B., A.; Chayet, L.; Costa, L. M. and Monteiro, P. M.; Bunton, C. A. and Paik, C., Micellar catalysis of the reaction of 2,4-dinitrofluorobenzene with phenoxide and thiophenoxide ions. *Tetrahedron* **1975**, 31, (9), 1139-1143.
64. Schales, O., and Schales, S. S., A simple and accurate method for determination of chloride in biological fluids. *J. Biol. Chem.* **1941**, 140, (3), 879-884.
65. Oliveira, A. G., Cuccovia, I. M., and Chaimovich, H., Micellar Modification of Drug Stability: Analysis of the Effect of Hexadecyltrimethylammonium Halides on the Rate of Degradation of Cephaclo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1990**, 79, (1), 37-42.
66. Cuccovia, I. M., Kawamuro, M. K., Krutman, M. A. K., Chaimovich, H., Control Reaction Rates in Vesicular Systems. *Journal of American Chemical Society*. **1989**, 111, 356-366.
67. Chaimovich, H., Aleixo, R. M. V., Cuccovia, I. M., Zanette, D., Quina, F.H., The Quantitative Analysis of Micellar Effects on Chemical Reactivity and Equilibria: An Evolutionary Overview. *Solution Behavior of Surfactants. Theoretical and Applied Aspects* **1982**, 2, 949-973.
68. Bunton, C. A., Savelli, G., Organic Reactivity in Aqueous Micelles and Similar Assemblies. *Advances in Physical Organic Chemistry*. **1986**, 22, 213-309.
69. Chaimovich, H., Zanette, D., Bonilha, J. B. S., Cuccovia, I. M., Plenum Press: New York, 1984; Vol. 2, p 1121-1138.
70. Romsted, L. S., Plenum Press: New York, 1984; Vol. 2, p 1015-1068.
71. Souza, T. P., Zanette, D., Kawanami, A.E., de Rezende, L., Ishiki, H.M., do Amaral, A.T., Chaimovich, H., Agostinho-Neto, A., Cuccovia, I.M., pH at the micellar interface: Synthesis of pH probes derived from salicylic acid, acid-base dissociation in sodium dodecyl sulfate micelles, and Poisson-Boltzmann simulation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 297, 292-302.
72. Matos, C., Chaimovich, H., Lima, J.L.F.C., Cuccovia, I.M. and Reis, S., Effect of Liposomes on the Rate of Alkaline Hydrolysis of Indomethacin and Acemetacin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2001**, 90, (3), 298-309.
73. Abuin, B. E., Lissi, E., Araujo, P. S., Aleixo, R. M. V., Chaimovich, H., Bianchi, N., Miola, L., Quina, F. H., Selectivity Coefficients for Ion Exchange in Micelles of Hexadecyltrimethylammonium Bromide and Chloride. *Journal of Colloid and Interface Science*. **1983**, 96, (1), 293-295.

74. Souza, S. M. B., Chaimovich, H., and Politi, M. J., Effects of Urea on Dioctadecyldimethylammonium Monolayers. *Langmuir* **1995**, 11, 1715-1719.
75. Scarpa, M. V., Maximiano, F. A., Chaimovich, H., Cuccovia, I. M., Interfacial Concentrations of Chloride and Bromide and Selectivity for Ion Exchange in Vesicles Prepared with Dioctadecyldimethylammonium Halides, Lipids, and Their Mixtures. *Langmuir* **2002**, 18, 8817-8823.
76. Sikder, N., Sikder, A. K., Hydrolysis of organophosphate catalyzed by long chain hydroxyiminomethyl pyridinium type surfactants. *Oriental Journal of Chemistry* **1997**, 13, (3), 225-230.
77. Hampl, F., Mazac, J., Liska, F., Srogl, J., Kabrt, L., Suchanek, M., Quaternary heteroarenium aldoximes as catalysts for cleavage of phosphate esters. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1965**, 60, (5), 883-893.
78. Katrolia, S. P., Sikder, A. K., Acharya, J., Sikder, Nirmala, Jaiswal, D. K., Bhattacharya, R., Husain, K., Dube, S. N., Kumar, Deo, Das Gupta, S., Antidotal efficacy of 1-alkyl pyridinium oximes in sarin intoxication. *Pharmacology Communications* **1994**, 4, (4), 317-325.
79. Yamanaka, S., Suyama, Y., Nishimura, M., Efficacy of several oximes on organophosphorus poisoning. *Nippon Eiseigaku Zasshi* **1988**, 43, (3), 707-716.
80. Burger, N., Karas-Gaspares, V., Spectrophotometric studies of the reactions of pentacyanoferrate(II) complexes with three N-heterocyclic aldoximes. *Talanta* **1984**, 31, (3), 169-172.
81. De Neef, J. H., Porsius, A. J., The influence of obidoxime, diacetylmonoxime, pralidoxime, and two less hydrophilic derivatives of pralidoxime upon the cholinesterase inhibition and the pressor effect by paraoxon in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1982**, 66, (2), 244-251.
82. Mager, P. P., Das Gupta, S., Quantitative structure-activity relationships of reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase. Part 2. *Pharmazie* **1982**.
83. Smeric, Z., Burger, N., Hankonyi, V., Karas-Gaspares, V., Pentacyanoferrate(II) ions as spot tests and chromatographic reagents for tertiary and quaternary pyridine aldoximes. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica* **1981**, 31, (2).
84. Tomita, Y. G., G. G., Coating for a piezoelectric crystal sensitive to organophosphorus pesticides. *Analytical Chemistry* **1980**, 52, (9), 1484-1489.

85. De Jong, L. P. A., Wolring, G. Z., Effect of 1-(ar)alkyl-2-hydroxyiminomethylpyridinium salts on reactivation and aging of acetylcholinesterase inhibited by ethyl dimethylphosphoramidocyanidate (tabun). *Biochemical Pharmacology*. **1978**, 27, (18), 2229-2235.
86. Serafin, B., Majewski, M., Kleinrok, Z., Jagiello-Wojtowicz, E., Rajtar, G., Sieklucka-Dziuba, M., Kolasa, K., Potential acetylcholinesterase reactivators. Oxime and amidoxime derivatives. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **1976**, 24, (6), 901-910.
87. Benschop, H. P., De Jong, L. R. A., Vink, J. A. J., Kienhuis, H., Berends, F., Elskamp, D. M. W., Kepner, L. A., Meeter, E., Visser, R. P. L. S., The prophylactic value of oximes against organophosphate poisoning. *Med. Prot. Chem.-Warf. Agents* **1976**, 120-33.
88. Davies, D. R., Holland, P., Effect of oximes and atropine upon the development of delayed neurotoxic signs in chickens following poisoning by DEP [diisopropyl phosphorofluoridate] and Sarin. *Biochemical Pharmacology* **1972**, 21, (23), 3145-3151.
89. Kawai, M., Mitomi, M., Hosone, H., Mizuno, H., The efficiency of 2-pyridine aldoxime dodeciodide (PAD) against organic phosphate poisoning. *Boei Eisei* **1960**, 7, 1-6.
90. Castro, A. T., Figueroa-Villar, J. D., Molecular Structure, Conformational Analysis and Charge Distribution of Pralidoxime: Ab Initio and DFT Studies. *International Journal of Quantum Chemistry*. **2002**, 89, (3), 135-146.