IOLANDA MIDEA CUCCOVIA

REAÇÕES QUÍMICAS EM INTERFACES
TIÓLISE DE ÉSTERES DE p-NITROFENILA EM MICELAS E LIPOS-
SOMOS. HIDRÓLISE DE 2- FENILIMINOTETRAHIDROFURANO EM
MICELAS

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica do Instituto
de Química da Universidade de São Paulo

São Paulo
1980

AGRADECIMENTOS

Esta tese é resultado da contribuição de várias pessoas e, por este motivo, ela é dedicada a cada membro do laboratório que, em maior ou menor grau, contribuiu para sua elaboração.

Ao Hernan Chaimovich, pela segurança com que me orientou e pelo entusiasmo demonstrado durante a elaboração deste trabalho.

À Regina pelo seu carinho e apoio.

Ao Renato por sua alegria, carinho e compreensão.

Ao Mario Xudes por estar sempre disponível e aberto a discussões e pelas sugestões e crítica ao trabalho realizado.

À Maria Lúcia por ter me ensinado a ver as pessoas de forma menos rígida e mais humana.

Ao Pedrinho Berci por seus momentos de generosidade e coleguismo.

Ao Frank que consegue ser a pessoa mais prestativa e acessível que eu conheço.

Ao Pedrinho Araújo pela doçura e bom humor,

Ao Serginho pelo entusiasmo e espírito crítico.

À Vani, Sandra, Bonilha, Laerte, Edson, Benê, Neusa, Vicente e Ricardo pelo seu companheirismo.

Aos meus pais, Margherita e Mauro porque me de
ram muito amor.

Finalmente, à Elisa e à Los porque sem elas es
tes anos teriam sido muito difíceis.

Este trabalho foi realizado com o auxílio finanan
ceiro da FAPESP.

Í N D I C E

	pg
Símbolos e Abreviaturas	I
1. Introdução	1
1.1 - Micelas	5
1.1.1 - Efeito de Micelas sobre velocidade de reações e equilíbrios químicos	13
1.1.2 - Tratamentos matemáticos de efeitos de detergentes sobre velocidades de reações	17
1.1.2.1 - Modelo de Pseudo-Fase	17
1.1.2.2 - Modelo de Troca-Iônica	22
1.2 - Lipossomos	30
1.2.1 - Características Físicas e Propriedades de vesículas formadas por fosfolipídeos	32
1.2.2 - Características Físicas e Propriedades de vesículas formadas por anfifílicos sintéticos	37
1.2.2.1 - Características Físicas	38
1.2.2.2 - Efeito de lipossomos sobre a velocidade de reações	40
1.3 - Reações de Grupos SH	41
1.4 - Hidrólise de Imonolactonas	44
1.5 - Objetivos	47
2. Material e Métodos	48
2.1 - Material	48
2.1.1 - Dodecilsulfato de sódio (SDS)	48
2.1.2 - Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (CTAB)	48
2.1.3 - n-Heptilmercaptana (HM)	49
2.1.4 - 4-(-1-pireno) butanoato de metila (PBM)	49

	pg
2.1.5 - Herquat	49
2.1.6 - Tetrafluorborato de prata	51
2.1.7 - 4-clorobutiranilida	52
2.1.8 - 2-Feniliminotetrahidrofurano	52
2.1.9 - Metilsulfato de sódio	53
2.1.10- Outros	53
2.2 - Métodos	54
2.2.1 - Determinação das concentrações de CTAB e Herquat	55
2.2.2 - Determinação da concentração de n-heptilmercaptana	55
2.2.3 - Cinética	55
2.2.3.1 - Tiólise de ésteres de p-nitrofenol	55
2.2.3.2 - Hidrólise de 2-Feniliminotetra hidrofurano (FI)	56
2.2.4 - Determinação da relação de produtos da hidrólise de FI	56
2.2.5 - Determinação da constante de distribuição da n-heptilmercaptana	57
2.2.6 - Determinação do pK aparente (pK _{ap}) de HM	58
2.2.7 - Preparação de vesículas de Herquat	59
2.2.7.1 - Sonicação	59
2.2.7.2 - Injeção	59

2.2.7.2.1 - Preparação de vesículas para estudos cinéticos	pg 60
2.2.7.2.2 - Preparação de vesículas com (^{14}C)glicose	60
2.2.7.2.3 - Preparação de vesículas contendo PBM	60
2.2.7.2.4 - Preparação de vesículas contendo TPA	61
2.2.7.2.5 - Preparação de vesículas de Herquat contendo DTNB	61
2.2.8 - Cromatografia em coluna	61
2.2.9 - Determinação de radioatividade	62
2.2.10- Determinação de k_{ψ} da reação de tiólise de NPA por HM das frações obtidas em Sephadex G-25	62
2.3 - Aparelhos	62
3. Resultados	64
3.1 - Tiólise de ésteres em fase micelar	64
3.1.1 - Determinação da constante de segunda ordem da reação de tiólise de NPA por n-Heptilmercaptana	65
3.1.2 - Efeito de CTAB na tiólise de ésteres	67

3.1.2.1 - Determinação das constantes de distribuição de NPA e NPO na presença de CTAB	pg 72
3.1.2.2 - Determinação de K_{HM} em CTAB	72
3.1.2.3 - Efeito de CTAB no pKap da HM	74
3.1.2.4 - Efeito de CTAB na tiólise de NPA por HM	77
3.1.2.5 - Efeito de CTAB na tiólise de NPO por HM	81
3.1.3 - Efeito de SDS na tiólise de NPO por HM	87
3.1.3.1 - Determinação de K_{HM} em SDS	87
3.1.3.2 - Efeito de SDS no pKap da HM	89
3.1.3.3 - Efeito de SDS na tiólise de NPO por HM	91
3.1.4 - Efeito de SDP na tiólise de NPO	93
3.1.4.1 - Efeito de SDP no pKap da HM	93
3.1.4.2 - Efeito de SDP na tiólise de NPO	95
3.1.5 - Efeito de Brij-35 na tiólise de NPO por HM	97
3.1.6 - Efeito de Detergentes na tiólise de ésteres	97

	pg
3.2 - Tiólise de Ésteres em Interfaces provenientes de agregados de Herquat	100
3.2.1 - Algumas características Físicas das Preparações de Herquat	100
3.2.1.1 - Preparação de vesículas de Herquat em água	100
3.2.1.2 - Preparação de vesículas de Herquat em tampão borato	103
3.2.1.3 - Preparação de vesículas de Herquat em tampão acetato 5mM, pH 5.35	106
3.2.2 - Efeito de Herquat no pKap da HM	110
3.2.3 - Efeito de Herquat na tiólise de NPA por HM	115
3.2.4 - Efeito de Herquat na tiólise de NPO por HM	121
3.2.5 - Reação de TPA e HM em vesículas de Herquat	124
3.3 - Efeito de SDS na hidrólise de 2-Fenilimino-tetrahidrofurano (FI)	125
3.3.1 - Efeito de SDS na reação de hidrólise de FI	125
3.3.2 - Efeito de SDS na relação de produtos de hidrólise de FI	136
4. Discussão	140
4.1 - Efeito de micelas na tiólise de ésteres	140
4.2 - Efeito de Herquat na tiólise de ésteres	161

	pg
4.3 - Hidrólise de FI em fase micelar	171
5. Sumário	176
Summary	
6. Referências Bibliográficas	182

I

Símbolos e Abreviaturas

α	grau de dissociação da micela
C_D	concentração de detergente total menos a CMC
CMC	concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
FI	2-feniliminotetrahydrofurano
Herquat	cloreto de dimetildialquilamônio
HM	n-heptilmercaptana
k_ψ	constante de velocidade observada
$k_{\psi\text{máx}}$	constante de velocidade máxima observada em presença de detergente
k_o	constante de velocidade observada em fase aquosa
k_2^o	constante de velocidade de segunda ordem em fase aquosa
k_2^m	constante de velocidade de segunda ordem em fase micelar
k_m^o	constante de velocidade de primeira ordem em fase aquosa
k^m	constante de velocidade de primeira ordem em fase micelar
K_{HM}	constante de associação da HM com micelas
K_s	constante de associação de ésteres com micelas
$K_{A/y}$	constante de seletividade do substrato A e o contraíon y da micela
$K_{x/y}$	constante de seletividade do íon x e o contraíon y da micela
$\bar{N}$	número de agregação médio da micela

II

NPA	acetato de p-nitrofenila
NPO	octanoato de p-nitrofenila
pK _{ap}	pK da HM em presença de detergente
S _o	solubilidade máxima da HM em água
S _m	solubilidade máxima da HM em presença de detergente
SDP	3-(N,N dimetildodecilamônio) propano-1-sulfonato
SDS	dodecilsulfato de sódio
$\bar{V}$	volume molar parcial do detergente micelizado

1. INTRODUÇÃO

Compostos anfifílicos apresentam em sua estrutura molecular uma região de caráter hidrofóbico e outra de caráter hidrofílico, que pode ou não apresentar carga líquida (Fendler e Fendler, 1975; Mittal, 1977). A natureza desses anfifílicos - abrange uma ampla faixa de estruturas que incluem constituintes - de membranas biológicas, entre as quais podemos citar os ácidos graxos, fosfoglicerídeos e derivados de colesterol (Tanford, 1973). Entre os anfifílicos sintéticos podemos mencionar, como exemplo, sais de amônio quaternário com uma ou mais cadeias hidrocarbônicas longas (Fendler e Fendler, 1975; Kunitake e col, 1977; Okahata, Ando e Kunitake, 1977), alquil sulfatos (Shinoda e col, 1963) mono e dialquilsulfatos (Fendler e Fendler, 1975; Mortara, Quina e Chaimovich, 1979), anfifílicos zwitteriônicos (Kunitake e Okahata, 1977; Fendler e Fendler, 1975) e não iônicos (Shinoda e col., 1963).

As estruturas dos anfifílicos citados com mais frequência nesta tese aparecem abaixo

1 - Anfifílicos neutros

Lecitina

R=Cadeia alifática

3-(N,N dimetildodecilamônio)

2. Anfifílicos não iônicos

Triton X100

IGEPAL

3. Anfifílicos catiônicos

Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)

Cloreto de dimetil dioctadecilamônio (DODAC)

4. Anfifílicos Aniônicos

Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Dicetilfosfato (DCP)

Todos os compostos citados podem formar agregados, com características particulares, quando dissolvidos em água (Bangham e Horne, 1964; Tanford, 1973; Deguchi e Mino, 1978; Mortara, Quina e Chaimovich, 1978; Kunitake e Okahata, 1978). A organização e o tamanho desses agregados depende tanto da estrutura do monômero como da composição do meio (Romsted, 1975, Tanford 1973; Israelachvili, Mitchel e Ninham, 1976).

Anfifílicos com uma cadeia hidrocarbônica não ramificada, contendo mais de 10 carbonos, formam agregados (micelas) a partir de uma determinada concentração crítica (CMC) (Mittal, 1977). A adição de dodecanol em soluções aquosas de SDS, entretanto, induz a formação de estruturas compostas por uma bicamada de anfifílico que engloba um compartimento aquoso (vesículas - ou lipossomos) (Hargraves e Deamer, 1978).

A formação espontânea de vesículas de ácido oleico em dispersões aquosas diluídas, em condições definidas de pH, força iônica e temperatura foi demonstrada por Gebicke e Hicks (1973).

Anfifílicos contendo duas cadeias hidrofóbicas, com mais de 10 carbonos, podem formar bicamadas planas e/ou lipossomos quando dispersos em água (Dervichian, 1964; Bangham, - Standish e Watkins, 1965; Tanford, 1973; Deguchi e Mino, 1978). Entretanto, de Haas e col (1971) demonstraram que lecitinas contendo duas cadeias de ácido graxo de 6,7 ou 8 carbonos formam micelas em fase aquosa. Portanto, a formação de micelas ou lipossomos depende, fundamentalmente, do número e comprimento da(s) cadeia(s) hidrocarbônica(s) do anfifílico, de sua concentração e da composição do meio.

Faremos, em seguida, uma descrição breve das características físicas dos sistemas organizados que figuram neste trabalho. Trataremos, separadamente, micelas e lipossomos já que, como veremos mais adiante, as propriedades destes dois tipos de agregados são bastante diferentes.

Assim, esta Introdução será subdividida em: propriedades e características físicas de micelas e lipossomos, efeito destes agregados sobre velocidade de reações e equilíbrios químicos e uma análise sucinta de reações de tiólise de ésteres e hidrólise de iminolactonas que são os dois sistemas de reação utilizados neste trabalho.

1.1 - Micelas

Existe uma grande quantidade de informação a respeito das características físicas de micelas e do efeito destes agregados sobre velocidade de reações. Estas informações podem ser encontradas em revisões recentes (Berezin, Martinek e Yatsimirski, 1973; Fendler e Fendler, 1975; Chaimovich, 1979; Cordes, 1978). Abordaremos nesta Introdução apenas os aspectos das características físicas de micelas iônicas que sejam relevantes para a análise dos resultados deste trabalho.

A agregação de monômeros de anfifílicos monoalquilados (com cadeia hidrocarbônica com mais de dez carbonos) ou dialquilados (cadeias hidrofóbicas com menos de 8 carbonos) dá origem a estruturas denominadas micelas.

As micelas são agregados que existem em equilíbrio dinâmico com seus monômeros. As meias vidas de uma micela e da troca de monômeros com o meio são da ordem de microsegundos (Lang e col). A formação destes agregados se processa a partir de uma faixa de concentração específica para cada detergente e condições experimentais (CMC). A concentração de monômeros livres na presença de micelas diminui ligeiramente com o aumento da concentração de detergente enquanto que a concentração de monômeros livres aumenta (Sasaki, 1975; Quina e Toscano, 1977). A diminuição da concentração de monômeros é devida ao aumento da força iônica do meio provocada pela dissociação da micela. A relação observada entre a concentração de monômero livre (CMC) e a concentração

de sal é dada pela equação 1 (Shinoda e col. 1963; Barry e Russel 1972).

$$\log \text{CMC} = - (1 - \alpha) \log (\text{sal}) + K \quad (1)$$

onde K é uma constante específica para cada detergente e α , o grau de dissociação da micela, é definido como:

$$\alpha = \frac{\text{concentração de contraíons livres} - \text{CMC}}{\text{concentração total de contraíons livres} - \text{CMC}}$$

Desde que se observa uma dependência linear entre o $\log \text{CMC}$ e o $\log \text{sal}$, α deve ser constante (Shinoda e col., 1963).

Outros dados experimentais apoiam os resultados anteriores. McBain (1935) mostrou através de medidas de atividade de H^+ em soluções de ácido dodecilsulfônico (DSH) que o grau de dissociação da micela não muda com a concentração de detergente. Este dado foi confirmado posteriormente por Kolthoff e Johnston (1951) estudando a catálise ácida da reação entre acetona e iodo em micelas de DSH. Uma análise exaustiva da literatura feita por Romsted (1975) mostrou que, dentro do erro experimental dos diversos métodos empregados, α é constante quando se varia tanto a concentração de detergente quanto a força iônica do meio. Sasaki e col (1975), tentaram analisar a ligação de contraíons a micelas de SDS utilizando os modelos de ação de massas e separação de fases. No modelo de ação de massas, a formação de micela pode ser dada pelo seguinte equilíbrio:

onde DS^- é um monômero de SDS, Na^+ é o contraíon da micela e p e

q são o número de íons DS^- e Na^+ que fazem parte da micela. A condição de equilíbrio para este sistema é:

$$K_{eq} = \frac{a_m}{a_D^q \cdot a_{Na}^p}$$

onde a_m , a_D e a_{Na} são as atividades da micela, monômero e contra-íon. A equação acima pode ser expressa por:

$$\log a_D + r \log a_{Na} = \log \frac{a_m}{K_{eq}}$$

onde $r = \frac{p}{q} = (1 - \alpha)$

Utilizando-se o modelo de separação de fases a formação de micelas pode ser descrita por

onde $a_{Na}^q \cdot a_D^p = K$

e $\log a_D + R \log a_{Na} = \log K$

Do gráfico de $\log a_D$ vs $\log a_{Na}$ obteve-se uma linha reta cuja inclinação é $(1 - \alpha)$. Isto significa que o modelo que melhor descreve a formação de micelas é o da separação de fases, já que o modelo de ação de massas não prevê a linearidade entre $\log a_D$ e $\log a_{Na}$ (Sasaki e col, 1975). Os dois modelos, entretanto, preveem que o grau de dissociação da micela é constante. O modelo de pseudo fase leva a uma expressão que relaciona a concentração de monômeros (CM) com a concentração de sal (C_s) ou seja:

$$\log CM = - K \log (CM + C_S) - m$$

Esta expressão é idêntica à obtida empiricamente através de dados experimentais (eq.1).

O grau de dissociação da micela, entretanto, é sensível à estrutura da cabeça polar do anfifílico e dados de Geer Eylar e Anacker (1971) sugerem que quanto menor a distância entre os grupos polares do detergente, menor α . O valor de α aumenta com a temperatura e presença de álcoois ou detergente não iônicos (Pierci, Jones e Ibbotson, 1971; Lawrence e Pearson, 1967; Tokiwa e Moriyama, 1969).

A CMC diminui com o aumento do número de carbonos na cadeia alifática (n) através da seguinte relação:

$$\log CMC = A - Bn$$

onde A e B são constantes (Molyneaux, Rhodes e Swarbrick, 1965).

O tamanho das micelas está limitado pelo balanço entre a repulsão entre os grupos polares da micela e a tendência para a agregação dos grupos apolares devido à estruturação da água (Tanford, 1973; Israelachvili, Mitchel e Ninham, 1976). O peso molecular da micela (M), que tem relação direta com o número médio de agregação ($\bar{N}$), pode ser relacionado, através da equação 2, com CMC do detergente.

$$\log CMC = - K_1 \log \bar{M} + K_2 \quad (2)$$

O aumento da força iônica do meio conduz a um aumento de M e a expressão que relaciona estes dois fatores é a eq. 3.

$$\log \bar{M} = K_1 \log (\text{contração}) + K_2 \quad (3)$$

O interior hidrofóbico das micelas pode ser considerado mais viscoso que a água e hidrocarbonetos de cadeia hidrofóbica de mesmo comprimento que o monômero do anfifílico (Fendler e Fendler, 1975). A viscosidade da região hidrofóbica foi determinada por depolarização de fluorescência (Shimtzky e col., 1971), ESR (Ohnishi, Cyr e Fukushima, 1970), NMR de ^{13}C (Menger e Jerkunica, 1978) e os resultados obtidos indicam que o interior da micela tem uma viscosidade entre 8.3 e 50 cP. Se bem que algumas dessas medidas estão afetadas pela introdução de um marcador na micela (o que pode alterar a viscosidade do interior) e apesar da localização dessas sondas nem sempre ser conhecida, se admite que o interior hidrofóbico da micela é mais viscoso que a água.

Existem evidências experimentais de que a superfície da micela é hidratada e de que a água pode penetrar na micela até os seis primeiros átomos de carbono (Clifford, 1965, Podo, Ray e Némethy, 1973). Dados cinéticos da hidrólise de alquilsulfatos (Kurz, 1962) já indicavam que a atividade de água, até o primeiro carbono ligado ao sulfato do monômero de SDS, e o poder de solvatação do meio são idênticos a da fase aquosa. Albrizzio e Cordes, estudando a hidratação de brometo de 3-formil-N-tetradecilpiridínio em SDS e CTAB chegaram à conclusão de que a atividade da água na superfície da micela, não é menor que 30% de sua atividade "normal". Dados de relaxação obtidos por NMR de ^{13}C de brometo de

trimetil-8-cetohexadecilamônio (8-KHTAB) indicaram que a água penetra até os 7 primeiros carbonos da micela de 8-KHTAB (Menger, Jerkunika e Johnston, 1978). A velocidade da reação de ataque de água a corantes cationicos não é afetada pela fase micelar (Bunton e Huang, 1972). Assim, uma série de dados indicam que a hidratação da micela é bem maior do que se supunha com base no modelo de Hartley. Outras medidas, tais como o valor da constante dielétrica efetiva na fase micelar, são bastante contraditórias. A constante dielétrica, em micelas não iônicas, determinada por indicadores de pH (Fernandez e Fronherg, 1977) é da ordem de 32. Entretanto, Menger, Jerkunika e Johnston (1978) mostraram que a polaridade aparente das micelas de CTAB depende da estrutura da sonda utilizada, podendo variar entre um meio com polaridade similar à de 2-propanol até a de dioxana. Estes autores concluíram que a polaridade observada com uma determinada sonda depende do tempo de residência do marcador em região de polaridades distintas na micela.

A força iônica da camada de Stern foi calculada por Mukerjee (1962) como sendo por volta de 3M. Dificilmente este valor terá significado real se levarmos em conta que a constante dielétrica da região próxima da camada de Stern é diferente da constante dielétrica da água (Menger, 1979).

Como se poderia prever, o aumento do número de informações a respeito da estrutura da micela levou a uma modificação do modelo do agregado.

A visão da micela como um agregado compacto e com pouca água de hidratação não é compatível com os dados que se tem hoje sobre estrutura da micela (esquema 1).

Esquema 1 - Modelos de Micelas

○ Monômero, ○ Contraíon

O modelo de Stigter (1974) (esquema 1,1) para micelas em soluções diluídas é um agregado esférico constituído de três re

giões distintas: uma região hidrofóbica constituída pelas cadeias alifáticas do detergente, uma região determinada pelos grupos polares do detergente, água de hidratação e contraíons (camada de Stern) e uma dupla camada elétrica (a camada de Gouy-Chapman) que contém os íons dissociados da micela ($\alpha\bar{N}$) que neutralizam a sua carga residual.

A região hidrofóbica, neste modelo, tem um raio aproximadamente igual ao comprimento da cadeia alifática do detergente. A camada de Stern tem uma espessura próxima do diâmetro do grupo polar hidratado do detergente e contém $(1-\alpha)\bar{N}$ contraíons. Note-se que neste modelo as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas estão bem delimitadas. Entretanto, este modelo não acomoda os resultados que vem sendo obtidos a respeito da penetração e atividade da água na fase micelar. (Menger, Jerkunika e Johnston, 1978; Albrizzio e Cordes, 1979). Outro dado importante e difícil de acomodar neste modelo é que o sítio de solubilização de compostos aromáticos como benzeno, parece ser uma interface micela/água (Ericksson e Gilberg, 1966). Menger tentou acomodar estes dados a um modelo mais fluído de micelas (esquema 1, (2)). Neste modelo é muito difícil diferenciar, como no modelo de Stigter e Hartley, uma região hidrofóbica e outra hidrofílica. Pode-se delimitar uma região de propriedades semelhantes a um hidrocarbeto líquido que corresponde a apenas 20% do volume total da micela (Menger, 1979). Fora desta região existe uma mistura de cadeias hidrocarbônicas, água e contraíons sendo que a proporção do

último componente aumenta com a proximidade da superfície da micela. Neste modelo a delimitação da camada de Stern não é tão rígida como no anterior e pode-se falar numa "região de Stern" cujas propriedades com relação à constante dielétrica e força iônica não são facilmente previsíveis como no modelo de Stigter. Este modelo mais fluído de micela acomoda melhor os dados de penetração de água na micela (Menger, 1979) e solubilização de aromáticos (Almgren, Grieser e Thomas, 1979) que os modelos propostos anteriormente (Stigter, 1974; Fendler e Fendler, 1975). Este modelo explica, também, porque apesar das micelas acelerarem por ordem de magnitude a velocidade de reações, a diferença entre as constantes de velocidade em fase aquosa e micelar são tão pequenas (Mittal, 1977).

1.1.1 - Efeito de micelas sobre a velocidade de Reações e equilíbrios químicos.

As micelas são capazes de alterar significativamente a velocidade de reações (Fendler e Fendler, 1975; Mittal, 1977 e Chaimovich, 1979). A relação entre a constante de velocidade observada em presença de micelas ($k_{\psi_{m\acute{a}x}}$) e a constante de velocidade para a mesma reação em água pode variar entre zero e 10^5 . Alguns exemplos podem ser citados onde fatores de aceleração extremamente altos foram obtidos. A reação de benzimidazol e heptanoato de p-nitrofenila (NPH), por exemplo, é acelerada por um fator de $8 \cdot 10^4$ em CTAB (Martinek e col., 1975). A reação de p-nitrofenilhexanoato e N^α-Myristoyl-L-histidina tem sua velocidade aumenta

da por um fator de 3.10^3 (Gitler e Ochoa-Solano, 1968). Detergentes funcionais como o brometo de octadecildietilhidroxietilamônio (BOE) podem reagir com NPH com uma velocidade cerca de 10^5 vezes maior que a velocidade de reação do homólogo de cadeia menor do detergente com o mesmo substrato (Martinek, Levashov e Berezin, 1975). As reações em fase micelar podem ser afetadas também quanto à natureza dos produtos formados. A hidrólise alcalina de cianopiridínicos em CTAB tem sua relação de produtos alterada na fase micelar (Politi e col., 1978). O mesmo fenômeno é observado na hidrólise alcalina de 1-bromo-2-fenil-propano onde, em presença de CTAB, obtém-se 95% do produto que, em fase aquosa, corresponde a apenas 55% do total (Lapinti e Viout, 1973). A estereoespecificidade, embora pouco frequente, já foi encontrada em algumas reações em fase micelar. As reações de deaminação de 2-amino octano (Suknik e col., 1975) e, mais recentemente, a reação de tiólise do cloreto de hexadeciltiocolina e o éster de p-nitrofenila da N-carbobenziloxialanilprolina (Moss, Lee e Lucas, 1979), são alteradas estereoespecificamente em fase micelar.

O efeito de micelas sobre o pK de indicadores é conhecido há bastante tempo e o trabalho de Hartley (1936) foi uma das primeiras tentativas de se prever o efeito de detergentes de cargas diferentes no equilíbrio ácido-base de corantes.

O efeito de detergentes sobre o pK_a de corantes depende da carga do anfifílico e das formas em equilíbrio. Detergentes neutros aumentam o pK_a de ácidos fracos como fenóis, -

naftóis (Tong e Glessman, 1957) e derivados alquilados da 7-hidroxycumarina (Fernandez e Fromherz, 1977). Entretanto, estes anfifílicos diminuem o pK_a de bases fracas com o derivado de 7 aminocumarinas (Fernandes e Fromherz, 1977). Estes efeitos foram atribuídos a uma solubilidade maior das formas neutras na fase micelar devido à menor constante dielétrica deste ambiente (Fendler e Fendler, 1975). Tong e Glessman (1957) mostraram que a constante de distribuição (K_s) da forma protonada de fenóis e naftóis é muito semelhante à constante de distribuição da mesma espécie em octanol/água, enquanto que para a forma aniônica, obtiveram uma constante de distribuição menor que K_s. Detergentes catiônicos, em geral diminuem o pK_a de compostos nos quais uma das formas do equilíbrio é positiva e a outra é neutra. Este efeito foi observado medindo-se funções de H₀ de p-nitroanilina e 1-amino-4-nitronaftaleno em CTAB (Bunton e Robinson, 1969), derivados de 7-aminocumarina (Fernandez e Fromherz), entre outros. Para compostos onde uma das formas é negativa, como fenóis e naftóis (Tong e Glessman, 1957), tiofenóis (Cuccovia e col, 1977) azul de bromofenol (Mukerji e Banerjee, 1962) o pK_a diminui.

Os detergentes negativos, como se poderia prever, promovem o aumento no pK_a de aminas (Fernandez e Fromherz, 1977), e aumentam o pK_a de ácidos fracos (Montal e Gitler, 1973).

Com o aumento de informações sobre o pK_a de compostos em fase micelar e efeito de detergente sobre velocidade de reações tem-se tentado identificar e separar os fatores responsáveis por es

ses fenômenos.

Alguns fatores responsáveis pelos efeitos de micelas sobre reações e equilíbrios químicos foram identificados com o estudo de reações monomoleculares. Bunton e Minch estudaram a reação de descarboxilação de 4-nitro-6 carboxibenzisoxazol em presença de detergentes. Esta reação é acelerada em meio de baixa constante dielétrica. Em presença de detergentes positivos e neutros observou-se uma aceleração de reação enquanto que em presença de detergentes negativos a reação foi inibida. Uma análise posterior feita por Berezin, Martinek e Yatsiminski (1973), mostrou que a constante de primeira ordem na fase micelar (k_m), em CTAB e Igepal, são idênticas, apesar da diferença da carga superficial. O efeito do meio micelar, neste caso, é simplesmente fornecer um ambiente de menor constante dielétrica que favorece a decomposição do substrato. O mesmo efeito pode ser invocado na catálise por CTAB de reação de decomposição do diânion de 2,6-dinitrofenilfosfato (Bunton e col., 1968).

Uma restrição anisotrópica do movimento da molécula de um substrato na fase micelar também pode afetar a velocidade de reação como se observa na reação de aminólise intramolecular da S-octanoil- β mercaptoetilamina (Cuccovia e col, 1977).

Outro fator, talvez o mais importante, é a concentração de reagentes na fase micelar para reações bimoleculares. Em uma série de reações tem-se demonstrado que a concen -

tração de reagentes na fase micelar e desvios de pK_a , em reações bimoleculares, são os fatores responsáveis por quase todo o efeito de aceleração ou inibição promovido por micelas (Berezin, Martinek e Yatsiminski, 1973; Cuccovia e col., 1978). A análise deste efeito, entretanto, exige um tratamento matemático dos dados experimentais, que permita a identificação dos efeitos do meio micelar sobre k_m , pK_a e concentração de reagentes. Assim, mostraremos os tratamentos matemáticos mais utilizados na análise de dados sobre reações em fase micelar.

1.1.2 - Tratamentos matemáticos de efeito de detergentes sobre velocidade de reações.

Limitaremos nossa análise aos modelos que descrevem a maior parte dos resultados já publicados no campo de efeito de detergentes em reações e equilíbrios químicos no estado fundamental. Vamos nos ater a dois modelos principais: o modelo de pseudo-fase (Berezin, Martinek e Yatsiminski, 1973) e o modelo de Troca-Iônica (Quina e Chaimovich, 1979). Uma análise ampla dos diversos modelos cinéticos existentes pode ser encontrada nas seguintes revisões: Berezin, Martinek e Yatsiminski, 1973; Romsted, 1975; Fendler e Fendler, 1975 e Chaimovich, 1979.

1.1.2.1 - Modelo de pseudo-fase.

Este modelo foi desenvolvido por Berezin, Martinek e Yatsiminski (1973) e considera a micela como uma fase se

parada da solução. O modelo de análise de uma reação em fase micelar faz uso dos seguintes postulados:

- 1) Um substrato A se distribui entre as fases micelar e aquosa segundo uma lei de distribuição:

$$A_M/A_w = P_A$$

onde M e w se referem à fase micelar e aquosa

- 2) A concentração total do substrato A é dada por:

$$A_t = A_M C_D + A_w (1 - C_D)$$

onde $\bar{V}$ é o volume molar do detergente e C_D é a concentração de detergente micelizado. Se a condição 1 é satisfeita, a solubilidade de A em água (S_w) e na presença de detergente $S_{M'w}$ apresenta a seguinte relação:

$$\frac{S_{M'w}}{S_w} = 1 + K_A C_D$$

onde K_A é dada por

$$K_A = (P_A - 1) \bar{V}$$

Para reações unimoleculares o tratamento proposto por Berezin, Martinek e Yatsiminski (1973) conduz a uma equação idêntica à proposta anteriormente por Menger e Portnoy (1967) (eq.3)

$$k_\psi = \frac{k_o + k_m \cdot K_S C_D}{(1 + K_S C_D)} \quad (3)$$

onde k_{ψ} = constante de velocidade observada na presença de micelas

k_o = constante de velocidade de 1ª ordem na fase aquosa

k_m = constante de velocidade de 1ª ordem na fase micelar

K_s = constante de associação do substrato

C_D = concentração de detergente total (C) menos a CMC

A equação 3 prevê que se $k_m < k_o$ a constante de velocidade observada (k_{ψ}) deverá diminuir com o aumento da concentração de detergente até alcançar um valor mínimo e constante. Quando $k_m > k_o$, o valor de k_{ψ} aumenta em função de C_D até alcançar um patamar. Esta equação foi utilizada em uma série de reações unimoleculares obtendo-se um bom ajuste aos dados experimentais (Berezin, Martinek e Yatsimirski, 1973).

Para reações bimoleculares onde os dois substratos se ligam fortemente à micela, e portanto, P_A e $P_B \gg 1$, a constante de pseudo-primeira ordem observada (k_{ψ}) é dada por:

$$k_{\psi} = k_o \cdot \frac{A_w}{A_T} \cdot B_w + k_m \cdot \frac{A_m}{A_T} \cdot \overline{B_m} \quad (5)$$

onde A_w = concentração do substrato A na fase aquosa

A_T = concentração analítica total de A ($A_T \gg B_T$)

A_m = concentração analítica de A na fase micelar

B_w = concentração analítica de B na fase aquosa

B_m = concentração analítica de B na fase micelar

$$e \quad \overline{B_m} = \frac{B_m}{C_D \bar{V}}$$

Utilizando-se as equações 6 e 7, que define K_A e K_B onde

$$K_A = \frac{A_m}{A_\omega \cdot C_D} \quad (6)$$

$$e \quad K_B = \frac{\overline{B_m}}{B_\omega, C_D} \quad (7)$$

pode-se demonstrar que

$$k_{2m} = \frac{k_m / \bar{V} \cdot K_A \cdot K_B \cdot C_D + k_o}{(1 + K_A C_D)(1 + K_B C_D)} \quad (8)$$

$$\text{onde } k_{2m} = k_\psi / A_T = \text{constante de segunda ordem aparente} \quad (9)$$

A equação 8 prevê um máximo na curva de k_{2m} vs C_D se K_A e K_B forem da mesma ordem de grandeza. Se uma das constantes for muito pequena com relação à outra e $k_o \gg k_m$, a curva de k_{2m} vs C_D apresentará um patamar.

Esta equação foi utilizada por Martinek e col (1973) para análise da reação de formação da benzilideneanili - na em SDS. O ajuste da curva teórica aos dados experimentais - foi obtido utilizando-se uma relação k_m/k_o de 0,33.

O tratamento matemático se torna mais complexo quando se analisa uma reação em que um dos substratos sofre dissociação e apenas uma das formas é reativa. Neste caso, a eq.

de velocidade é dada por:

$$v = k_{ap} \cdot (A)_t \cdot (B)_t \quad (10)$$

$$v = k_m \cdot C_D \cdot \bar{V} \cdot (A)_m \cdot (B)_m + k_o (1 - C_D \cdot \bar{V}) (A)_w \cdot (B)_w \quad (11)$$

onde $(A)_w$ é a conc. da forma dissociada (reativa) nas fases aquosa e micelar

A concentração da forma dissociada, em presença de detergente, é dada pela equação 12, que relaciona K_{ap} e concentração de detergente micelizado.

$$K_{ap} = K_a \frac{1 + K_A^- \cdot C_D}{1 + K_{AH} \cdot C_D} \quad (12)$$

onde K_A^- é a constante de associação à micela da forma dissociada, K_{AH} a constante de associação da forma protonada, K_a é a constante de dissociação do substrato na fase aquosa e K_{ap} a constante de dissociação aparente do ácido fraco HA na presença de detergente.

Utilizando-se as eq. 10, 11 e 12 pode-se deduzir a eq. 13.

$$k_{2m} = \frac{k_m / \bar{V} \cdot K_A^- \cdot K_B \cdot C_D + k_o}{(1 + K_A^- \cdot C_D) (1 + K_B \cdot C_D) (1 + H_f^+ / K_{ap})} \quad (13)$$

onde H_f^+ é a concentração de H^+ na fase aquosa e k_{2m} é k_{ψ} / A_t . - Esta equação foi utilizada por Yatsiminski, Martinek e Berezin - (1971) para a reação de ariloxima e ésteres de p-nitrofenila na

presença de CTAB.

Neste sistema os autores observaram que a constante de associação da forma neutra da oxima não era afetada por força iônica (K_{AH}) enquanto que a constante de associação da forma negativa (K_A^-) diminuía com o aumento da concentração de detergente e sal. No tratamento matemático a ser exposto em seguida fica clara a razão desse fenômeno. Assim, embora esse tratamento tenha sido desenvolvido originalmente para um sistema errado, ele fornece uma análise correta quando a reação é estudada em detergente não iônico e, dentro de limites que ficarão claros em resultados, quando o substrato reativo tem carga similar à da micela.

1.1.2.2 - Modelo de Troca-Iônica

O tratamento matemático proposto por Berezin Martinek e Yatsimirski (1973) para reações em fase micelar explica satisfatoriamente apenas os resultados obtidos para reações unimoleculares e bimoleculares entre substratos neutros. Em 1975, Romsted, após exaustiva revisão de dados existentes na literatura a respeito de ionização de micelas, chegou à conclusão de que o número de contra íons ligados à micela ($1-\alpha$) é constante em função da concentração de detergente e força iônica. Utilizando este dado e o modelo de micelas proposto por Stigter (1974) que pressupõe α constante, Romsted propôs que os íons da fase aquosa podem trocar com os da fase micelar de acordo com o seguinte -

equilíbrio:

onde $K_{x/y} = \frac{X_b \cdot Y_f}{X_f \cdot Y_b}$

e X_f = concentração do íon na fase aquosa

X_b = concentração do íon na fase micelar

Y_t = concentração do contraíon na fase aquosa

Y_b = concentração do contraíon na fase micelar

$K_{x/y}$ = constante de seletividade

Este autor supõe ainda que

$$Y_m + X_m = \beta \cdot S = \text{constante}$$

onde $\beta = (1 - \alpha)$ e S é a densidade molar do detergente.

A última equação está baseada na suposição de que β independe da natureza dos íons em solução. Sabe-se, entre - tanto, que esta suposição não é totalmente correta. Entretanto, a variação de β é muito pequena quando se considera os demais ter mos da equação que descreve o comportamento cinético de uma rea ção em fase micelar (ver adiante). Assim, esta suposição (β = cons tante) embora pouco realista, é perfeitamente aceitável para o - tratamento dos sistemas de reações em micelas.

A análise matemática feita por Romsted para

reações bimoleculares onde um dos reagentes é um ion hidrofílico levou à equação 14

$$k_{2m} = \frac{k_m K_s \beta S C_D}{(K_s C_D + 1) (I_t + X_t K)} + \frac{k_o}{(K_s C_D + 1)} \quad (14)$$

onde $I_t = I_b CV + I_f (1-CV)$

$X_t = X_b CV + X_f (1-CV)$

que, após modificações, foi utilizada por Bunton, Romsted e Smith (1978) para a análise de reações catalizada por H^+ obtendo-se um bom ajuste entre a curva teórica e os dados experimentais.

A desvantagem deste e dos demais tratamentos é que não são aplicáveis a reações em presença de tampão. Além disso, a equação 14 só prediz a ligação de um ion pequeno à superfície da micela e o tratamento deveria ser aplicável a qualquer substrato carregado e de carga oposta à micela. Isto se estende à dissociação de ácidos e bases fracas onde uma das formas tem carga oposta à da micela (note-se que o tratamento de Berезин falhava justamente neste ponto).

O sistema de reações em fase micelar, na presença e ausência de tampão, para substratos de carga oposta à micela foi analisado de forma adequada por Quina e Chaimovich (1979) através do modelo de Troca Iônica para micelas.

As suposições básicas para o desenvolvimento deste modelo (Quina e Chaimovich, 1979) são:

1 - As interações íon-íon e íon-"cabeça polar" na superfície da micela não são cooperativas. Esta suposição leva ao tratamento do sistema micelar através de um equilíbrio de troca entre os íons da superfície da micela e os íons da fase aquosa que depende apenas do número de íons no agregado e na fase aquosa.

2 - As velocidades de troca entre os íons são rápidas quando comparadas com as escalas de tempo em que se processa a reação (Grunhagen, 1975).

3 - O grau de ionização α de um agregado micelar é constante e está relacionado com m (número de contra-íons ligados à micela) através da expressão $m = \bar{N} (1-\alpha)$ onde $\bar{N}$ é o número de agregação da micela.

4 - As atividades das várias espécies iônicas presentes em solução são tratadas em termos de suas concentrações analíticas. O valor da constante de troca ($K_{x/y}$) para o equilíbrio abaixo, é dado por:

$$X_f + Y_b \xrightleftharpoons{K_{x/y}} X_b + Y_f$$

$$K_{x/y} = \frac{X_b \cdot Y_f}{X_f \cdot Y_b}$$

onde Y é o contraion da micela, X é o íon adicionado ao sistema e b e f se referem aos íons ligados e livres respectivamente.

O valor de $K_{x/y}$ pode não ser constante e pode depender da concentração relativa dos íons trocáveis, da na-

tureza dos ions e concentração de detergente (Quina e Chaimovich 1979). Ainda não existem dados suficientes sobre constantes de troca em micelas para se conhecer o seu comportamento frente a variação de condições experimentais.

5 - Na presença de tampão, a concentração de hidróxido na fase aquosa é constante (Quina e col., 1980).

6 - Tanto o hidróxido como as formas aniônicas do tampão e do nucleófilo trocam com o contraion de uma micela positiva.

7 - A ligação de um substrato neutro à micela pode ser caracterizada através de uma constante de distribuição (Berezin, Martinek e Yastimirski).

Através das suposições da teoria de troca - Iônica (Quina e Chaimovich, 1979) e do modelo de pseudo-fase (Berezin, Martinek e Yatsimirski, 1979), pode-se chegar à dedução de equações que descrevem o comportamento de reações unimoleculares e bimoleculares (com substratos carregados) em fase micelar na presença e ausência de tampão. A dedução das equações e suas implicações no que diz respeito à concentração de ions em fase micelar pode ser encontrada com detalhe nos seguintes trabalhos: Chaimovich, 1979; Quina e Chaimovich, 1979; Politi e col., 1979; Quina e col., 1980).

Assim, nos limitaremos a analisar os tratamentos matemáticos da teoria de Troca-Iônica para sistemas que tem relação mais direta com a análise de nossos resultados.

1 - Reação Unimolecular de um substrato iônico univalente ($S^{\pm}$) de carga oposta à micela (D^+Y^-)

A equação que descreve este sistema (eq.15), prediz que k_{ψ} atinge um patamar quando C_D aumenta (do mesmo modo que as equações deduzidas por Berezin e Romsted

$$k_{\psi} = \frac{k_m K_{s/y} (Y_b/Y_f) + k_o}{1 + K_{s/y} (Y_b/Y_f)} \quad (15)$$

$$\text{onde } K_{s/y} = \frac{S_b \cdot Y_f}{S_f \cdot Y_b}$$

e S_b e S_f são as concentrações analíticas do substrato nas fases aquosa e micelar e $K_{s/y}$ é a constante de seletividade entre o substrato carregado e o contraion da micela.

A equação 15 prevê que, para $k_m = k_o$ a reação não é afetada por detergente. Se $k_m > k_o$ haverá um aumento de k_{ψ} em função de C_D e, para $k_m < k_o$, ocorrerá uma inibição da reação.

Para concentrações altas de detergente, $C_T \rightarrow \infty$, temos que:

$$\lim_{C_T \rightarrow \infty} K_{s/y} \frac{Y_b}{Y_f} = K_{s/y} \frac{(1-\alpha)}{\alpha}$$

Isto implica que, independente da relação k_m/k_o , o valor de k_{ψ} chega a um patamar a altas concentrações de detergente. É importante salientar que este tratamento descreve

ve, também, o efeito de sais em reações unimoleculares o que não ocorre com os tratamentos anteriores (Note-se que k_ψ na equação 15 está relacionado com Y_b/Y_f e não com C_D).

2 - Reação bimolecular entre um substrato neutro e um íon univalente cuja carga é oposta ao detergente.

Em condições de pseudo-primeira ordem pode-se escrever que:

$$k_{\psi m} = k_2^o x_f \left(\frac{S_f}{S_T} \right) + k_2^m \bar{x}_b \left(\frac{S_b}{S_T} \right) \quad (16)$$

onde $S_T = S_f + S_b$

Na ausência de tampão a concentração total de íon relativo (x_T) é constante. Assim, a equação que descreve o sistema é a equação 17

$$k_{\psi m} = \frac{x_T ((k_2^m / \bar{V}) (K_s K_{x/y}) (Y_b/Y_f) + k_2^o)}{(1 + K_s C_D) (1 + K_{x/y} (Y_b/Y_f))} \quad (17)$$

e na presença de tampão (onde x_f é constante) a eq.17 se reduz a

$$k_{\psi m} = \frac{x_f ((k_2^m / \bar{V}) (K_s K_{x/y}) (Y_b/Y_f) + k_2^o)}{(1 + K_s C_D)} \quad (18)$$

3 - Reação bimolecular entre um substrato neutro S e um nucleófilo A derivado de um ácido fraco HA em presença de um detergente D^+Y^- .

Para o tratamento deste sistema há necessida

de se estudar o efeito de detergente sobre o pK_a de um ácido fraco.

Partindo-se dos seguintes equilíbrios:

e definindo-se pK na presença de detergente como o pH intermédio - lar onde a igualdade da eq. 19 é satisfeita

$$\text{A}_f + \text{A}_b = \text{HA}_f + \text{HA}_b \quad (19)$$

pode-se deduzir a equação 20

$$K_{ap} = K_a \frac{1 + K_{A/Y} (\text{Y}_b/\text{Y}_f)}{1 + K_{HA} C_D} \quad (20)$$

que, da mesma forma que as equações anteriores, prediz o efeito - de sal sobre a curva de pK_a e C_D

Partindo-se das equações 20 e 21

$$k_{\psi m} = k_2^O (\text{A}_f) (\text{S}_f/\text{S}_T) + k_{2m} \overline{\text{A}_b} (\text{S}_b/\text{S}_T) \quad (21)$$

pode-se deduzir a eq. 22

$$k_{\psi m} = HA_T K_a \frac{(k_2^m / \bar{V}) (K_s K_{A/Y}) (Y_b / Y_t) + k_2^o}{(1 + K_{HA} C_D)((H_f^+) + K_{app})(1 + K_s C_D)} \quad (22)$$

A equação 20 ao contrário da equação 12, proposta por Berezin através do modelo de pseudo-fase, permite o cálculo de K_{ap} em função de C_D utilizando-se apenas uma constante de troca. Além disso, a eq. 20 prevê que pequenas concentrações de detergente conduzem a um aumento em K_{ap} enquanto que a altas concentrações de C_D (ou de sal), K_{ap} fica maior que K_a . Isto significa que a curva de K_{ap} vs C_D pode passar por um mínimo. Um exemplo claro deste efeito será apresentado em resultados.

A equação 22 prevê que o valor de k_{ψ} vs C_D deve alcançar um máximo e, em seguida, diminuir com o aumento da concentração de detergente.

1.2 - Lipossomos

Lipossomos são estruturas esféricas ou tubulares formadas por anfifílicos dispersos em meio aquoso (Hargreaves e Deamer, 1978). Estas estruturas são formadas por bicamadas de anfifílicos que englobam um compartimento aquoso interno. O termo lipossomo é utilizado quando a estrutura apresenta mais de uma bicamada reservando-se a denominação de vesícula para agregados contendo apenas uma bicamada (Bangham e Horne, 1964; Huang, 1969).

Os lipossomos são obtidos por dispersão de substâncias anfifílicas em água e, irradiando-se estas suspensões com ultrassom, obtem-se partículas de tamanho cada vez menores. Sonicação prolongada dessas estruturas produz esferas fechadas, constituídas por uma única bicamada (Huang, 1969). Estas vesículas, também podem ser obtidas por injeção de uma solução etanólica do anfifílico em água (Batzri e Korn, 1973), através de um capilar.

Uma variedade muito grande de compostos anfifílicos são capazes de formar lipossomos. De modo geral, estes compostos são constituídos por duas cadeias hidrocarbônicas longas ligadas a um grupo hidrofílico. Existem, entretanto, algumas exceções, tais como a formação de vesículas com anfifílicos com apenas 1 cadeia hidrocarbônica. Gebicke e Hicks (1973,1976) descreveram a formação de vesículas de ácido oleico em dispersões aquosas diluídas. Mais recentemente, Hargreaves e Deamer (1978) demonstraram a formação de vesículas de SDS em água em presença de grandes porcentagens de dodecanol. Aparentemente, a adição de um composto hidrofóbico em grande proporção a soluções de micelas iônicas diminui a repulsão eletrostática na camada de Stern e favorece a formação de vesículas estáveis (Hargreaves e Deamer,1978).

A formação de lipossomos a partir de anfifílicos sintéticos com duas cadeias hidrofóbicas tem sido descrita para uma grande variedade de compostos. Sais de dimetildialquilamônio (Kunitake e col., 1977; Deguchi e Mino, 1978; Cuccovia e col) dialquilsulfatos (Mortara, Quina e Chaimovich, 1978), dialquilsul

fonatos e carboxilatos (Kunitake e Okahata, 1977) assim como anfifílicos zwitteriônicos (Kunitake e Okahata, 1977) são capazes de formar lipossomos por sonicação e injeção.

As características físicas e propriedades dos lipossomos e vesículas sintéticas ainda não estão bem estabelecidas já que os estudos com estes compostos foram iniciados há pouco tempo (Hermann e Fendler, 1979) enquanto que os lipossomos de lecitina estão melhor caracterizados (Huang, 1969). Faremos, portanto, separadamente, um resumo de algumas características e propriedades de lipossomos derivados de fosfolipídeos e de anfifílicos sintéticos.

1.2.1 - Características físicas e propriedades de vesículas formadas por fosfolipídeos.

A sonicação prolongada de uma dispersão aquosa de fosfatidilcolina produz vesículas que são esferas fechadas de aproximadamente 250 Å de diâmetro (Huang, 1969). Estas vesículas são compostas por uma bicamada de fosfolipídeo que envolve um compartimento aquoso interno. O volume aquoso interno de vesícula de fosfatidilcolina pode ser calculado medindo-se, por exemplo, a concentração de $K_3Fe(CN)_6$ incorporada pela vesícula (Huang e Masons, 1978) e aplicando-se a eq. 23

$$W_t = (TV_{exp}) \rho_{H_2O} / M_{lipideo} \quad (23)$$

Onde ρ_{H_2O} é a densidade de água, W_t é grama de água incorporada/grama de lipídeo anidro e TV_{exp} é volume incorporado/lipídeo que

é da ordem de 0,154 litros/mol (Newman e Huang, 1975).

O peso molecular médio de vesículas de lecitina foi calculado através de medidas de ultracentrifugação obtendo-se valores da ordem de $1.88.10^6$ g/mol e um número de agregação de 2335 (Newman e Huang, 1975). Resultados obtidos por NMR de ^1H , ^{13}C , e ^{31}P e a utilização de íons paramagnéticos indicaram que a relação entre o nº de lipídeos da camada externa e interna é - aproximadamente 2 (Huang e col, 1974; Yeagle e col, 1976; Hutton, - Yeagle e Martin, 1977).

A análise dos dados hidrodinâmicos e de ressonância Magnética Nuclear permitiram o cálculo dos parâmetros que caracterizam o empacotamento de lipídeos e assimetria de vesículas de fosfatidilcolina de ovo (P.C.).

Assim, os parâmetros radiais das vesículas de P.C. foram calculados a partir do P.M. da vesícula, nº de agregação, volume parcial específico ($\bar{V}=0.9814\text{ml/g}$) e da relação de lipídeos entre as duas monocamadas da vesícula ($X=2.1$). Os parâmetros calculados (Esquema 2) foram: $R_A=62 \text{ \AA}$; $R_B=78 \text{ \AA}$ e $R_C=55 \text{ \AA}$. A espessura da monocamada externa é $21 \text{ \AA}$, a da camada interna é $16 \text{ \AA}$ e o volume por moléculas de lipídeo é $1223 \text{ \AA}^3$. A área por grupo polar do lipídeo na monocamada externa é $72 \text{ \AA}^2$, na camada interna é $60 \text{ \AA}^2$ e a espessura da bicamada é $37 \text{ \AA}$. Estes parâmetros podem ser melhor visualizados no esquema 2 (Mason e Huang, 1978).

O estado físico dos fosfolipídeos é extremamente dependente de temperatura. O aquecimento destes compostos

Esquema (2) Modelo de Vesícula de Fosfolipídeo

Monômero

leva a uma transição endotérmica nítida numa temperatura bastante definida e característica de cada fosfolipídeo. Nesta temperatura (abaixo de seu ponto de fusão) o fosfolipídeo passa a um estado cristalino (gel) para um estado líquido cristal (Lee, 1975). A temperatura de transição (T_C) aumenta com o aumento da cadeia do ácido graxo e diminui com o aumento de insaturação da cadeia. A T_C depende também da natureza da cabeça polar do lipídeo (Ladbrooke e Chapman, 1969; Hinz e Sturtevant, 1972). A mudança de fase na temperatura de transição é um fenômeno cooperativo e a largura de faixa de temperatura onde ocorre a transição depende do nº de moléculas que cooperam na transição. Este nº de moléculas que cooperam na transição é chamado unidade cooperativa de transição. A temperatura de transição pode ser medida através de dependência de coeficiente de partição de marcadores de Spin e temperatura (Hubbel e McConnell, 1971; Shimshick e McConnell, 1973) absorção de Azul de Bromotimol, calorimetria diferencial de varredura (Papahadjopoulos e col, 1976; van Dijck e col., 1978), espectroscopia Raman (Vervegaert e col., 1973), diminuição de índice de refração (Block e col, 1976), etc.

Abaixo da temperatura de transição, na fase gel, os fosfolipídeos adotam uma estrutura onde as cadeias dos ácidos graxos estão bastante ordenadas e a mobilidade das cadeias de ácidos graxos é altamente anisotrópica e restrita (Salsbury e Chapman, 1968). Na fase liq. cristalina (Lee, 1975) as cadeias de ácido graxo estão mais desordenadas do que na fase gel e come

ça-se a detectar conformações *Gauche* entre as ligações C-C que praticamente não existem na fase gel onde as conformações são *Trans* (Lee, 1975; Lippert e Peticola, 1971, 1972).

A bicamada de fosfolípidos permite a passagem de pequenos íons e água entre o compartimento interno e externo (Lee, 1975).

A permeabilidade de lipossomos a íons depende da temperatura sendo que o estado gel é menos permeável que o estado líquido cristal (Lee, 1975; Schreier-Muccillo; Marsh e Smith, 1976). Para lipossomos de dipalmitoilecitina, por exemplo a permeabilidade a Na^+ é máxima na temperatura onde ocorre a metade da transição de fase. Isto é explicado por Papahadjopoulos (1973) que sugere um aumento de permeabilidade através de regiões de desordem na fronteira entre regiões discretas de fase sólida e líquida coexistindo no plano da membrana.

A permeabilidade de vesículas depende também da carga da mesma. Dados de Bangham, Standish e Watkins (1965) mostram que lipossomos carregados positivamente são impermeáveis a cátions. O aumento de carga negativa nos lipossomos leva a um aumento de permeabilidade a cátions. Por outro lado, a permeabilidade a ânions é semelhante tanto para vesículas neutras (lecitina pura) como positivas com stearylamina) e negativas (com dicetilfosfato) (Bangham, Standish e Watkins, 1965).

1,2,2 - Características física e propriedades de vesículas formadas por anfifílicos sintéticos

Anfifílicos sintéticos capazes de formar lipossomos tem a vantagem de serem mais homogêneos e estáveis - quanto à sua estrutura química que os fosfolipídeos naturais.

Os estudos com estes anfifílicos foram - iniciados por Kunitake e col. (1977) que sintetizaram uma série - de sais de amônio quaternário contendo duas cadeias hidrocarbônicas longas. Os estudos de preparações sonicadas e coradas com ácido fosfotúngstico (PTA) ou acetato de uranila (AcU) indicaram a presença de vesículas uni e multilamelares (Kunitake e col., - 1977; Deguchi e Mino, 1978). Estes estudos, entretanto, devem - ser tomados como uma indicação apenas já que hoje sabemos que estas estruturas são extremamente sensíveis a força iônica. Portanto, quando se adiciona PTA a uma amostra de dioctadecildimetilamônio (DODAC) certamente a estrutura do agregado é alterada e se formam precipitados de PTA e DODAC. Outros dados sugerem a existência de vesículas, tais como a existência de uma temperatura - de transição do composto sonificado (Deguchi e Mino, 1977; Kano e col., 1979). Apesar de existirem dados contraditórios obtidos por vários métodos, sabe-se que a temperatura de transição de DODAC, por exemplo, está em torno de 40°C (Deguchi e Mino, 1977; Kano e col., 1979).

Outros compostos com estruturas variáveis na

região polar e duas cadeias alquílicas longas também formam estruturas vesiculares. Entre estes estão sais de tetralquilamônio onde dois substituintes no nitrogênio são cadeias alifáticas longas e os dois substituintes podem ser grupos carboxílicos, açúcares, amido, etc. (Kunitake e Okahata, 1977) e brometo de dialquilmetil sulfônio (Kunitake e Okahata, 1977).

A formação de lipossomos negativos com dicetilfosfato também foi descrita (Mortara, Quina e Chaimovich, 1978) e, dados de microscopia eletrônica de vesículas coradas com PTA, incorporação de substratos hidrossolúveis e presença de temperatura de transição mostram que estes compostos podem formar estruturas vesiculares uni e multilamelares. Outros compostos contendo grupos polares aniônicos (carboxilato e sulfonato) e duas cadeias longas também formam vesículas após sonicação prolongada (Kunitake e Okahata, 1978).

1.2.2.1 - Características Físicas

As características físicas dos lipossomos dependem do método de preparação. Embora estas vesículas possam ser preparadas por injeção (Cuccovia e col., 1979) o método mais utilizado é o de sonicação.

Vários autores encontraram que algumas propriedades tais como viscosidade e condutividade específica dependem do tempo de sonicação da amostra. Essas propriedades físicas chegam a um valor constante após um determinado tempo de sonica

ção que depende do detergente utilizado e da potencia do sonificador (Deguchi e Mino, 1978; Kano e col, 1979). O trabalho de Hermann e Fendler (1979) mostra que o raio hidrodinâmico e o peso molecular das vesículas e o P.M. diminui com o tempo de sonicação chegando-se a um valor constante.

As vesículas melhor caracterizadas são as preparadas com DODAC e DCP. Assim mesmo existem sérias discrepâncias entre as características físicas destes agregados.

O peso molecular médio de vesículas de DODAC foi determinado por dispersão de luz de pequeno ângulo (Hermann e Fendler, 1979) e obteve-se um valor de $12.6 \cdot 10^6$ daltons enquanto que para o DCP obteve-se um peso molecular de $97 \cdot 10^6$ daltons. Esses mesmos autores calcularam um raio hidrodinâmico de 396 Å p/ DODAC e 525 Å para DCP. Os cálculos feitos mostraram que a forma das vesículas de DODAC e DCP se desvia de estruturas esféricas e o cálculo do valor dos semi-eixos indica que a forma mais compatível com os resultados é a de um prolato.

A microviscosidade no interior da bicamada de DODAC foi estudada através de polarização de fluorescência utilizando-se 2 metilantraceno (Tran e col, 1978). Os resultados indicaram uma microviscosidade de 144 cP.

Por outro lado, diferentes marcadores mostram polaridades também diferentes em DODAC. Por exemplo, utilizando-se Dansil-N-octilamina os valores de DODAC mostram um ambiente um pouco mais polar que benzeno. Com 2 amino-piridina que

deve se localizar no interior aquoso de DODAC o ambiente é um pouco mais polar do que etanol e menos polar do que água (Tran e col., 1978).

1.2.2.2 - Efeito de Lipossomos sobre a velocidade de reações

Existem poucos estudos sobre efeito de vesículas sobre a velocidade de reações já que este campo é recente.

Os estudos sobre o efeito de lipossomos sintéticos sobre a velocidade de reações começam com Kunitake e Sakamoto (1978) que estudaram a hidrólise de NPA e palmitato de p-nitrofenila em vesículas de cloreto didodecildimetilamônio - (CDD). A hidrólise destes substratos é catalizada por um éster derivado de colesterol e ácido iminocarboxílico (IMC). A reação intravesicular (onde o éster e o IMC estão na mesma vesícula) é acelerada por um fator 200 vezes maior do que a reação intervesicular (onde os substratos estão localizados em diferentes vesículas).

A reação de uma sonda de Spin (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi-3 carboxilato de sódio, TPC) e ascorbato de sódio foi estudada em vesículas de DODAC e os resultados foram analisados com base no modelo de pseudo-fase utilizado em micelas (Berezin, Martinek e Yatsimirski, 1973). Foram feitas correções para a concentração de TPC nas faces interna e externa da vesícula.

Dados obtidos por Fendler (comunicação pessoal) sobre hidrólise de DTNB e DODAC mostraram que estas vesículas são capazes de acelerar cerca de 500 vezes a reação.

1.3 - Reações de Grupos R-SH

As reações de tiólise de ésteres derivados de p-nitrofenol tem sido estudadas utilizando-se nucleófilos de estrutura e reatividade bastante diferentes (Fencks e Caminolo, 1960; Whitaker, 1962; Ogilvie e Tildon e Strauch, 1964; Hupe e Fenckes, 1977). Estas reações se processam através do ataque da forma negativa da mercaptana à carbonila do éster (Hupe e Fencks, 1977) (esquema 3).

(Esquema 3)

Não existe nenhuma indicação de que a reação ocorra através do ataque da forma R-SH à carbonila e não se demonstrou a existência de catálise básica geral (pelo menos para a reação de βmercaptoetanol e NPA) (Hupe e Fencks, 1977). O passo limitante da reação de tiólise de NPA depende, basicamente, do pK do nucleófilo e, ao contrário do que ocorre em reações de ésteres

com oxianions, não existe correlação entre a estrutura da mercaptana e passo limitante da reação (Hupe e Jencks, 1977). A dependência entre o $\log k_2$ e pK do tiol pode ser expressa graficamente por duas retas com inclinações diferentes que se interceptam próximo do pK do p-nitrofenol. O passo limitante da reação de NPA com mercaptanas de pK menor que 7.8 é a decomposição do intermediário tetrahédrico. A inclinação da reta de $\log k_2$ vs pK para tióis de estrutura variada é da ordem de 0.84. O passo limitante na reação de NPA e tióis de pK maior que 7.8 é o ataque do ânion à carbonila. A reação, para estes nucleófilos, é menos sensível à reatividade da mercaptana e a inclinação do gráfico de $\log k_2$ vs pK é 0.27. (Hupe e Jencks, 1977).

Estudamos, neste trabalho, as reações de tiólise de NPA e octanoato de p-nitrofenila (NPO) por n-heptilmercaptana (HM).

A n-heptilmercaptana tem um pK de 10.7 em água e, portanto, o passo limitante desta reação é o ataque do ion mercapteto à carbonila.

A decomposição do tioéster formado é lenta quando comparada com a reação de tiólise. Uma comparação pode ser feita entre a constante de segunda ordem da hidrólise alcalina do S-butiltioacetato ($k_{2OH} = 7.13 \text{ M}^{-1}.\text{MIN}^{-1}$, Noda, Kuby e Lardy, 1953) e a constante de segunda ordem de tiólise de NPA por n-propilmercaptana ($k_{2SH} = 1780$ Hupe e Jencks, 1977).

A relação entre k_{2OH} e k_{2SH} é da ordem de

250. Assim, em condições de pH menor que 11, e concentração de mercaptana da ordem de $5,15^5\text{M}$ pode se dizer que o produto da reação é o tioéster e p-nitrofenóxido.

Reações de grupos SH tem sido estudadas em micelas na tentativa de se traçar um paralelo entre o efeito de interfases nestas reações e reatividade do grupo SH em proteínas e enzimas.

A reatividade de grupos SH em proteínas para com reativos comuns de grupos SH (DTNB, Iodoacetamida) abrange uma faixa bastante ampla que vai desde grupos extremamente reativos até grupos que simplesmente não reagem (Friedman, 1973; Jocelyn, 1972). Essa ampla gama de reatividade é, em geral, atribuída à grande sensibilidade deste grupo ao microambiente em que se encontra na proteína. Isto é sustentado por alguns dados obtidos do estudo de reações de CoA e GSH com NPA em fase aquosa que mostram que os grupos SH desses cofatores reagem com uma constante de segunda ordem (c/ NPA) na faixa esperada (Shinkai e Kunitake, 1976). Entretanto, quando ligados à apoenzima : estes grupos parecem ser "ativados" (Friedman, 1973 e Jocelyn, 1972) apresentando uma reatividade maior que em fase aquosa. Dados de Shinkai e Kunitake (1976), demonstraram que as reações de GSH e CoA com NPA são acelerados por fatores de 100 e 300 vezes respectivamente quando em presença de CTAB, o que apoia a suposição de que uma interface pode alterar a reatividade desses grupos.

Outros estudos de reações de grupos SH em fase micelar foram realizados e obteve-se fatores de aceleração extremamente altos. A reação de dodecilmercaptana e NPA, por exemplo, é acelerada, na presença de CTAB, por um fator de 1.10^4 vezes (Tagakie e col, 1972). Os dados de Heitman (1968) mostram - que as reações de N-dodecil-DL-cisteína com iodoacetamida e NPA são acelerados por micelas positivas de CTAB (60-100 e 100-200 vezes) e inibidas por micelas negativas de N-dodecanoilglicina. A reação de tiofenol com 2,4 dinitrofluorbenzeno é acelerada por um fator de 1000 em presença de CTAB (Chaimovich e col., 1975). As reações de NPA e tiofenóis substituídos são aceleradas cerca de 50 vezes (Cuccovia e col., 1978).

Embora em cada um desses trabalhos alguns dos fatores responsáveis pela alteração da velocidade das reações tenham sido vislumbrados, em nenhum destes sistemas foi realizada uma análise quantitativa completa.

1.4 - Hidrólise de Iminolactonas

A hidrólise de 2 feniliminotetrahydrofurano (FI) foi utilizada como sonda para se obter informações sobre a força iônica na camada de Stern. A reação ocorre principalmente através do ataque de água à forma protonada da iminolactona.

A hidrólise de FI é dependente de pH (esquema 4) sendo que a $\text{pH} < 1$ o passo limitante da reação é a decomposição do intermediário tetrahédrico e acima de $\text{pH} 1$ o passo limi

tante é o ataque da água à forma protonada da iminolactona. A pHs maiores que 8 a reação ocorre através do ataque de OH^- ao FI protonado (Schmir e Cunningham, 1965).

Esquema 4

A hidrólise de FI leva à formação de anilina e butirolactona a pHs ácidos e γ hidroxibutirolactona a pHs alcalinos. A relação de produtos, portanto, depende de pH pois a dissociação do intermediário tetraédrico leva à produção de γ hidroxibutiranilida.

A constante de velocidade depende do pH, do

pK do substrato e a constante de velocidade observada é dada por:

$$k_o = \frac{(k_1 \cdot k_3 / k_2) (H^+)}{((H^+ + K_1) (H^+ + (k_3 / k_2)))} + \frac{k_7 k_w}{K_1} \quad (24)$$

Note-se que a velocidade da reação não depende da relação de produtos. Esta depende do pH e entre outras, da constante de dissociação do intermediário tetraédrico k_3, k_9 , eq.25

$$\% \text{ Anilina} = \frac{H^+}{H^+ + (K_3 k_9 / k_3)} \times 100 \quad (25)$$

A reação de hidrólise de FI alcança velocidade máxima na região entre pH 1 a 4 acima do qual diminui até alcançar um valor independente de pH ($= \frac{k_7 k_w}{K_1}$). A hidrólise de FI é susceptível a catálise básica geral por acetato fosfato e imidazol na região alcalina depois do ótimo de pH. A relação de produtos - também é afetada pela natureza e concentração de tampão (Cunningham e Schmir, 1965).

1.5 - OBJETIVOS

- 1) Identificar e quantificar os fatores que alteram a velocidade de reações em presença de micelas e lipossomos.
- 2) Utilizar o estudo de reações em presença de interfaces como ferramenta para se obter informações sobre a estrutura e características da interface.

Para alcançar estes objetivos utilizamos - dois sistemas de reações:

O primeiro é a reação de tiólise de ésteres de p-nitrofenol por n-heptilmercaptana. Esta reação foi estudada em presença de micelas com cargas diferentes e em presença de lipossomos de dimetildialquilamônio (Herquat). Através do estudo de efeito dessas superfícies sobre pK_a da mercaptana e velocidade de reação tentamos esclarecer como a reatividade do nucleófilo nas diversas superfícies é afetada.

O segundo sistema a ser estudado é a hidrólise de feniliminotetrahydrofurano na presença de SDS. Como esta reação é sensível a força iônica, tentamos obter informações a respeito da força iônica efetiva e da atividade da água na camada de Stern de micelas de SDS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

Os reagentes utilizados bem como sua procedencia, purificação e características são descritos de forma suscinta em seguida.

2.1.1 - Dodecilsulfato de Sódio (SDS)

O dodecilsulfato de sódio (SDS) (BDH Chemicals Ltd) foi utilizado sem nenhum tratamento prévio. A pureza do SDS foi confirmada medindo-se a composição de álcoois da cadeia do detergente por cromatografia gasosa do extrato etéreo obtido após hidrólise ácida do SDS (Kurz, 1962). A análise cromatografica (utilizando-se álcoois de cadeias longas como padrões) revelou a existência de 99% de dodecanol no composto original. A ausência de um mínimo nas curvas de tensão superficial (em função de concentração de detergente) indicou que o reagente era de grau de pureza aceitável para os nossos experimentos (Harrold, 1960). A CMC obtida por este método foi 8.10^{-3} M que coincide com o valor da literatura (Fendler e Fendler, 1975).

2.1.2 - Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (CTAB)

O brometo de hexadeciltrimetilamônio (E.Merck, Darmstadt) foi recristalizado três vezes de acetona/etanol (85:15) v/v e seco sob vácuo.

2.1.3 - n-Heptilmercaptana (HM)

A n-heptilmercaptana (HM) (The Connecticut Hard Rubber Co. Chemical Division) foi destilada a 1 mmHg e 37-38°C. A determinação da concentração de grupos SH do composto (Ellman, 1959) mostrou que 98% destes grupos estão na forma reduzida (SH). A HM, após destilação, foi mantida no congelador (-18°C) sob atmosfera de Ar.

2.1.4 - 4 - (- 1 - pireno) butanoato de metila (PBM)

O 4 - (- 1 - pireno) butanoato de metila (PBM) foi preparado por Pedro Berci Filho e utilizado sem qualquer tratamento prévio. O composto foi sintetizado refluxando-se, por 4 horas, uma mistura contendo 0.004 moles de ácido 4 - (- 1 - pireno) butírico, 20 ml de metanol e 0,675 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após este período o álcool que não reagiu foi evaporado em banho-maria. O resíduo foi colocado em funil de separação contendo água e o éster foi extraído com tetracloreto de carbono. A fase orgânica foi extraída repetidas vezes com solução de bicarbonato de sódio até não se observar evolução de gás carbônico. O tetracloreto de carbono foi extraído novamente com água e seco sobre sulfato de magnésio anidro. A solução, após secagem, foi filtrada e o solvente eliminado por aquecimento suave. O éster obtido desta forma apresentou análise elementar e espectro de NMR que confirmaram a estrutura do composto.

2.1.5 - HERQUAT

O Herquat 2HT-75 foi fornecido pela Herga Indústria Química S.A. Rio de Janeiro, na forma de pasta contendo uma mistura cloreto de dialquildimetilamônio (75% C_{18} e 25% C_{16}).

O material de partida foi seco sob vácuo e extraído com éter etílico em Soxhlet por dois dias. A fração sólida contendo o detergente foi recristalizada de acetona (6 vezes), seca sob vácuo e submetida a uma degradação de Hofmann para análise.

Degradação de Hofmann: Aproximadamente 0.0015 moles de Herquat foram colocados em 5 ml de água. Adicionou-se metanol à mistura em quantidade suficiente para solubilizar o composto. A solução foi mantida sob agitação por duas horas com 0.003 moles de óxido de prata (Cope e Trumbull, 1960) após o que a mistura foi filtrada. O hidróxido de tetralquilamônio formado (que permaneceu na fase aquosa) foi submetido a uma decomposição térmica que deu origem a dimetilalquilaminas e alcenos. O método empregado é descrito abaixo.

A um balão de duas bocas adapta-se um funil com igualador de pressão e entrada para nitrogênio e liga-se o sistema a dois frascos coletores (colocados em série) resfriados em gelo seco e acetona. A solução contendo o hidróxido de Herquat é colocada no funil e o balão é aquecido a 110-115°C em banho de óleo. A aparelhagem é adaptada a uma bomba de vácuo mantendo-se o sistema a uma pressão de 10 mmHg e sob fluxo de nitrogênio constante. O hidróxido é adicionado lentamente ao balão aquecido (em

aproximadamente 3 horas). Após a adição completa do composto os produtos da decomposição do hidróxido de Herquat (alcenos e dimetilalquilaminas) são destilados e recolhidos nos frascos coletores. Após o término da destilação o conteúdo dos frascos é reunido e extraído com diclorometano. O extrato é seco com sulfato de magnésio anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida. A mistura de produtos foi analisada por cromatografia gasosa utilizando-se como padrões alcenos e dimetilalquilaminas de cadeias variáveis. Para cromatografia utilizou-se uma coluna de aço inoxidável (6" x 1/8") com 10% de UCW-98 em cromosorb W (60-80 mesh) aw dmcs operada a 200°C. Esta análise mostrou que o Herquat purificado é uma mistura de 85% de nC_{18} , aproximadamente 15% de nC_{16} e traços de nC_{14} .

A análise por espectrometria de massa do detergente indicou que este consiste numa mistura de C_{18} e C_{16} numa proporção de 86 e 14%. A distribuição de cadeias alquílicas encontrada foi: 75% C_{18}/C_{18} , 23% C_{18}/C_{16} e 2% C_{16}/C_{16} .

O ponto de fusão da mistura é 153°C enquanto - que o ponto de fusão descrito na literatura para o cloreto de dimetildioctilamonio puro é 149,4-151°C (Swain e Kreevoy, 1954), Kunitake e colaboradores (1977), entretanto, obtiveram - um ponto de fusão entre 73-75°C para o mesmo composto.

2.1.6 - Tetrafluorborato de prata

O tetrafluorborato de prata foi sintetizado neu

tralizando-se uma suspensão de carbonato de prata (Chester, McCloskey e Coleman, 1955) com ácido fluorobórico 35% (Merck). A solução resultante foi filtrada em placa porosa e liofilizada - evitando-se exposição do composto à luz. O sal é higroscópico e por isso foi mantido em dessecador sobre pentóxido de fosforo ao abrigo da luz.

2.1.7 - 4-clorobutiranilida

A 4-clorobutiranilida foi preparada adicionando-se lentamente e sob agitação, uma solução etérea de anilina (0,07 moles) a uma solução de ácido 4-clorobutírico (0,035 moles) a temperatura ambiente. O cloreto de anilina, que precipita durante a reação, é removido por filtração. A solução etérea da 4-clorobutiranilida é evaporada à secura e recristalizada duas vezes de benzeno e éter de petróleo. O ponto de fusão do composto é 69-71°C (lit. 69-70°C, Lipp e Casper, 1925).

2.1.8 - 2-Feniliminotetrahidrofurano (FI)

O 2-feniliminotetrahidrofurano foi preparado a partir de tetrafluorborato de prata e 4-clorobutiranilida (Schmir e Cunningham, 1965). O produto foi obtido na forma de um óleo - que foi destilado a 0,025 mmHg e 100°C (Mukaiyama e Sato, 1963, 128°C a 2 mmHg). O espectro infravermelho do composto apresenta banda característica da ligação C=N a 5,88 μ (em clorofórmio). O coeficiente de extinção do composto a 243 nm em etanol é 6944.4 $\text{m}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (6900 $\text{m}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, Schmir e Cunningham, 1965). A hidrólise

se ácida do composto leva à formação de anilina e butirolactona. Existe, entretanto, uma contaminação de 17% de anilina já que a hidrólise alcalina do composto fornece 17% de anilina ao invés de 100% de γ hidroxibutiranilida como era esperado (Schmir e Cunningham, 1965).

2.1.9 - Metilsulfato de sódio

O metilsulfato de sódio foi sintetizado por hidrólise alcalina parcial do dimetilsulfato (Kurz, 1962). Adicionaram-se 0,125 moles de dimetilsulfato a uma solução de hidróxido de sódio (0,125 moles em 50 ml H_2O). O dimetilsulfato é imiscível com a fase aquosa. Entretanto, aquecendo-se a mistura a $40^{\circ}C$, com agitação ocasional, ocorre, após alguns minutos, uma reação rápida e exotérmica com o aparecimento de uma única fase límpida. A solução final é neutralizada (com NaOH ou H_2SO_4 , dependendo do pH) e o solvente é evaporado, a $30^{\circ}C$, em evaporador rotatório. O produto é dissolvido em metanol a quente removendo-se, por filtração, o sulfato de sódio formado. Após recristalização em metanol, o metilsulfato de sódio é seco sob vácuo e mantido em dessecador com pentóxido de fosforo.

2.1.10 - Outros

A anilina (E.Merck, Darmstadt) foi destilada - sobre pó de zinco (Fieser e Fieser, 1966).

O cloreto de ácido 4-clorobutírico (Aldrich - Chemical Company, Inc.) foi cedido pelo Dr. N. Petragnani e des

tilado antes de sua utilização.

O dimetilsulfato (Riedel - De Haenag) foi previamente destilado.

A Sephadex G-25 (fine, partículas com 20-80 μ de diâmetro) foi obtida da Sigma Chemical Co.

A glicose ^{14}C (Radio Chemical Company) tinha uma atividade específica de 1 mCi/mM e uma concentração de 0,0131M.

O acetato de p-nitrofenila foi obtido da Sigma Chemical Company e o ácido 5,5'-ditio-bis p-nitrobenzôico (DTNB) da BDH Chemicals Ltd.

A glutatona (GSH) foi cedida pela Dra. Shirley Schreier.

O 3(N,N dimetildodecilamônio)propano sulfonato (SDP) (Fendler, Day e Fendler, 1972) e o octanoato de p-nitrofenila(NPO) (Aldrigue, Carvalho e El Seoud) foram cedidos pelo Dr. Omar El Seoud e utilizados sem posterior purificação.

Brij.35 (Calbiochem) foi-nos cedido pelo Dr. Walter Colli e o tetradecilato de p-nitrofenila (TPA) (Sigma Chemical Co) pelo Dr. Walter Terra.

Todos os demais reagentes eram de grau p.a. e - utilizou-se, rotineiramente, água deionizada e bidestilada em todos os experimentos.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Determinação das Concentrações de CTAB e Herquat

As concentrações das soluções estoques de CTAB e Herquat foram obtidas por titulação de brometo e cloreto (Schales e Schales, 1941). A concentração de cloreto das frações obtidas nas cromatografias em Sephadex G-25 foram tituladas utilizando-se o mesmo método. O ensaio foi feito tomando-se 0,1 ml de cada fração determinando-se a concentração de cloreto com um microtitulador. As concentrações das soluções estoque de SDS, - Brij-35 e SDP foram calculadas através da pesagem do detergente.

2.2.2 - Determinação da concentração de n-heptilmercaptana

As soluções estoque de n-heptilmercaptana foram preparadas em acetonitrila e sua concentração calculada - através da determinação da concentração de grupos -SH livres - com DTNB (Ellman, 1959).

2.2.3 - Cinética

Todas as constantes de velocidade observada de pseudo-primeira ordem foram calculadas através da inclinação - dos gráficos de $\log(A_{\infty} - A_t)$ (A_{∞} = absorbância a tempo infinito e A_t = absorbância num tempo t) em função de tempo. Os gráficos - eram lineares até pelo menos 3 meias-vida.

2.2.3.1 - Tiólise de ésteres de p-nitrofenol

As reações de tiólise de ésteres foram acompanhadas através da medida da absorbância devida a liberação de

p-nitrofenóxido a pHs maiores que 7 (405 nm) e p-nitrofenol (330 nm) a pHs menores que 7.

Os ensaios foram feitos a 30°C em celas de quartzo fechadas de 3 ml e 1 cm de caminho óptico.

ENSAIO: O meio de reação contendo tampão, detergente e água (volume final 2,5 ml) é termostatizado a 30°C no espectrofotômetro. Adiciona-se à mistura 10 µl de uma solução estoque do éster de p-nitrofenol ($1 \cdot 10^{-3}$ M em acetonitrila) e, após agitação, adicionam-se 15 µl de uma solução estoque de mercaptona ($1 \cdot 10^{-2}$ M em acetonitrila). Portanto, a concentração final do éster é usualmente $4 \cdot 10^{-6}$ M e a do tiol $6 \cdot 10^{-5}$ M. A reação entre a concentração do éster e do tiol é, em geral, 1:10 e a porcentagem máxima de acetonitrila (a não ser quando especificado) é de 1%. Todas as soluções foram preparadas com água previamente fervida e saturada com nitrogênio.

2.2.3.2 - Hidrólise de 2-Feniliminotetrahidrofuranol (FI)

A reação foi seguida medindo-se o desaparecimento do FI a 243 nm (Schmir e Cunningham, 1965). O substrato foi dissolvido em acetonitrila ($7,5 \cdot 10^{-3}$ M) e a reação iniciada pela adição de 10 µl da solução estoque ao meio de reação previamente termostatizado a 30°C. A concentração final do substrato no meio de reação era, em geral, $3 \cdot 10^{-5}$ M.

2.2.4 - Determinação da relação de produtos da hidrólise de FI

A concentração de anilina formada após a hidrólise completa do FI (10 meias-vidas) foi determinada através de reação de diazotação utilizando-se uma curva padrão de anilina - (Schmir e Cunningham, 1965).

A concentração de γ -hidroxibutiranilida foi obtida subtraindo-se o valor da concentração de anilina da concentração inicial do FI.

2.2.5 - Determinação da constante de distribuição de n-heptilmercaptana (HM)

A constante de distribuição da HM foi calculada através da equação 26 obtida utilizando-se o modelo de pseudo-fase (Yatsimirski, Martinek e Berezin, 1971).

$$S_m = S_o + S_o K_{HM} C_D \quad (26)$$

onde S_m = concentração de mercaptana solubilizada a uma dada concentração de detergente

S_o = Concentração de mercaptana solubilizada a uma dada concentração de detergente na fase aquosa

C_D = Concentração total de detergente menos a CMC

K_{HM} = Constante de distribuição da mercaptana

Portanto, K_{HM} pode ser calculada a partir da inclinação do gráfico de S_m VS C_D .

A determinação de S_m e S_o foi feita do seguinte modo: Adicionou-se a uma série de tubos de ensaio com tampa esmeri

lhada concentrações variáveis de detergente e completou-se com tampão, o volume de 2ml. A cada tubo adicionou-se 0,1 ml de HM - pura. Os tubos foram fechados, agitados levemente e mantidos a 30°C por dois dias (com atmosfera de argônio). Após este período a camada de mercaptana foi retirada cuidadosamente com uma seringa e determinou-se a concentração máxima de HM solubilizado na presença e ausência de detergente (S_m e S_o).

2.2.6 - Determinação do pK aparente (pK_{ap}) de HM

O pK_{ap} da n-heptilmercaptana foi determinado (na presença de concentrações variáveis de anfifílico ou acetonitrila) através de medidas de absorbância a um comprimento de onda (240 nm) e pH fixos seguindo o protocolo experimental descrito - abaixo:

Mede-se a absorbância de HM ($5,0 \cdot 10^{-5} M$) em HCl 0,01M e em NaOH 1M a 240 nm. A absorbância das formas neutras e aniônica da HM independe da concentração de anfifílicos e acetonitrila tanto em meio ácido como alcalino. Em seguida determina-se a absorbância da HM ($5,0 \cdot 10^{-5} M$) em uma solução contendo concentrações variáveis de anfifílico (dissolvido em tampão) num volume final de 2,5 ml. A concentração e natureza do tampão utilizado nas medidas de absorbância, assim como o pH, depende do anfifílico utilizado (veja na seção Resultados). O pH do tampão utilizado é, em geral, intermediário entre o pK_{ap} máximo e mínimo a ser atingido na presença de detergente.

O pK_{ap} é calculado através da equação 27

$$pK_{ap} = pH - \log \frac{A_{\psi} - A_{HM}}{A_{HM}^{\theta} - A_{\psi}} \quad (27)$$

onde A_{ψ} é a absorvância da mercaptana a uma dada concentração de anfifílico ou acetonitrila.

A_{HM} é a absorvância da mercaptana a pH ácido (0,01 M HCl)

A_{HM}^{θ} é a absorvância da mercaptana a pH alcalino (1M NaOH)

2.2.7 - Preparação de Vesículas de Herquat

As vesículas de Herquat foram preparadas por dois métodos: injeção e sonicação.

2.2.7.1 - Sonicação

Uma alíquota de Herquat 0,2M dissolvida em etanol é colocada em um tubo de ensaio e o solvente é evaporado com fluxo de nitrogênio. A amostra é colocada em dessecador e mantida sob vácuo por 30 minutos. Em seguida adicionam-se tampão e de mais reagentes. A amostra é então sonicada durante 5 minutos, a temperatura ambiente em sonicator equipado com microtip a uma potência nominal de 50W.

2.2.7.2 - Injeção

A preparação de vesículas é feita injetando-se lentamente uma solução etanólica de Herquat (0,2M) em uma solu-ção, sob agitação violenta, contendo os reagentes adequados a

50°C. A injeção é feita com um capilar adaptado a uma seringa - através de um tubo plástico. A porcentagem final de etanol é sempre 5% v/v.

2.2.7.2.1 - Preparação de vesículas - para estudos cinéticos

Em geral, injeta-se 1 ml de uma solução etanólica de Herquat (0,2M) em 19 ml de tampão na concentração adequada. A concentração final de Herquat (da ordem de 10 mM) é determinada por titulação de cloreto (Schales e Schales, 1940).

2.2.7.2.2 - Preparação de vesículas - com (¹⁴C)-glicose.

A preparação é feita injetando-se 25 µl de uma solução etanólica de Herquat (0,2M) (utilizando-se uma seringa - Hamilton de 50 µl adaptada a um capilar) em 0,5 ml de solução - contendo tampão e (¹⁴C)-glicose (sob agitação).

2.2.7.2.3 - Preparação de vesículas - contendo PBM

O éster é dissolvido na solução etanólica de Herquat (0,2M) numa concentração de 0,002 M (1% mol/mol). Injeta-se 1 ml desta solução em 19 ml de tampão na concentração final adequada.

2.2.7.2.4 - Preparação de vesículas - contendo TPA

Em um tubo de ensaio adicionaram 0,375 ml de uma solução de TPA 1.10^{-3} M (em acetonitrila) e o solvente foi evaporado com um fluxo de nitrogênio.

Adicionou-se ao tubo de ensaio 0,25 ml de uma solução etanólica de Herquat 0,2M. Esta solução foi injetada em 4,75 ml de tampão acetato 5 mM pH 5,3.

Desta solução, contendo vesícula de Herquat com TPA, tomaram-se 0,2 ml e completou-se o volume da amostra para 3 ml com tampão. A solução foi termostatizada a 30°C (em cela de quartzo) após o que adicionaram-se 0,02 ml de HM $9,5.10^{-3}$ M. A cinética, foi seguida conforme descrito em Métodos.

2.2.7.2.5 - Preparação de vesículas - de Herquat contendo DTNB.

Adicionaram-se 0,06 ml de DTNB $1,25.10^{-3}$ M a 0,5 ml de Herquat 0,2M. Esta solução foi injetada em 9,5 ml de tampão formato de sódio 0,005 M pH 3,2. Uma alíquota de 2,5 ml desta solução foi colocada em uma cela de quartzo e, após termostatização da amostra, adicionaram-se 0,015 ml de HM $8,4.10^{-3}$ M ou 0,02 ml de GSH $7,2.10^{-3}$ M.

2.2.8 - Cromatografia em Coluna

A Sephadex-G25 foi hidratada a quente e, quando necessário, equilibrada em tampão. As colunas foram empacotadas

em estado estacionário por 12 horas e, após este período, foram lavadas exaustivamente (por 24 hs) com o tampão de eluição, mantendo-se um fluxo constante.

2.2.9 - Determinação de radioatividade.

A radioatividade das amostras eluidas das colunas foi determinada utilizando-se como líquido de cintilação - uma solução contendo 5g de 2-5 difeniloxazol, 100g de Naftaleno e Dioxana suficiente para completar 1 litro. Geralmente utilizava-se 5 ml deste líquido e 0,2 ml de amostra de cada fração da coluna.

2.2.10 - Determinação de k_{ψ} da reação de tiólise de NPA por HM das frações obtidas em Sephadex G-25.

Tomaram-se 0,5 ml de cada fração obtida da coluna de Sephadex 6-25 e completou-se o volume para 2,5 ml com o mesmo tampão de eluição da coluna. A solução foi termostatizada a 30°C em cela de quartzo, adicionaram-se 0,015 ml de HM 0,0092 M, 0,010 ml de NPA 1.10^{-3} M e determinou-se a constante de velocidade observada de pseudo-primeira ordem (k_{ψ}) como descrito em Métodos.

2.3 - Aparelhos

Os estudos cinéticos e determinação de pK foram feitos em espectrofotômetro Beckman M-25.

Os espectros de emissão de fluorescência foram

registrados em espectrofluorímetro MPF-4 da Hitachi-Perkin-Elmer.

A determinação de cloreto das frações eluídas - das colunas de Sephadex 6-25 foi feita utilizando-se um microtitulador Beckman/Spinco 153.

As medidas de radioatividade foram feitas em contador de cintilação Beckman LS-250.

A concentração micelar crítica (CMC) dos detergentes foi determinada medindo-se a tensão superficial em função da concentração de anfifílico utilizando-se um tensiometro de De Noüy da A-Krüß (modelo 8551) equipado com anel de platina - com um diâmetro de 0,37 mm.

A cromatografia gasosa foi feita num Reserach Chromatograph 5750 da Hewlett Packard.

As medidas de pH foram efetuadas utilizando-se um potenciometro modelo E 388 da Metrohm Herisau.

A preparação de vesículas foi efetuada em um sistema de concentração Amicon com membranas Millipore (PTHK 0251)

A sonicação de Herquat foi feita em um Cell - Disrupter Virsonic modelo nº 150.

Os cálculos e simulações de dados foram feitos com uma calculadora programável modelo 20 da Hewlett-Packard.

3. RESULTADOS

3.1 - Tiólise de Ésteres em Fase Micelar

As reações de tiólise de ésteres de p-nitrofenila por n-heptilmercaptana (HM) (esquema 5) foram estudadas em presença de micelas zwitteriônicas, não iônicas, positivas e negativas.

onde $\text{R} = \text{CH}_3 \text{ (CH}_2)_5\text{CH}_2^-$

$\text{R}' = \text{CH}_3^- \text{ ou } \text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2^-$

esquema 5

Hupe e Jencks (1977) mostraram que a constante de segunda ordem de tiólise de acetato de p-nitrofenila (NPA) (k_2) por mercaptanas alifáticas aumenta com o número de carbonos da cadeia do tiol. Estes estudos foram limitados às reações de NPA com etil e n-propilmercaptana. Como não conhecemos a função que relaciona k_2 com o número de carbonos da cadeia do tiol, não pudemos extrapolar os valores existentes de k_2 para o valor da constante de tiólise de NPA por HM (k_{2T}).

O valor desta constante (k_{2T}) foi determinado, em fase aquosa, na presença de uma porcentagem de acetonitrila maior do que a habitualmente utilizada nas cinéticas em presença

de detergente, devido à pequena solubilidade da HM em água (Yabroff, 1940).

A hidrólise alcalina de NPA, nas mesmas condições de estudo da reação de tiólise, é significativa. Por este motivo, a hidrólise do éster foi estudada em condições idênticas à da reação de tiólise de NPA.

3.1.1 - Determinação da constante de segunda ordem da reação de tiólise de NPA por n-Heptilmercaptana.

A constante de segunda ordem de tiólise de NPA por HM (k_{2T}) foi calculada através da equação 28.

$$k_{2T} = \frac{k_{\psi} - k_{OH}}{(HM^{-})} \quad (28)$$

onde k_{ψ} = constante de velocidade observada de pseudo-primeira ordem em presença de HM (2.2.3.1)

k_{OH} = constante de velocidade observada de pseudo-primeira ordem da hidrólise de NPA

HM^{-} = concentração da forma aniônica do tiol no pH em que a reação foi estudada.

A concentração de HM^{-} foi calculada através da eq. 29

$$pH = pK + \log \frac{(HM^{-})}{(HM_T - HM^{-})} \quad (29)$$

onde o pK da mercaptana foi determinado em presença de acetonitrila (2.2.6) e HM_T é a concentração total do tiol.

Na tabela 1 aparecem os valores obtidos para k_{ψ} , k_{OH} (constante de segunda ordem de hidrólise de NPA), k_{2T} e pK em presença de acetonitrila.

TABELA 1 - EFEITO DE ACETONITRILA NA HIDRÓLISE E TIÓLISE DE NPA

% de		k (seg^{-1})		k_{OH} (seg^{-1})	k_{2OH1} ($M^{-1}.\text{seg}^{-1}$)	k_{2T2} ($M^{-1}.\text{seg}^{-1}$)
Acetonitrila	pH	pK	$\times 10^3$	$\times 10^3$		
2,4	10,10	10,7	3,7	1,24	19,6	35,3
8,37	10,28	10,97	4,0	1,52	13,0	51,3

- 1- k_{2OH} foi calculado dividindo-se k_{OH} pela concentração de hidróxi do no pH de reação
- 2- A concentração de HM nestes experimentos era $1.74.10^{-4}M$, a de NPA $5.10^{-6}M$ e K_{2T} foi calculada segundo a equação 28
- 3- As reações foram estudadas em tampão borato $0.0196M$ (em 2,4% de acetonitrila) e $0.0184M$ (em 8,37% de acetonitrila).

Observa-se que o aumento de acetonitrila leva a um aumento do pK da HM e k_{2T} (tab.1). A constante de segunda ordem da reação de tiólise de NPA (k_{2T}), utilizada adiante em nossos cálculos foi obtida extrapolando-se os valores de k_{2T} para 1% de acetonitrila (condição habitual em que as cinéticas foram realizadas). A constante calculada ($30M^{-1}.\text{seg}^{-1}$) é comparável com o valor obtido por Hupe e Jencks (1977) para a constante de segunda ordem da reação de tiólise de NPA por n-propilmercaptana.

3.1.2 - Efeito de CTAB na tiólise de ésteres

A hidrólise alcalina de tioésteres alifáticos é lenta quando comparada com a velocidade da reação de tiólise de ésteres derivados de p-nitrofenol. Os estudos de Noda, Kuby e Cardy (1953) mostraram que a constante de segunda ordem da hidrólise alcalina (k_{OHB}) de S-butiltioacetato (Sb) é da ordem de $1.12\text{M}^{-1}.\text{seg}^{-1}$. Assim, embora na reação de NPA e HM (eq.1) o tioéster formado seja o S-heptiltioacetato (Sh), é razoável a suposição de que a constante de segunda ordem da hidrólise deste composto seja semelhante à do homólogo citado anteriormente (Sb). O valor calculado para a constante de velocidade observada de pseudo-primeira ordem da reação de hidrólise de Sb a pH 10 é, aproximadamente, $1.10^{-5} \text{ seg}^{-1}$. Comparando-se este último valor com a constante de velocidade observada para a reação de tiólise (k_{ψ}) (nas condições descritas na Tabela 1) temos que a reação de tiólise é aproximadamente 350 vezes mais rápida que a hidrólise do tioéster. Entretanto, não existem dados de literatura a respeito da hidrólise alcalina do tioéster em presença de micelas. Para verificarmos se o tioéster formado na presença de CTAB, durante a tiólise de NPA, é estável, estudamos as reações de tiólise e hidrólise do éster em 0,01M de detergente em condições em que a relação NPA/HM é aproximadamente 3 (Fig.1).

O gráfico de $\log (A_{\infty} - A_t)$ em função de tempo na presença de HM, mostra que inicialmente ocorre uma reação rápida seguida de outra mais lenta. A inclinação da reta que caracteriza a reação lenta, em presença de HM, fornece uma constante de pseudo-primeira ordem (k_{ψ}) idêntica à da curva de hidrólise de

Fig. 1 - Efeito de CTAB na reação de hidrólise e tiólise de NPA

O meio de reação continha tampão borato 0,025M , pH 8.9 e 0,01M de CTAB

○ Hidrólise alcalina de NPA. A concentração de NPA utilizada foi $5.1.10^{-5}$ M

● Tiólise de NPA. A concentração de HM era $1.74.10^{-5}$ M e a de NPA $5.1.10^{-5}$

NPA (k_{OH}) ($k_{OH} = 1,35 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ e k_{ψ} (2a.fase) = $1,33 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$). Isto demonstra que a reação mais lenta na presença de HM é devida à hidrólise alcalina de NPA e que o tioéster formado na primeira - fase da reação é decomposto a uma velocidade muito menor que a reação de tiólise. Portanto, pode-se afirmar que, nas condições habituais de cinética em presença de CTAB, o tioéster formado é estável.

O efeito da concentração de CTAB na reação de tiólise de ésteres de p-nitrofenila por HM foi analisado matematicamente segundo o modelo de Troca Iônica desenvolvido por Quina e Chaimovich (1979). A equação que descreve o efeito de micelas positivas na reação de tiólise de NPA (equação 30) é aplicável para qualquer sistema de reação em que um nucleófilo dissociável (onde a forma reativa tem carga oposta à da micela) reage com um substrato neutro em presença de tampão.

$$k_{\psi} = (HM)_T K_a \frac{(k_2^m/\bar{V}) (K_s K_A / Br) (Br_b / Br_f) + k_2^O}{(1 + K_{HM} C_D) (H_f^+ + K_{ap}) (1 + K_s C_D)} \quad (30)$$

onde k_{ψ} = constante de velocidade observada de pseudo primeira ordem

k_2^O = constante de velocidade observada de segunda-ordem na fase aquosa

k_2^m = constante de velocidade observada de segunda-ordem na fase micelar

K_a = constante de dissociação de mercaptana na fase aquosa

K_{ap} = constante de dissociação da mercaptana na fase aquosa - em presença de detergente

K_s = constante de associação do éster

K_{HM} = constante de associação da forma neutra da mercaptana

$K_{A/Br}$ = Constante de seletividade para a troca entre a forma aniônica da mercaptana e o brometo

Br_b = concentração analítica de brometo ligado à micela

Br_f = concentração analítica de brometo na fase aquosa

H_f^+ = concentração de H^+ na fase aquosa

HM_T = concentração total de mercaptana

C_D = concentração total de detergente (C_T) menos a concentração micelar crítica (CMC)

$\bar{V}$ = volume molar do detergente

As concentrações de Br_b e Br_f são calculadas através das equações 31 e 32

$$Br_b = (1 - \alpha) C_D - OH_b - T_b - HM_b \quad (31)$$

onde: α = grau de dissociação da micela

OH_b = concentração analítica de hidróxido ligado à micela

T_b = concentração analítica da forma aniônica do tampão ligado à micela

HM_b = concentração analítica da forma aniônica da mercaptana ligado à micela

$$e \quad Br_f = \alpha C_D + CMC + OH_b + T_b + HM_b \quad (32)$$

No cálculo das concentrações de Br_b e Br_f desprezamos a contribuição de HM_b porque o valor absoluto deste termo é muito pequeno quando comparado com os demais termos das equações 4 e 5.

A concentração de OH_b é dada pela equação 33

$$OH_b^3 + OH_b^2 (A_2 + K_{OH/T} \cdot OH_f + T_T) + OH_b OH_f (K_{OH/T} A_2 + K_{OH/Br} \cdot (T_T - (1 - \alpha) C_D)) - K_{OH/Br} OH_f^2 (1 - \alpha) C_D K_{OH/T} = 0 \quad (33)$$

onde $K_{OH/T}$ = constante de seletividade para a troca entre o hidróxido e a forma negativa do tampão

$K_{OH/Br}$ = constante de seletividade para a troca entre o hidróxido e o brometo

OH_f = concentração de hidróxido na fase aquosa

T_T = concentração analítica total de tampão

$$e A_2 = \alpha C_D + CMC + K_{OH/Br} OH_f$$

As expressões apropriadas para T_T , $K_{OH/Br}$ e $K_{OH/T}$ são:

$$T_T = T_f + T_b \quad (34)$$

$$K_{OH/Br} = \frac{OH_b \cdot Br_f}{OH_f \cdot Br_b} \quad (35)$$

$$K_{OH/T} = \frac{OH_b \cdot T_f}{OH_f \cdot T_b} \quad \text{ou} \quad K_{OH/T} = \frac{OH_b (T_T - T_b)}{OH_f \cdot T_b} \quad (36)$$

Para podermos analisar o efeito de CTAB na reação de HM com NPA e NPO utilizando curvas teóricas com um mínimo de parâmetros ajustáveis determinamos, por métodos independentes, os valo-

res de K_s (para NPA e NPO), K_{HM} e pK_{ap} em função da concentração de CTAB.

3.1.2.1 - Determinação das constantes de distribuição de NPA e NPO na presença de CTAB.

O trabalho de Funasaki (1978), entre outros, mostra que existe uma relação linear entre o número de carbonos (n) da cadeia alifática dos ésteres de p-nitrofenol e $\log K_s$. Utilizando -se os dados de K_s de Funasaki (1978), Gitler e Ochoa-Solano (1968), Romsted (1975) e Yatsimiski, Martinek e Berezin (1978) construímos - um gráfico de $\log K_s$ vs. n (figura 2) do qual obtivemos um valor de $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para a K_s de NPO. O valor utilizado para a K_s de NPA - foi 54 M^{-1} (Funasaki, 1978).

3.1.2.2 - Determinação de K_{HM} em CTAB

A constante de distribuição de um substrato entre a fase aquosa e micelar está relacionada com a solubilidade do substrato em presença do detergente através da equação 26 (Yatsimiski , Martinek e Berezin, 1977).

$$\frac{S_m}{S_o} = 1 + K_{HM} C_D \quad (26)$$

onde S_o é a concentração analítica de substrato solubilizado em - água e S_m a concentração analítica total de substrato solubilizado numa concentração C_D de detergente micelizado.

A determinação de K_{HM} foi feita medindo-se o au

Fig. 2 - Efeito do número de carbonos na cadeia alifática de ésteres de p-nitrofenila (n) e $\log K_s$

- Funasaki, 1977
- Gitler e Ochoa-Solano, 1968
- Yatsimirski, Martinek, Berezin, 1971
- Romsted, 1975

mento da solubilização de HM em função da concentração de CTAB em fosfato de sódio 0,02M pH 4,7 (30°C). O valor de K_{HM} foi calculado através da inclinação do gráfico onde se relaciona S_m e C_D (2.2.5) (Fig.3) obtendo-se um valor de $3700 \text{ M}^{-1} \pm 300$.

3.1.2.3 - Efeito de CTAB no pKap da HM.

O valor de pKap em função da concentração de CTAB foi determinado em tampão borato 0,02M, pH 10,1 (Fig.4).

O pKap da HM diminui com o aumento da concentração de CTAB chegando a um valor mínimo por volta de 3 mM de detergente. (Fig. 4). Acima desta concentração de CTAB o pKap volta a aumentar, passa por um valor de pKap idêntico ao da mercaptana na fase aquosa e alcança um patamar a concentrações altas de detergente (Fig. 4).

O cálculo da curva teórica que relaciona pKap da HM e C_D foi efetuado através das equações 20, 31, 32 e 33 (Quina e Chaimovich, 1979)

$$K_{ap} = K_a \frac{1 + K_{A/Br} \cdot (Br_b / Br_f)}{1 + K_{HM} C_D} \quad (20)$$

Os valores dos parametros utilizados nessas equações estão relacionados abaixo:

$$K_{OH/Br} = 0,08 \text{ (Chaimovich e col, 1979)}$$

$$K_{OH/T} = 2,25 \text{ (Quina e col, 1980)}$$

Fig. 3 - Efeito da concentração de CTAB na solubilização de HM.

Fig. 4 - Efeito da concentração de CTAB no pKap da HM.

$$K_{HM} = 3700 \text{ (veja 3.1.2.2)}$$

$$\alpha = 0,2 \text{ (Romsted, 1975)}$$

$$K_a = 1,99 \times 10^{-11} \text{ (Fig. 4)}$$

$$CMC = 5 \cdot 10^{-4} M$$

O único dado adicional necessário para gerar a curva teórica (equação 20) é o valor de $K_{A/Br}$. Uma primeira estimativa de $K_{A/Br}$ foi obtida da seguinte forma: Na concentração de detergente onde K_{ap} é igual a K_a , a equação (20) fica reduzida à equação 37

$$K_{HM} C_D = K_{A/Br} (Br_b / Br_f) \quad (37)$$

Esta condição é satisfeita por volta de 0.06M de CTAB. Neste concentração de detergente, a relação Br_b / Br_f é da ordem de 3,7 (calculado sem levar em conta a ligação de tampão). Utilizando-se os valores de $C_D = 0,06M$, de $K_{HM} = 3700M^{-1}$ e $Br_b / Br_f = 3,7$ na equação 37, obtém-se um $K_{A/Br}$ igual a 60. Este valor de $K_{A/Br}$ é utilizado como uma primeira estimativa. O valor obtido por interação das equações 20, 31, 32 e 33 é 75. Pode-se apreciar que, apesar da complexidade da curva que relaciona pK_{ap} com C_D a coincidência entre a predição teórica e os dados experimentais é altamente satisfatória.

3.1.2.4 - Efeito de CTAB na tiólise de NPA por HM.

O efeito de CTAB na reação de tiólise de NPA por HM foi estudado em tampão borato a vários pHs (Fig. 5.)

Fig. 5 - Efeito da concentração de CTAB na reação de tiólise de NPA. A concentração de NPA em todos os experimentos era $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ e a concentração de HM era $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$.

- Δ tampão borax/borato 0.02M, pH 7.7
- $\blacksquare$ tampão borax/borato 0.02M, pH 8
- $\square$ tampão borato 0.02M, pH 8.3
- $\bullet$ tampão borato 0.02M, pH 8.6
- $\circ$ tampão borato 0.02M, pH 8.9

As curvas são teóricas (vide texto)

Na figura 5 observa-se, em todos os pHs, um aumento da constante de velocidade observada (k_{ψ}) com o aumento da concentração de detergente até se alcançar um valor máximo ($k_{\psi}^{\text{máx}}$). O aumento posterior da concentração de detergente leva a uma diminuição de k_{ψ} .

Os resultados da figura 5 foram analisados - através da equação 30 utilizando-se os seguintes valores para os parâmetros indicados abaixo:

$$K_{\text{OH/Br}} = 0,08 \text{ (Politi e col., 1979)}$$

$$K_{\text{OH/T}} = 2,25 \text{ (Quina e col., 1980)}$$

$$K_{\text{A/Br}} = 75 \text{ (3.1.2.3)}$$

$$K_{\text{HM}} = 3700 \text{ M}^{-1} \text{ (3.1.2.2)}$$

$$K_s = 54 \text{ M}^{-1} \text{ (Funasaki, 1978)}$$

$$\bar{v} = 0,37 \text{ l.M}^{-1} \text{ (Martinek e col., 1973)}$$

$$\alpha = 0,2 \text{ (Romsted, 1975)}$$

$$K_a = 1,99 \times 10^{-11}$$

$$k_2^0 = 30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1} \text{ (3.1.1.1)}$$

$$\text{CMC} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

K_{ap} = varia com a concentração de C_D (veja figura 4) e - foi gerado variando-se unicamente o valor de k_2^{m} (constante de segunda ordem de tiólise na fase micelar).

Os valores de k_0 (constante de tiólise observada em condições de pseudo primeira ordem na fase aquosa), $k_{\psi}^{\text{máx}}$ (constante de tiólise de pseudo primeira ordem em presença de de

tergente), as relações k_{ψ}/k_o e, k_2^m/k_2^o são mostrados na tabela 2 nos vários pHs em que a reação foi estudada.

TABELA 2 - Efeito de CTAB na reação de tiólise de NPA por HM.

tampão e pH	CTAB ^a (M) x 10 ³	k_o^b (seg ⁻¹) x 10 ⁵	$k_{\psi_{m\acute{a}x}}^c$ (seg ⁻¹) x 10 ²	$k_{\psi_{m\acute{a}x}}/k_o$	k_2^m/k_2^o
Borax/borato 0,02M, pH 7.7	2	0,15	0.914	6090	3.3
Borax/borato 0.02M, pH 8.0	2	0.30	1.9	6350	3.6
Borato 0,02M, pH 8.3	1.6	0.59	4.13	6940	4.2
Borato 0,02M, pH 8.6	2	1.35	8.28	6130	4.2
Borato 0,02M, pH 8.9	2	2.34	13.0	5550	4.2

a. Concentração de detergente onde ocorre um máximo em k_{ψ}

b. k_o foi calculada multiplicando-se k_2^o (30M⁻¹seg⁻¹) pela concentração de HM dissociada em cada pH (utilizando-se um pK=10.7).

c. $k_{\psi_{m\acute{a}x}}$ é o valor máximo de constante de velocidade observada na presença de detergente e foi obtido da fig. 5. A concentração de HM e NPA utilizadas aparecem - na legenda da figura 5.

Na tabela 2 pode-se observar que embora as constantes de segunda ordem na fase micelar (k_2^m) e aquosa (k_2^o) difiram por um fator máximo de 4, a aceleração obtida por volta de 2mM de CTAB é da ordem de 6000 vezes. Em tampão borato (pHs :8,3; 8,6 e 8,9) o aumento do pH leva a uma diminuição do fator de aceleração ($k_{\psi_{m\acute{a}x}}/k_o$). Entretanto, em tampão borax/borato, a relação

$k_{\psi\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}/k_{\text{o}}$ aumenta com o pH (ver tabela pHs 7,7 e 8,0).

Para fins ilustrativos os valores de k_{ψ} , a uma única concentração de CTAB, foram relacionados com pH. O gráfico de $\log k_{\psi}$ vs pH (fig.6) apresenta uma inclinação de 0,96 indicando que, ainda na fase micelar, a forma reativa da mercaptana é a aniônica.

A análise quantitativa do efeito de CTAB na tiólise de NPA demonstrou que k_2^{m} é, aproximadamente, 4 vezes maior que k_2^{o} . Esta pequena diferença poderia ser devida à pequena superposição das curvas de distribuição do nucleófilo e do éster. Já que a constante de distribuição de NPA é menor que a da HM e, possivelmente, a região de solubilização destes dois substratos na micela é diferente, estudamos a tiólise de outro substrato que possui uma constante de distribuição maior que a do NPA, o octanoato de p-nitrofenila (NPO).

3.1.2.5 - Efeito de CTAB na tiólise de NPO por HM.

A tiólise de NPO, em presença de CTAB, foi estudada em tampão borax/borato 0.02M, pH 7.6 (figura 7).

O valor de k_{ψ} aumenta com a concentração de CTAB até se alcançar um máximo por volta de 1.10^{-3} M de detergente. Acima desta concentração k_{ψ} diminui até alcançar um valor constante.

A análise quantitativa dos dados de tiólise de NPO foi feita através das equações 30, 31, 32 e 33, com os mesmos parâmetros utilizados para o ajuste dos dados de tiólise de NPA -

Fig. 6 - Efeito de pH em $\log k_{\psi}$ em presença de CTAB

- Reação de tiólise de NPO. Os valores de k_{ψ} foram obtidos da fig. 8 a $1.10^{-3}M$ de CTAB
- Reação de tiólise de NPA. Os valores de k_{ψ} foram obtidos da fig. 5 a $2.10^{-3}M$ de CTAB.

Fig. 7 - Efeito da concentração de CTAB na reação de tiólise de NPO

A reação foi estudada em tampão borax/borato 0.02M, pH 7.6. A concentração de NPO utilizada neste experimento era $4 \cdot 10^{-6}\text{M}$ e a de HM $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$.
As curvas são teóricas (vide texto)

por HM. As únicas exceções foram os valores de K_s (que para NPO é $1.5 \cdot 10^4 M^{-1}$) e a relação k_m^2/k_o^2 que, neste caso, é 1.15.

Um outro ajuste teórico aos dados da fig.7 - foi feito mudando-se o valor da constante de associação do éster (NPO). Os resultados mostraram que a relação k_m^2/k_o^2 muda de 1.15 quando $K_s = 1.5 \cdot 10^4 M^{-1}$ para 1 quando $K_s = 5 \cdot 10^4 M^{-1}$. Portanto, - mesmo que o valor de K_s utilizado nos ajustes teóricos esteja subestimado, o aumento no valor deste parâmetro não afeta significativamente a relação k_m^2/k_o^2 .

O estudo do efeito de pH na reação de tiólise de NPO por HM não pode ser realizado em tampão borato porque a velocidade da reação, já em pH 7.7, é demasiadamente alta para ser acompanhada pelos métodos espectrofotométricos que dispomos.

Entretanto, em presença de brometo (contraíção do CTAB) a velocidade da reação é diminuída. Portanto, o estudo de efeito de pH na tiólise de NPO foi realizado em tampão tris/HBr 0.02M (figura 8).

As curvas de k_ψ vs CTAB, a vários pHs, tem formas semelhantes e não se observa um máximo de k_ψ em função de concentração de detergente. A constante de velocidade observada diminui com a concentração de CTAB até alcançar um valor constante.

A análise quantitativa dos dados de k_ψ em função de CTAB foi simplificada pelo fato do ânion do tampão tris/HBr ser idêntico ao do detergente. Não há, portanto, neces-

Fig.8 - Efeito de CTAB na reação de tiólise de NPO.

A concentração de NPO, em todos os experimentos era $4 \cdot 10^{-6}$ M e a de HM $5 \cdot 10^{-5}$ M. Utilizou-se tampão tris/HBr 0.02M em todas as reações estudadas.

■ pH 7.7 □ pH 8.0 ● pH 8.3 ○ pH 8.55
 Todas as curvas são teóricas (vide texto)

cidade de se incluir, nas equações que descrevem o sistema, uma constante de troca adicional entre o contraíon da micela e o ânion do tampão. Assim, embora este sistema também seja descrito pela equação 30, os cálculos de Br_b , Br_f e OH_b ficam reduzidos a:

$$Br_b = (1 - \alpha) C_D - OH_b \quad (38)$$

$$Br_f = \alpha C_D + CMC + OH_b + Br_T \quad (39)$$

$$OH_b = \frac{-(A_2 + Br_T) + \sqrt{(A_2 + Br_T)^2 + 4 K_{OH/Br} \cdot OH_f \cdot C_D (1 - \alpha)}}{2} \quad (40)$$

onde Br_T é a concentração de brometo proveniente do tampão.

As curvas teóricas de k_ψ vs CTAB (Fig.8) foram obtidas através das equações 20, 30, 38, 39 e 40, utilizando-se uma relação k_m^2/k_o^2 de praticamente 1. Todos os demais parâmetros foram idênticos aos utilizados na análise da fig. 7.

Através dos dados das figuras 7 e 8, calculamos os fatores máximos de aceleração da reação de tiólise de NPO na presença de CTAB a vários pHs. Estes valores ($k_{\psi_{\max}}/k_o$) assim como a relação k_m^2/k_o^2 aparecem na Tabela 3.

TABELA 3 - Efeito de CTAB na reação de tiólise de NPO¹

Tampão	pH	CTAB(M) x10 ³	k_o (seg ⁻¹) x10 ⁶	$k_{\psi_{\max}}$ (seg ⁻¹) x10 ²	$k_{\psi_{\max}}/k_o$	k_m^2/k_o^2
Borax/Borato 0.02M	7.6	1	1.47	11.6	78900	1.15
tris/HBr 0.02M	7.7	0.8	1.5	0.457	3050	1.0
tris/HBr 0.02M	8.0	1	3.0	1.5	5020	1.2
tris/HBr 0.02M	8.3	0.6	5.95	3.01	5060	1.0
tris/HBr 0.02M	8.55	1	10.57	6.13	5800	1.0
tris/HBr 0.02M	8.9	0.8	23.4	36.7	15800	1.2

1. A concentração de HM e NPO utilizadas nestes experimentos aparecem nas legendas das figuras 7 e 8.

Observa-se na Tabela 3, que os maiores fatores de aceleração são os obtidos em tampão borax/borato pH 7.6 (onde a concentração do ânion do tampão é praticamente nula) e em tampão tris/HBr pH 8.9 (pH onde a concentração de brometo é pequena, da ordem de $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). A relação k_m^2/k_o^2 é praticamente 1 para todos os pHs em que a reação foi estudada.

O efeito de pH em $\log k_\psi$, a uma única concentração de CTAB, para a reação de NPO e HM é mostrado na fig. 6. A inclinação da reta pH vs $\log k_\psi$ é 1.56.

Levamos, então, a efeito um estudo da reação de tiólise de NPO por HM em presença de SDS tentando identificar o efeito da carga negativa desta micela sobre a velocidade da reação. Para que isto fosse possível determinamos o efeito de SDS no pK da HM e a constante de distribuição da forma neutra do tiol em SDS.

3.1.3 - Efeito de SDS na tiólise de NPO por HM

3.1.3.1 - Determinação de K_{HM} em SDS

A constante de distribuição de HM em SDS foi determinada através da solubilização da mercaptana em função da concentração do detergente (Fig. 9).

A constante de distribuição foi calculada através da inclinação da reta S_m vs SDS (equação 26) obtendo-se um valor de $K_{HM} 870 \text{ M}^{-1}$.

Fig. 9 - Efeito da concentração de SDS na solubilização da HM.

O experimento foi realizado em fosfato de sódio 0.06M, pH 4.5

3,1.3,2 - Efeito de SDS no pKap da HM

No gráfico que relaciona a variação de pKap da HM em função da concentração de SDS (fig.10) observa-se que o aumento da concentração de detergente leva a um aumento no pKap do tiol. O estudo foi feito em tampão fosfato 0,02M pH 11,3.

O ânion da HM possui uma estrutura anfifílica e, portanto, tem um comportamento em solução comparável ao monômero de SDS. O tratamento matemático que descreve este sistema é o desenvolvido por Yatsimirski, Martinek e Berezin (1971) que supõe uma constante de associação tanto para a forma neutra como para a forma negativa da mercaptana. O efeito de SDS sobre a dissociação da HM pode ser descrito pela equação 12

$$K_{ap} = K_a \frac{1 + K_{HM^-} \cdot C_D}{1 + K_{HM'} \cdot C_D} \quad (12)$$

onde K_{HM^-} é a constante de associação da forma aniônica da mercaptana.

A curva de pKap vs C_D (fig.10) foi ajustada através da equação 12 utilizando-se $K_{HM} = 870 \text{ M}^{-1}$ e iterando-se o valor de K_{HM^-} . O melhor ajuste da equação 12 aos dados experimentais foi conseguido com um valor de 1 M^{-1} para K_{HM^-} .

Fig. 10 - Efeito da concentração de SDS no pK_{ap} da HM
Determinou-se o pK_{ap} da HM em fosfato de
sódio 0.02M, pH 11.3

3,1,3,3 - Efeito de SDS na tiólise de NPO por HM

O efeito da variação da concentração de SDS - na constante de pseudo-primeira ordem de tiólise de NPO (k_ψ) aparece na fig. 11. Os valores de k_ψ foram obtidos subtraindo-se da constante de velocidade observada na presença de HM a constante - de hidrólise de NPO determinada nas mesmas condições.

Observa-se na figura 11 que o aumento de concentração de SDS produz uma diminuição acentuada de k_ψ chegando-se a um patamar em altas concentrações de detergente. A análise matemática desta reação em presença de SDS foi feita utilizando - se o modelo de pseudo-fase (Yatsimirski, Martinek e Berezin, 1971).

A equação que descreve adequadamente o sistema é a equação 13

$$k_\psi = \frac{H_{AT} \cdot k_2^m / \bar{V} \cdot K_{HM}^- \cdot K_s \cdot C_D + k_2^O}{(1 + K_{HM}^- C_D) (1 + K_s C_D) (1 + H^+ / K_{ap})} \quad (13)$$

Os parâmetros utilizados para o ajuste da eq.13 aos dados experimentais foram:

$$\begin{aligned} \text{CMC} &= 1.10^{-3} \text{ M} & k_2^O &= 30 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1} & K_{HM} &= 870 \text{ M}^{-1} \\ K_{HM}^- &= 1 \text{ M}^{-1} & \bar{V} &= 0.25 \text{ l.M}^{-1} \end{aligned}$$

K_{ap} = determinado através da eq.12

Como não temos um valor experimental para a constante de associação de NPO em SDS, utilizamos 3 valores de K_s

Fig. 11 - Efeito da concentração de SDS na reação de NPO e HM.

O experimento foi realizado em NaOH 0.002M, pH 11.1. A concentração de NPO era $4 \cdot 10^{-6}$ M e a de HM $2 \cdot 10^{-4}$ M. A curva é teórica (vide texto).

para fazermos os ajustes da equação 13 aos dados experimentais. O valor máximo de K_s utilizado foi $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ que também foi utilizado para a reação de NPO e HM em CTAB. As constantes de associação de substratos não carregados com SDS são da ordem de 2 a 3 vezes menores que as constantes de associação com CTAB (Almgren, Grieses e Thomas, 1979). Portanto, outros ajustes foram feitos utilizando-se também $K_s = 7500 \text{ M}^{-1}$ e $K_s = 5000 \text{ M}^{-1}$. Entretanto, os valores de k_2^m obtidos utilizando-se as três constantes de associação para NPO foram idênticos ($k_2^m/k_2^o = 0.085$).

A fim de completar o estudo sobre o efeito de carga interfacial sobre a velocidade de tiólise de NPO esta reação foi estudada em presença de um detergente zwitteriônico, 3-(N,N dimetildodecilamônio)propano-1-sulfonato (SDP) e um detergente não iônico (Brij-35).

3.1.4 - Efeito de SDP na tiólise de NPO

3.1.4.1 - Efeito de SDP sobre o pKap da HM.

O efeito da variação da concentração de SDP sobre os valores de pKap da HM é apresentado na figura 12. O pKap da HM foi determinado em tampão borato 0.02M a pH 10.1.

O pKap da HM aumenta com a concentração de SDP e a forma da curva obtida é bastante similar à observada em presença de SDS (fig.10). Para este sistema utilizamos a mesma análise quantitativa descrita para o cálculo de pKap em SDS.

A curva da fig. 12 foi analisada através da

Fig.12 - Efeito da concentração de SDP no pKap de HM
Determinou-se o pKap em tampão borato 0.02M,
pH 10.15. A concentração de HM utilizada foi
 $5.7 \cdot 10^{-5}$ M. A curva é teórica (vide texto).

eq. 12, utilizando-se para K_{HM} o mesmo valor determinado em SDS. O melhor ajuste da eq. 12 aos dados experimentais foi conseguido utilizando-se um valor de 100 M^{-1} para K_{HM} . Este valor foi obtido por iteração da eq.

3.1.4.2 - Efeito de SDP na tiólise de NPO

A constante de velocidade de pseudo-primeira ordem de tiólise de NPO por HM aumenta com a concentração de SDP chegando a um valor máximo em 4.10^{-3} M de detergente (fig.13). - Acima dessa concentração a constante de velocidade diminui até alcançar um patamar (fig.14)

A equação 13 descreve os dados experimentais quando se utiliza os seguintes parâmetros:

$$K_{HM} = 870 \text{ M}^{-1}, \quad K_{HM}^{\sim} = 100 \text{ M}^{-1}, \quad \text{CMC} = 2.10^{-3} \text{ M}, \\ \bar{V} = 0.25 \text{ l/M}^{-1} \text{ (volume molar idêntico ao utilizado para SDS).}$$

Da mesma forma que para o SDS, utilizamos três valores para K_s (constante de distribuição do NPO). Os resultados obtidos para k_2^m foram os seguintes: para $K_s = 1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $k_2^m/k_2^o = 1$

$$K_s = 7500 \text{ M}^{-1}, \quad k_2^m/k_2^o = 1.2$$

$$K_s = 5000 \text{ M}^{-1}, \quad k_2^m/k_2^o = 1.3$$

Portanto, ocorre uma pequena variação da relação k_2^m/k_2^o quando K_s varia entre 1.5×10^4 e $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Fig.13 - Efeito da concentração de SDP na reação de tiólise de NPO e HM

A reação foi estudada em tampão borato 0.02M, pH 10.15. A concentração de NPO em todos os experimentos era $4 \cdot 10^{-6}$ M e a de HM era $5.7 \cdot 10^{-5}$ M. A curva é teórica (vide texto).

3.1.5 - Efeito de Brij-35 na tiólise de NPO por HM

O efeito da concentração de Brij-35 sobre a constante de tiólise observada de NPO por HM foi estudado numa pequena faixa de concentração de detergente (fig.14)

A forma da curva é idêntica às obtidas com CTAB e SDP e o fator máximo de aceleração obtido (em 4 mM de detergente) foi 26. Neste sistema a relação k_2^m/k_2^o não foi calculada.

3.1.6 - Efeito de Detergentes na tiólise de Ésteres

Os fatores de aceleração ou inibição e as relações k_2^m/k_2^o calculados a partir de dados das figuras 11, 13 e 14 são mostrados na tabela 4.

TABELA 4 - Efeito de SDS, SDP e Brij-35 na tiólise de NPO

Detergente	pH	conc. de detergente (M)	k_o (seg ⁻¹)	k_ψ (seg ⁻¹)	k_ψ/k_o	k_2^m/k_2^o
SDS	11.1	0.1	$4.29 \cdot 10^{-3}$	$6.21 \cdot 10^{-5}$ ^a	0.0145	0.085
SDP	10.15	$4 \cdot 10^{-3}$	$3.76 \cdot 10^{-4}$	$1.031 \cdot 10^{-1}$ ^b	266	1
Brij-35	10.2	$4 \cdot 10^{-3}$	$3.76 \cdot 10^{-4}$	$9.67 \cdot 10^{-3}$ ^c	26	-

a - k_ψ corresponde à menor constante de velocidade observada

b - k_ψ corresponde à constante de velocidade máxima observada

c - k_ψ corresponde à constante de velocidade máxima observada

Fig.14 - Efeito da concentração de Brij-35 na reação de tiólise de NPO e IM.

A reação foi estudada em tampão borato 0.02M, pH 10.2. A concentração de NPO era $4 \cdot 10^{-6}$ M e a de HM $5.7 \cdot 10^{-5}$ M.

Os resultados da tabela 4 mostram que a reação de tiólise de NPO por HM é acelerada por SDP e Brij.35. Em presença de SDS, entretanto, a reação é inibida e o valor de k_2^m é cerca de 12 vezes menor que k_2^o .

Os resultados obtidos para a tiólise de NPA e NPO em presença de detergentes (Tabelas 2-4) (Figs.12,13,14) podem ser resumidos da forma seguinte:

- 1) O efeito de CTAB sobre o pK_{ap} da HM e sobre a constante de velocidade observada para as reações de HM com NPA e NPO está de acordo com os efeitos previstos pela teoria de Troca-Iônica (Quina e Chaimovich, 1979).
- 2) O CTAB aumenta a velocidade de tiólise das reações de NPA e NPO com HM por um fator máximo de 7×10^3 e 8×10^4 , respectivamente.

O fator de aceleração ($k_{\psi m \max}/k_o$), para ambas as reações, diminui com o aumento da concentração do ânion (não reativo) do tampão.

O valor de k_2^m é praticamente igual a k_2^o na reação de NPO e HM em presença de CTAB. Para a reação de HM e NPA o valor de k_2^m é 4 vezes maior que k_2^o .

- 3) A reação de tiólise de NPO por HM é acelerada (no máximo) 270 vezes por SDP e inibida 70 vezes por SDS (a uma concentração de 0,1 M de detergente).

Em SDP a relação k_2^m/k_2^O para a reação de tiólise de NPO por HM é igual a 1, enquanto que, em SDS, k_2^m é 12 vezes menor que k_2^O .

Os efeitos de SDS e SDP sobre o pK_a de HM e sobre as constantes de velocidade observada de pseudo-primeira ordem da tiólise de NPO por HM são analisáveis através do modelo de pseudo-fase (Yatsimirski, Martinek e Berezin, 1971).

3.2 - Tiólise de Ésteres em Interfaces provenientes de agregados de Herquat

3.2.1 - Algumas Características Físicas das Preparações de Herquat

Os agregados formados por Herquat foram analisados em solução aquosa medindo-se a capacidade de reterem substratos hidrofóbicos e hidrofílicos em diversas condições de preparação. Desde que existem dados que sugerem que a natureza destes - agregados é vesicular (Kunitake e col, 1977; Deguchi e Mino, 1978, Kano e col., 1979), passamos a denominá-los, rotineiramente, de vesículas.

3.2.1.1 - Preparação de vesículas de Herquat em água

As vesículas foram preparadas injetando-se uma solução etanólica do anfifílico (Batzri e Korn, 1973) em água contendo (^{14}C) glicose (2.2.7.2.2). Uma alíquota desta solução foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-25 e eluída com água. A

concentração de cloreto e a radioatividade foram determinadas em cada fração, como descrito em Métodos (2.2.1 e 2.2.9) (fig.15).

Na figura 15 observam-se dois picos de radioatividade, o primeiro coincidindo com o volume vazio da coluna (V_0) e o segundo com o volume interno da coluna (V_i). Na mesma figura observa-se que o pico de cloreto está sobreposto ao primeiro pico de radioatividade. Pode-se concluir, portanto, que as vesículas de Herquat são eluidas no V_0 da coluna de Sephadex já que o cloreto (que é o único ânion em solução e que deve acompanhar a saída de vesículas) é eluído neste volume (fig.15). Desde que uma parte da radioatividade acompanha o pico de cloreto, pode-se concluir que (1) as vesículas incorporam (e/ou adsorvem) (^{14}C -) glicose; (2) o segundo pico de (^{14}C -) glicose corresponde ao marcador livre. A porcentagem de glicose no primeiro pico é 8% e a recuperação total de cloreto é 84%.

Um controle de adsorção de glicose foi feito - preparando-se as vesículas em água e adicionando-se, posteriormente, (^{14}C -) glicose. Uma alíquota desta solução foi eluída em Sephadex G-25. A filtração de uma alíquota desta preparação em Sephadex G-25 forneceu um padrão de cloreto e radioatividade comparável ao obtido anteriormente (figura 15). A adsorção de glicose (1º pico) ao Herquat foi aproximadamente 3.5%. Portanto, a incorporação máxima de Herquat em água (fig.15) (em 0,01 M de anfifílico) é de 4.5%. A refiltração da alíquota de Herquat eluída no V_0 da coluna não libera (^{14}C -) glicose.

Fig.15 - Filtração em gel de vesículas de Herquat preparadas em água

As vesículas foram preparadas em água contendo (¹⁴C)glicose e eluídas com água em Sephadex G-25 (24x0.82cm). O volume da alíquota filtrada era 0.5 ml de uma solução 0.01M de Herquat, o fluxo da coluna era de 4.8 ml/hora e o volume de cada fração recolhida foi de 0.6 ml.

- perfil de eluição de cloreto
- perfil de eluição de (¹⁴C)glicose

As vesículas de Herquat foram, também, preparadas por sonicação com o objetivo de verificarmos se havia diferenças significativas nas características de incorporação das vesículas quando preparada por este método. Assim, as vesículas foram preparadas em água contendo (^{14}C) glicose (Métodos) e uma alíquota desta amostra aplicada a uma coluna de Sephadex G-25. - Os perfis de eluição de cloreto e radioatividade da amostra preparada por este método foram idênticos aos da fig.15. Elegemos o método de injeção para a preparação de vesículas já que este procedimento é mais rápido que o de sonicação e evita-se a contaminação da amostra por titânio, proveniente da sonda do sonicador. A desvantagem da preparação de Herquat feita por injeção, quando comparada com as vesículas preparadas por sonicação, é que a solução final contém uma porcentagem de solvente razoavelmente alta (5%). Veremos, posteriormente, que os resultados cinéticos obtidos utilizando esta preparação são pouco afetados pelo etanol proveniente da preparação da amostra.

3.2.1.2 - Preparação das vesículas de Herquat - em tampão Borato

As vesículas de Herquat foram preparadas em tampão borax/borato 0,01 M pH 7.6 e estudou-se (1) incorporação de (^{14}C) glicose, (2) estabilidade frente à re filtração, (3) incorporação de substratos hidrofóbicos (PBM), (4) aceleração da reação de tiólise de NPA por HM e (5) perfil de eluição de cloreto (Fig.16).

Fig.16 - Filtração em gel de vesículas de Herquat preparadas em tampão borato 9.10 M, pH 7.6

A coluna de Sephadex G-25 (22,5x0.8cm) foi mantida com fluxo de 4.8 ml/hora. A alíquota eluída foi de 0.25 ml de uma solução de Herquat 0.01M. O volume recolhido de cada fração era 0.72 ml.

A - Perfil de eluição de vesículas de Herquat preparadas em presença de (^{14}C)glicose; B - Refiltração de 0.5 ml da amostra eluída no V_0 da coluna anterior; C - Fluorescência relativa de vesículas preparadas com PBM; D - Efeito da alíquota das colunas na velocidade de tiólise de NPA; E - Perfil de eluição do cloreto.

Na figura 16 aparecem os resultados de filtração de alíquotas de Herquat preparadas em diversas condições. Na figura 16A as vesículas (preparadas em presença de (^{14}C) glicose) são eluídas no V_0 retendo 8,8% do marcador radioativo. A re-filtração de uma alíquota das vesículas eluídas no V_0 (fig. 16B) mostra que praticamente não ocorre liberação da glicose incorporada. Para verificarmos quanto da glicose retida nas vesículas é adsorvida na face externa dos agregados, preparamos uma amostra de Herquat adicionando-se o marcador após a preparação das vesículas. Obteve-se uma adsorção de 5% de glicose podendo-se concluir, portanto, que 3,8% de glicose incorporada no experimento da figura 16B é retida no compartimento interno das vesículas.

A incorporação do marcador fluorescente (PBM) pelas vesículas de Herquat é evidenciada pelo fato de que a fluorescência desse composto coincidir com o V_0 da coluna de Sephadex (Fig. 16C).

O gráfico D da figura 16 mostra que a reação de NPA e HM é acelerada pelas frações que saem próximas ao V_0 da coluna (onde são eluídas as vesículas) e que, nas demais frações, a reação não ocorre a uma velocidade detectável (2.2.10). Por último, o pico de eluição de cloreto (figura 16E) aparece bastante alargado e deslocado do V_0 da coluna sugerindo um deslocamento do cloreto pelo ânion do tampão durante a eluição das vesículas. Para testarmos esta possibilidade, as vesículas de

Herquat foram preparadas em tampão borato 0,01M, pH 9.1 onde a concentração de ânion do tampão é maior do que a pH 7.6. A preparação foi feita injetando-se Herquat em tampão borato 0,01M , pH 9.1, contendo (^{14}C) glicose e uma alíquota desta solução foi eluída em Sephadex G-25 (Fig. 17).

O pico de cloreto (Fig.17) é largo, assimétrico e seu máximo não coincide com o do primeiro pico de radioatividade proveniente da (^{14}C) glicose retida pelas vesículas de Herquat (fig.17). Comparando-se os perfis de eluição de cloreto das figuras 16 e 17, pode-se concluir que o aumento da concentração do íon borato conduz a um maior deslocamento de cloreto pelo borato nas vesículas de Herquat.

3.2.1.3 - Preparação das vesículas de Herquat em tampão acetato 5mM, pH 5.35

A cinética de tiólise de NPO e HM foi estudada em tampão acetato (veja adiante) e efetuamos uma caracterização preliminar das vesículas preparadas neste tampão. O objetivo desta análise foi verificar a relação de substratos hidrofílicos pelas vesículas, deslocamento de cloreto pelo íon acetato e estabilidade das vesículas em altas concentrações de HM.

O perfil de eluição de radioatividade em Sephadex G-25 de vesículas de Herquat preparadas em tampão acetato 5mM, pH 5.3 e (^{14}C) glicose apresenta um pico coincidente com o V_0 e outro (correspondendo à glicose livre) com o V_i da colu

Fig.17 - Filtração em gel de vesículas de Herquat preparadas em tampão borato 0,01M, pH 9.1. Uma alíquota de 0.25 ml de uma solução 0,01M preparada em presença de (¹⁴C)glicose foi eluída em uma coluna de 21,2x0.81cm. com fluxo de 4,8 ml/hora. Coletaram-se frações de 0.5 ml.

- perfil de eluição de cloreto
- perfil de (¹⁴C)glicose

na (fig.18). A % de glicose no primeiro pico é de 1.6%. Cerca de 0,84% dessa incorporação é devida a adsorção de glicose na face externa. A incorporação de glicose na região interna da vesícula, portanto, é da ordem de 0,8%.

O perfil de cloreto dessa amostra, entretanto, aparece inteiramente deslocado coincidindo com o V_1 da coluna. Dos perfis de cloreto e radioatividade apresentados na fig.18, pode-se concluir que, em tampão acetato, as vesículas de Herquat ainda incorporam glicose e que o íon acetato desloca completamente o Cl^- nas condições utilizadas para a filtração.

A integridade das vesículas de Herquat em presença de HM foi testada da seguinte maneira: tomaram-se 0,4 ml das frações eluidas no V_0 da coluna de Sephadex G-25 (entre 5 e 7 ml, fig.18) e adicionou-se à solução 0,013ml de HM 0,073M (concentração final de HM = $1.2 \cdot 10^{-3}\text{M}$), o que corresponde a 60% da concentração de Herquat no mesmo volume (a concentração de Herquat foi calculada através do cloreto total eluido da coluna, radioatividade das frações próximas do V_0 e volume total de eluição das vesículas). Uma alíquota da solução contendo Herquat e 60% de HM foi refiltrada medindo-se a radioatividade das frações eluidas da coluna de Sephadex G-25 (Fig.18).

O perfil de radioatividade obtido após refiltração da amostra apresentou um único pico (coincidindo com o V_0). Isto mostra que a adição de 60% de HM a uma solução contendo vesículas de Herquat ainda mantém suas características de retenção de glicose.

Fig.18 - Filtração em gel de vesículas preparadas em tampão acetato 5mM, pH 5.3. A coluna de Sephadex G-25 (23x0.8cm) foi eluída com um fluxo de 9.6 ml/hora e coletaram-se frações de 0.7 ml. As vesículas foram preparadas em presença de (¹⁴C)glicose e eluídas em tampão acetato 0.005 M, pH 5.3.

O perfil de (¹⁴C)glicose; ● perfil de cloreto; □ refiltração de uma alíquota de 0,5 ml das frações recolhidas no V₀ da coluna após adição de HM (ver texto). Mediu-se a radioatividade de cada fração.

Após o conhecimento de algumas das características dos agregados de Herquat, no que diz respeito a incorporação de substratos, troca de íons e integridade em presença de altas concentrações de substratos, passamos ao estudo do efeito desses agregados sobre o pKap da HM e tiólise de ésteres.

3.2.2 - Efeito de Herquat no pKap de HM

As vesículas de Herquat utilizadas no estudo do pKap da HM foram preparadas por injeção usando as soluções seguintes: tampão tris/HCl 0.02M pH 9.1, tampão borato 0.01M pH 9.05 e tampão tris/Acetato 0.04M pH 9.05.

O estudo do efeito da concentração de Herquat - no pKap da HM nos diversos tampões acima descritos nos forneceu dados sobre efeito de íons no equilíbrio de dissociação da HM - que foram utilizados posteriormente nos estudos cinéticos.

Na Figura 19, observa-se o efeito da concentração de Herquat no pKap da mercaptana determinado em tampão tris/HCl e tampão borato.

Na curva obtida em tampão tris/HCl o pKap da HM diminui com o aumento da concentração de Herquat, chega a um valor mínimo aumentando pouco significativamente em altas concentrações de Herquat.

Em vesículas preparadas em presença de tampão borato observa-se um mínimo claro na curva de pKap vs Herquat e um aumento no pKap a concentrações de maiores que 2mM de anfifílico.

Fig. 19 - Efeito da concentração de Herquat no pKap da HM.

○ vesículas preparadas em tampão tris/HCl 0.02M, pH 9.1

● vesículas preparadas em tampão borato 0.01M, pH 9.3

A concentração de HM nestes experimentos era $5 \cdot 10^{-5} M$

As curvas são teóricas (vide texto)

Os dados da figura 20 (pKap vs Herquat) foram obtidos com vesículas preparadas em tampão tris/Acetato 0.02 e 0.04M. As formas das duas curvas são semelhantes porém o pKap mínimo da curva determinada em tris/Ac 0.04M é maior do que o obtido em tris/Ac 0.02M.

A forma das curvas de pKap vs Herquat (Figuras 19 e 20) é semelhante à curva de pKap de HM em função da concentração de CTAB (fig.4). Mais ainda, a forma das curvas é do tipo previsto pela teoria de Troca Iônica (Quina e Chaimovich, - 1979). Já que os resultados anteriores de filtração em gel (3.2.1.2 e 3.2.1.3) mostraram que os íons presentes em solução são trocáveis com o contraíon das vesículas (Cl^-) fizemos a análise quantitativa das curvas das figuras 19 e 20 através do modelo de Troca Iônica.

As curvas de pKap em função de Herquat foram analisadas através das equações 20, 31, 32 e 33.

As dificuldades da análise desse sistema consiste no fato de que os valores dos parâmetros necessários para o ajuste da eq. 20 aos dados experimentais não são conhecidos para estas vesículas. Uma maneira de se contornar este problema é utilizar os mesmos parâmetros de constantes de associação (K_{HM}) determinados para CTAB e o valor de $K_{\text{OH/Cl}}$ e α determinado para TTACl.

A primeira tentativa de ajuste da eq.20 aos dados experimentais foi feita utilizando-se a curva de pKap em tris/HCl. Este sistema é mais simples que os outros porque o

Fig.20 - Efeito da concentração de Herquat no pKap da HM

○ vesículas preparadas em tampão tris/AC 0.02M, pH 9.05

● vesículas preparadas em tampão tris/AC 0.04M, pH 9.05

As curvas são teóricas (vide texto).

ânion, do tampão é o mesmo que o contraíon do Herquat. Os parâmetros utilizados para o ajuste da eq. 20 aos dados experimentais foram:

$$K_{OH}/Cl = 0.16 \text{ (Bonilha e col., 1979)}$$

$$K_{HM} = 3700 \text{ M}^{-1} \text{ (determinado para CTAB)}$$

$$\alpha = 0.15 \text{ (Romsted, 1975)}$$

$$K_a = 1.99 \cdot 10^{-11} \text{ M}$$

O valor de K_A/Cl (constante de troca entre o ânion da mercaptana e o cloreto) foi iterado através das equações 20, 38, 39 e 40 e o valor que melhor ajustou aos dados experimentais à curva teórica foi $K_{A/Cl} = 110$. O ajuste teórico obtido com estes parâmetros foi muito bom e, por isso, passamos a analisar as outras curvas de pKap vs Herquat. Como a maioria dos parâmetros já foram fixados com o ajuste da curva em tris/HCl, as outras curvas teóricas foram obtidas iterando-se apenas o valor de $K_{OH/B}$ para tampão borato e $K_{OH/AC}$ para acetato. Os resultados obtidos foram $K_{OH/B} = 2$ (bastante próximo do valor 2.25 obtido - para $K_{OH/B}$ em CTAB) e $K_{OH/AC} = 0.85$.

Conhecendo-se o efeito do Herquat no pKap de HM, tendo sido estabelecidos o modelo que descreve o sistema e fixados a maior parte dos parâmetros necessários para a análise dos resultados cinéticos, passamos ao estudo da reação de tíolise de NPA e NPO por HM em presença destas vesículas.

3.2,3 - Efeito de Herquat na tiólise de NPA por HM

O efeito de Herquat na reação de tiólise de NPA por HM foi estudado em tampão borax/borato 0.01 M pH 7.6 (fig.21).

O gráfico de k_{ψ} em função da concentração de Herquat mostra que o aumento na concentração de vesículas conduz a um aumento em k_{ψ} até se alcançar um máximo em torno de $5 \cdot 10^{-4}$ M de Herquat. Acima desta concentração, k_{ψ} diminui com o aumento da concentração de vesículas. Desde que as vesículas forma preparadas por injeção de uma solução etanólica de Herquat em tampão, a porcentagem de solvente varia com a concentração do anfifílico, - chegando a um valor máximo de 5% em 0.01M de Herquat. A fim de verificarmos se o etanol afeta significativamente a velocidade de tiólise em Herquat realizamos o seguinte protocolo experimental.

As vesículas foram preparadas em tampão borax/borato 0.01M pH 7.6 por injeção e a solução foi concentrada sob pressão de N_2 num sistema de concentração da Amicon até que o volume da solução fosse reduzido a 1/10 do original. Adicionou-se tampão à amostra concentrada de modo a restabelecer o volume original e procedeu-se à determinação de k_{ψ} em função da concentração de Herquat. Os pontos experimentais obtidos desta forma coincidem com os obtidos em presença de etanol.

A reação de NPA e HM em tampão borax/borato 0.01 M pH 7.6 em concentrações variáveis de Herquat foi analisada quantitativamente através das equações 30, 31, 32 e 33. Os parâmetros utilizados neste ajuste foram: $K_a = 1.99 \cdot 10^{-11} M$, $\alpha = 0.15$,

Fig.21 ~ Efeito de Herquat na reação de tiólise de NPA em tampão borax/borato 0.01M, pH 7,6

Utilizou-se uma concentração de NPA de $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ e de HM $5.52 \cdot 10^{-5} \text{M}$,

A curva é teórica (vide texto).

$K_{OH/B} = 2$, $K_{A/Cl} = 110$, $K_{HM} = 3700 \text{ M}^{-1}$, $k_2^O = 30 \text{ seg}^{-1}$ e $K_s = 150$ (constante de associação de NPA). O valor de k_2^m foi iterado e o melhor ajuste da equação 30 aos dados experimentais foi obtido utilizando-se um valor de $k_2^m/k_2^O = 1$.

A reação de NPA e HM foi estudada também em função de pH na presença de concentrações variáveis de Herquat (Fig.22). O estudo foi realizado em tampão tris/HCl porque em tampão borax/borato, na presença de Herquat, a reação era rápida demais para ser acompanhada em nossos aparelhos. O aumento da concentração de cloreto provocou uma diminuição da velocidade da reação de tiólise de tal ordem que nos foi possível estudar o efeito de pH sobre a reação.

As curvas de tiólise de NPA obtidas a vários pHs (Fig.22) mostram que o aumento da concentração de Herquat - leva a um aumento de k_ψ até se alcançar um máximo, após o que a constante de velocidade observada diminui com o aumento da concentração de anfifílico. A análise destes resultados foi feita através das equações 30, 38, 39 e 40 utilizando-se os seguintes parâmetros: $\alpha = 0,15$, $K_{HM} = 3700 \text{ M}^{-1}$, $K_{OH/Cl} = 0.16$, $k_2^O = 30 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $K_a = 1.99 \cdot 10^{-11} \text{ M}$, $\bar{V} = 0,37 \text{ l.M}^{-1}$. O valor de k_2^m foi iterado até se obter o melhor ajuste teórico aos dados experimentais.

Os fatores de aceleração máximos obtidos - $(k_{\psi\text{máx}}/k_O)$ e as relações k_2^m/k_2^O a vários pHs aparecem na tabela 5

Fig.22 - Efeito da concentração de Herquat na reação de tiólise de NPA

A concentração de NPA era $5 \cdot 10^{-6}$ M e a de HM $5 \cdot 10^{-5}$ M. Utilizou-se tampão tris/HCl 0.02M em todos os ensaios.

□ pH 7.7; ■ pH 8.25; ● pH 8.5; ○ pH 8.7

TABELA 5: Efeito de Herquat na tiólise de NPA

tampão	pH	Herquat (M)x10 ⁴	k _ψ ^{máx} (seg ⁻¹)x10 ⁶	k _o (seg ⁻¹)x10 ⁶	k _ψ ^{máx} /k _o	k ₂ ^m /k ₂ ^o
Borax/Borato 0.01M	7,6	5	6,6	1,24	53200	1,1
tris/HCl 0.02M	7,7	6,2	0,36	1,5	2420	5,3
tris/HCl 0.02M	8,25	7,9	2,28	5,3	4300	5,3
tris/HCl 0.02M	8,5	10,0	5,8	9,4	6170	5,3
tris/HCl 0.02M	8,7	8,5	12,8	14,8	8650	5,3

Observa-se na tabela 5 que para as reações em tris/HCl, quanto maior o pH maior o fator de aceleração da reação de tiólise de NPA por HM. A relação k_2^m/k_2^o , em tampão tris/HCl independe de pH e tem um valor de 5.3. Em tampão borax/borato, entretanto, a relação k_2^m/k_2^o é da ordem de 1.

Utilizando os dados da figura 22 construímos um gráfico de $\log k_\psi$ vs pH utilizando os valores de k_ψ obtidos a uma única concentração de Herquat (1.10^{-3} M). (Fig.23).

O gráfico da fig. 23 mostra uma dependência linear entre $\log k_\psi$ e pH obtendo-se uma inclinação de 1.6.

Estudamos, em seguida, o efeito de Herquat na tiólise de NPO por HM a fim de verificar o efeito do aumento da cadeia hidrofóbica do substrato na velocidade de reação.

Fig.23 - Efeito de pH em $\log k_{\psi}$ na presença de CTAB.

○ Reação de NPO e HM em 1.10^{-4} M de Herquat (dados obtidos da fig. 24)

● Reação de NPA e HM em 1.10^{-4} M de Herquat (dados obtidos da fig. 23)

3.2.4 - Efeito de Herquat na tiólise de NPO por HM

A adição de Herquat na reação de HM com NPO produz um aumento de velocidade de uma magnitude tal que a reação só pode ser estudada usando espectrofotometro convencional a pHs menores que 5,3. Todas as reações foram feitas em tampão acetato 5mM.

A tiólise de NPO por HM foi estudada a vários - pHs em função da concentração de Herquat (fig.24).

As curvas da fig. 24 mostram que o aumento da concentração de Herquat leva a um aumento em k_{ψ} até se alcançar um valor máximo (em todos os pHs). A partir deste valor ocorre uma diminuição de k_{ψ} com o aumento da concentração de Herquat.

Os resultados do estudo desta reação em presença de Herquat foram analisados segundo as eq. 30, 31, 32 e 33. Para o ajuste da equação teórica aos dados experimentais variamos os valores de k_2^m e K_s . Os valores dos demais parâmetros haviam sido previamente fixados quando do estudo do pKap de HM em tris/Ac e tris/HCl. As curvas teóricas da fig. 24 foram obtidas utilizando-se os seguintes parâmetros: $\alpha = 0,15$ (ver pKap de HM em tris/HCl), $K_{OH}/Cl = 0,16$ (Bonilha e col.), $K_{OH}/Ac = 0.08$ (pKap de HM em tris/Ac), $K_{HM} = 3700 \text{ M}^{-1}$ (determinado para CTAB), $\bar{v} = 0,37 \text{ l}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ (para CTAB), $K_a = 1.99.10^{-1}$, $k_o = 30 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ e $K_s = 4.10^4 \text{ M}^{-1}$. O valor da relação k_2^m/k_2^o que melhor ajusta a eq. 30 aos dados experimentais é da ordem de 13. O aumento do valor de K_s acima de 4.10^4 M^{-1} não afeta a forma da curva de

Fig. 24 - Efeito de Herquat na reação de tiólise de NPO,

A concentração de NPO em todos os experimentos era $4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ e a de HM $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Os ensaios foram feitos em tampão acetato 0.005M .

$\triangle$ pH 4; $\blacksquare$ pH 4.6; $\square$ pH 5.0; $\bullet$ pH 5.35; $\circ$ pH 5.6

Todas as curvas são teóricas (vide texto).

k_ψ vs Herquat e nem o valor da relação k_2^m/k_2^o . Os fatores de aceleração obtidos neste sistema bem como as relações k_2^m/k_2^o a cada pH aparecem na tabela 6.

TABELA 6

pH	Herquat (M).10 ⁵	$k_{\psi\text{m}\bar{\text{a}}\text{x}}$ (seg ⁻¹).x10 ³	k_o (seg ⁻¹).x10 ⁹	$k_{\psi\text{m}\bar{\text{a}}\text{x}}/k_o$	k_2^m/k_2^o
4	2.3	2.3	0.299	$7.68.10^6$	10
4.35	6	3.89	0.67	$5.8.10^6$	13.5
4.6	5.45	4.7	1.19	$3.94.10^6$	13.5
5.0	4.74	7.98	3	$2.66.10^6$	13.5
5.35	8.3	18.4	6.7	$2.75.10^6$	16
5.6	10	27	11.9	$2.27.10^6$	14.5

Observa-se nesta tabela que o aumento de pH leva a uma diminuição da relação $k_{\psi\text{m}\bar{\text{a}}\text{x}}/k_o$. O valor da relação k_2^m/k_2^o varia muito pouco com pH mantendo-se por volta de 13.

Utilizando os dados da fig. 24 fizemos um gráfico de $\log k_\psi$ vs pH a uma única concentração de Herquat (1.10^{-4} M) que aparece na figura 23. A inclinação da reta obtida de k_ψ vs pH é 0.75.

Uma comparação entre os resultados obtidos do estudo de k_{ψ} vs Herquat na tiólise de NPA e do estudo de tiólise de NPO mostra que esta última tem uma constante de segunda ordem em presença de vesículas (k_2^m) muito maior que k_2^o . Pensamos então que se o substrato fosse injetado junto com Herquat e se distribuem entre as camadas interna e externa da vesícula poderíamos eventualmente identificar duas velocidades de reação referentes às duas faces da bicamada.

O experimento foi feito com um substrato mais hidrofóbico que o NPO, o tetradecanoato de p-nitrofenila (TPA) a fim de assegurarmos a completa associação do substrato com as vesículas.

3.2.5 - Reação de TPA e HM em vesículas de Herquat

As vesículas de Herquat ($7 \cdot 10^{-4} M$) contendo substrato (TPA, $5 \cdot 10^{-6} M$) (ver Métodos) foram termostatizadas a $30^{\circ}C$ e adicionou-se ao meio de reação $20 \mu l$ de HM $9.5 \cdot 10^{-3} M$ (concentração final de $6.3 \cdot 10^{-5} M$). A reação seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem até 5 meias-vidas.

Estudamos em seguida a tiólise de um substrato carregado negativamente (DTNB) supondo que, pelo fato deste substrato ter carga oposta à do Herquat ele não pudesse se deslocar através da membrana da vesícula.

As vesículas injetadas com DTNB em tampão acetato 5mM pH 4.85 (ver Métodos) ($0.01 M$ Herquat e $1.25 \cdot 10^{-5} M$ DTNB) -

foram termostatzadas a 30°C e a reação iniciada com a adição de HM (concentração final $5.4.10^{-5}$ M). A reação, seguida a 412 nm, - mostrou uma liberação rápida de p-nitrofenol seguida por uma reação mais lenta.

Repetimos os experimentos com as vesículas de Herquat preparada com TPA e DTNB utilizando como nucleófilo a glutatona (GSH) (que possui carga negativa a pHs maiores que 2).

Observamos que tanto a reação de GSH com TPA - (tampão Acetato 5mM, pH 5.3) quanto a reação com DTNB (tampão - formato 5mM, pH 3.2) apresentam uma cinética de pseudo-primeira ordem.

3.3 - Efeito de SDS na hidrólise de 2-Feniliminotetrahidrofuran (FI)

3.3.1 - Efeito de SDS na reação de hidrólise de FI

A reação de hidrólise de FI tem como passo limitante o ataque da água à forma protonada do substrato numa extensa faixa de pH (2 a 6) (Schmir e Cunningham, 1965). Esta característica torna a reação de hidrólise de FI um excelente modelo para o estudo de atividade da água e força iônica em micelas.

Esta reação foi estudada em presença de um detergente negativo (SDS) desde que o SDS deve se ligar fortemente ao FI protonado (forma negativa) e os efeitos do detergente sobre a reação podem ser observados com clareza.

Desde que a reação de FI é afetada por pH (Schmir e Cunningham, 1965), fizemos um estudo inicial de efeito de pH em fase aquosa na presença de uma concentração fixa de SDS com o objetivo de verificarmos se o comportamento da reação - frente a pH é alterado em presença do detergente.

A curva que relaciona k_{ψ} com pH (fig.25) não muda de forma quando se adiciona SDS ao meio de reação. A hidrólise de FI em fase aquosa tem uma constante de velocidade máxima entre pH 2 e 4. Acima de pH 4 k_{ψ} diminui e alcança um novo patamar acima de pH 8 (fig.25, Schmir e Cunningham, 1965). O valor do pH onde k_{ψ} , em fase aquosa, alcança a metade da velocidade máxima é 5.09 enquanto que, na presença de SDS (0.02M), o valor correspondente é 6.4. Estes valores de pH correspondem ao pK do FI em fase aquosa (pK = 5.09, Schmir e Cunningham (1965), pK = 5.06) e ao pK_{ap} do composto em presença de SDS.

A análise quantitativa deste sistema foi feita com base na Teoria de Troca Iônica (Quina e Chaimovich, 1979) e mostraremos em seguida, os esquemas teóricos utilizados na análise desta reação em particular.

Na reação de hidrólise de FI, onde a forma reativa do substrato é protonada, faz-se necessário considerar os seguintes equilíbrios quando a reação se processa em presença - de micelas de SDS:

Fig. 25 - Efeito de pH na hidrólise de FI.

Utilizou-se uma concentração de $2.7 \cdot 10^{-5}$ M de substrato. A pH 2 as reações foram estudadas em HCl, entre pH 2.4 e 3 utilizou-se tampão glicina 0,02M, tampão acetato 0,02M foi utilizado na faixa de pH 3,6 a 5,5 e acima deste pH, utilizou-se tampão fosfato.

○ hidrólise de FI na fase aquosa

● hidrólise de FI em 0,02M de SDS

$$A_f \xrightleftharpoons{K_a} A_b \quad ; \quad K_a = \frac{A_b}{A_f \cdot C_D} \quad (42)$$

$$HA_f + Y_b \xrightleftharpoons{K_{AH/Y}} HA_b + Y_f \quad ; \quad K_{AH/Y} = \frac{HA_b \cdot Y_f}{HA_f \cdot Y_b} \quad (43)$$

$$H_f + Y_b \xrightleftharpoons{K_{H/Y}} H_b + Y_f \quad ; \quad K_{H/Y} = \frac{H_b \cdot Y_f}{H_f \cdot Y_b} \quad (44)$$

$$HA_b \xrightleftharpoons{K_2} H_b + A_b \quad ; \quad K_2 = \frac{H_b \cdot A_b}{HA_b \cdot C_D} \quad (45)$$

onde HA_f é a concentração analítica de FI protonado em fase aquosa

HA_b é a concentração analítica de FI protonado em fase aquosa ligada à micela

A_f é a concentração analítica da forma neutra do FI em fase aquosa

A_b é a concentração analítica da forma neutra do FI em fase micelar

H_f é a concentração analítica de H^+ em fase aquosa

H_b é a concentração analítica em fase micelar

Y_f é a concentração analítica de Na^+ em fase aquosa

Y_b é a concentração analítica de Na^+ em fase micelar

À semelhança do sistema descrito em resultados 3.1, definimos pK_{ap} como o pH onde a seguinte igualdade é satisfeita:

$$A_f + A_b = HA_f + HA_b \quad (46)$$

A partir das equações 41, 42, 43, 44, 45 e 46 , chegamos à equação 47:

$$K_{ap} = H_f = K_a \frac{(1+K_A C_D)}{(1+K_{A/Y} \frac{Y_b}{Y_f})} \quad (47)$$

onde K_{ap} é a constante de dissociação aparente do substrato.

A equação 47 descreve o comportamento do pK_{ap} de um substrato positivo, cuja base conjugada é neutra, em função da concentração de um detergente negativo.

O sistema de reação do FI em presença de SDS pode ser representado pelo esquema 6

Esquema 6

onde S^+ é a concentração de substrato reativo

M é a concentração de micelas

k_o e k_m as constantes de velocidade em fase aquosa e micelar

P é a concentração de produtos

A equação que descreve o efeito de detergente - na constante de velocidade observada de primeira ordem para o esquema 6, foi deduzida a partir dos equilíbrios 41, 42, 43, 44, 45 e das

equações abaixo:

$$k_{\psi} = k^o \frac{AH_f}{AT} + k^m \frac{AH_b}{AT} \quad (48)$$

onde k^o e k^m , são as constantes de primeira ordem na fase aquosa e micelar

$$AT = A_b + A_f + AH_b + AH_f \quad (49)$$

onde AT é a concentração total de substrato

A equação final que descreve o comportamento de k_{ψ} em função de C_D é dada por:

$$k_{\psi} = \frac{k^o + k^m \cdot K_{A/Y} \cdot (Y_b/Y_f)}{K_a (1 + K_{AH} C_D) (1/H^+ + 1/Kap)} \quad (50)$$

Os valores de Y_b e Y_f são calculados através - das seguintes equações:

$$Y_b = (1 - \alpha) C_D - H_b \quad (51)$$

$$Y_f = \alpha C_D + CMC + H_b + Na_T \quad (52)$$

onde Na_T é a concentração de sódio adicionado através do tampão

$$e \quad H_b = \frac{-(A_2 + Na_T) + \sqrt{(A_2 + Na_T)^2 + 4 K_{H/Na} H_f C_D (1 - \alpha)}}{2} \quad (53)$$

Utilizando as equações 50, 51, 52 e 53, podemos analisar quantitativamente os resultados da figura 25. O ajuste

da equação aos dados experimentais, entretanto, só foi possível conhecendo-se os valores de $K_{AH/Y}$, K_{AH} . Utilizamos para K_{AH} , o valor da constante de associação da anilina ao SDS ($K_a = 21 \text{ M}^{-1}$, Martinek e col., 1973) devido à semelhança deste composto com a forma neutra do FI. O valor de $K_{AH/Y}$ foi calculado através da equação 47 utilizando-se dos valores de K_a e K_{ap} obtidos com os dados da figura 25 (em 0.02 M de SDS). O valor obtido para $K_{AH/Y}$ foi de 55. Os resultados da figura 25 foram analisados - através da equação 50 e os valores que permitiram o melhor ajuste da curva teórica aos dados experimentais foram: $\text{CMC} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K_{H/Na} = 1.2$; $\alpha = 0,218$ (Romsted, 1975); $K_{AH/Y} = 55$; $k^0 = 0,46 \text{ min}^{-1}$; $\text{pK}_a = 5.09$. Os valores da relação k^m/k^0 , que permitiram o melhor ajuste da curva teórica aos dados experimentais aparece na tabela 7. O valor de $K_{H/Na}$ foi calculado através de dados de Bunton, Ohmenzetter e Sepulveda (1977).

TABELA 7: Efeito de pH na relação k^m/k^0 da reação de hidrólise de FI em SDS.

pH	k^m/k^0
3.0	1.125
4.0	1.125
4.7	1.125
5.25	1.03
5.6	0.90
6.1	0.92
7.5	0.92
7.8	0.92

O valor da relação k^m/k^o diminui pouco com o aumento de pH.

O efeito da concentração de SDS sobre a constante de primeira ordem de FI foi estudado em vários pHs e os resultados obtidos aparecem nas figuras 26 e 27.

O aumento da concentração do detergente nos quatro pHs estudados, leva a um aumento de k_ψ até se alcançar um valor constante.

Os dados das figuras 26 e 27 foram analisados - segundo a equação 50 e as curvas teóricas foram obtidas variando-se a relação k^m/k^o . Os valores dos parâmetros utilizados para a análise teórica destes dados foram os mesmos utilizados para análise dos dados da Fig.25. O melhor ajuste aos dados experimentais foi obtido utilizando-se as relações k^m/k^o da tabela 6.

A análise teórica dos resultados mostram que o SDS altera muito pouco a constante de velocidade de primeira ordem na fase micelar entre pH 4 e 6.1.

Fizemos também um estudo de efeito da concentração de NaCl e metilsulfato de sódio na constante de hidrólise de FI a pH 2.5 e 5 (Fig.28) a fim de pesquisar o efeito do aumento de força iônica nesta reação em fase aquosa.

Observa-se que o aumento de força iônica provoca uma diminuição em k_ψ e que a pH 2.5 o efeito é mais pronunciado do que a pH 5. A constante de velocidade de primeira ordem diminui até 2,5 vezes a pH 2,5 em 3M NaCl e cerca de 1,4 vezes em 3M de sal a pH 5.0.

Fig. 26 - Efeito da concentração de SDS na hidrólise de FI

A concentração de FI nestes experimentos era $2.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$

● tampão acetato 0.02M, pH 4,7

○ tampão acetato 0.02M, pH 5.6

As curvas são teóricas (vide texto)

Fig. 27 - Efeito da concentração de SDS na hidrólise de FI.

A concentração de FI nestes experimentos era $2.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$

- tampão fosfato 0.02M, pH 6.1
- tampão acetato 0.02M, pH 5.25

Fig.28 - Efeito de força iônica na hidrólise de FI

- tampão acetato 0.02M, pH 5 (Utilizando-se NaCl)
- tampão glicina 0.02M, pH 2.45 (Utilizando-se NaCl)
- tampão glicina 0.02M, pH 2.45 (Utilizando-se Metil Sulfato de sódio)

O efeito de força iônica também foi estudado em presença de 0.02M de SDS (Fig.29).

Observa-se que, em presença de SDS, k_ψ diminui acentuadamente com o aumento da força iônica.

Estudamos também neste sistema, o efeito de acet^onit^otrila sobre a hidrôlise de FI tampão glicina 0.02M pH 2.5. - Os resultados mostraram que k_ψ aumenta por um fator de 10% com a adição de 16% do solvente ao meio de reação.

3.3.2 - Efeito de SDS na relação de produtos de hidrôlⁱse do FI.

A relação de produtos da hidrôlise de FI é de^opendente do pH. A pHs menores que 5 forma-se 100% de anilina (A) e butirolactona e a pHs maiores, a % de γ hidroxibutiranilida au^omenta chegando a 100% acima de pH 9 (Fig.30 e Schmir e Cunn^oingham, 1965). O efeito de pH na % de formação de anilina foi estudado também em 0.02 M de SDS (Fig.30).

Em fase aquosa, a % de anilina chega a 50% a pH 7.0, enquanto que em presença de 0,02M de SDS essa porcentagem é alcançada a pH 7.9.

Estes dois valores de pH correspondem a um pK_a do intermediário neutro formado na hidrôlise de FI (Schmir e Cunn^oingham, 1965) e é dado por $\frac{K_3 k_9}{k_3}$ onde K_3 é a constante de dissociação do intermediário e k_3 e k_9 são as constantes de velocidade de formação da anilina e butirolactona respectivamente. Em

Fig.29 - Efeito da concentração de NaCl sobre a hidrólise de FI em presença de SDS.

A reação foi realizada em tampão Acetato 0.02M, pH 5 em presença de 0.02M de SDS.

Fig.30 - Efeito de pH na formação de anilina.

Utilizou-se uma concentração final de FI de $2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$
 Entre pH 6.2 e 7.2 utilizou-se tampão imidazol $6,25 \cdot 10^{-4} \text{M}$
 e acima de pH 7.2 utilizou-se tampão tris/HCl $0,0125 \text{M}$

○ % de anilina formada em fase aquosa

● % de anilina formada em presença de $0,02 \text{M}$ de SDS

As curvas são teóricas (vide texto)

presença de SDS, o pKap está, ainda, afetado pela distribuição do intermediário entre as fases aquosa e micelar.

Os resultados da fig.30 foram analisados através da equação 54, proposta por Schmir e Cunningham, (1965) que relaciona a % de anilina formada com o Kap do intermediário - neutro e o pH no qual a reação se processa

$$\%A = \frac{H^+}{H^+ + Kap} \times 100 \quad (54)$$

Os ajustes teóricos dos dados experimentais - da fig.30 foram obtidos utilizando-se um pKap de 7.0 para a reação em fase aquosa e 7.9 para a reação em presença de SDS.

4. DISCUSSÃO

4.1 - Efeito de Micelas na tiólise de Ésteres

O efeito de sais sobre reações em fase micelar tem sido um dos problemas mais intrigantes no campo. Estas reações podem ser aceleradas ou inibidas pela adição de sais e a magnitude do efeito depende da natureza dos ions adicionados, sua concentração e da reação em estudo. Exemplo clássico é o efeito de ânions na reação de descarboxilação do 6-nitrobenziso^xazol-3-carboxilato (NBC) em presença de CTAB (Bunton, Minch e Sepulveda, 1971; Bunton, Kamego e Minch, 1972). Na presença de micelas positivas esta reação é acelerada pela adição de concentrações baixas de ânions de compostos aromáticos e, a concentrações mais altas destes sais, observa-se uma inibição acentuada da reação. A adição de concentrações altas de ânions inorgânicos ao meio de reação leva a um aumento de velocidade.

O efeito de íons, nesta reação é, sem dúvida complexo, e as causas desses efeitos ainda não são claras. Sabe-se, entretanto, que em fase aquosa a reação praticamente não é afetada por força iônica mas é acelerada cerca de 1.10^8 vezes em solventes polares apróticos (Kemp e Paulo, 1975). Assim, o efeito de ânions orgânicos na descarboxilação do NBC e CTAB pode ser separado em duas contribuições. A adição de pequenas quantidades de ânions aromáticos pode levar a um empacotamento da micela, com saída de água e, possivelmente, uma mudança da constante dielétrica da pseudo-fase. Esta mudança no microambiente poderia

explicar a ativação a baixas concentrações destes compostos. Dados de Larsen e Magid (1974) mostram claramente que sais como tosilato de sódio em CTAB, numa relação (CTAB/sal) maior que 1:1, provocam um aumento muito grande na viscosidade da solução e sugerem que, nesta condição, haja uma mudança de carga da pseudo-fase. Portanto, com o aumento da concentração de ânions aromáticos na solução micelar, a reação de NBC deve ser, necessariamente, inibida já que o substrato (que tem carga negativa) praticamente não se liga à micela. A aceleração obtida com a adição de ânions inorgânicos nesta reação pode ser devida aos mesmos fatores que modificam a reação com ânions aromáticos. Porém, os efeitos, de menor intensidade, são observados apenas em concentrações muito altas de sais.

De modo geral, o efeito de sais em reações é mais previsível do que no exemplo anterior. Reações onde o nucleófilo é um íon pequeno e de carga oposta à micela são geralmente inibidas por força iônica. Este efeito é observável, por exemplo, em reações de hidrólise alcalina de ésteres em presença de CTAB (Romsted, Dunlap e Cordes, 1967; Romsted, 1975; Funasaki, 1979). Nestas reações, o aumento de força iônica leva a um deslocamento de hidróxido da superfície positiva pelo ânion de sal adicionado. Em consequência disto, obtém-se inibição da reação,

A hidrólise alcalina de cianopiridínios (CP) é inibida por SDS porque a concentração de hidróxido na superfície negativa da micela é menor do que em fase aquosa (Politi e col., dados não publicados). A adição de cloreto de sódio ao meio

de reação conduz a um aumento da constante de velocidade devido a troca do H^+ da superfície da micela pelo Na^+ . Esta diminuição de H^+ na pseudo-fase leva, necessariamente, a um aumento na concentração de hidróxido na superfície. A consequência direta deste fenômeno de troca (Na^+/H^+) é o aumento na velocidade de hidrólise de CP na pseudo-fase.

O efeito de sais é observado também no equilíbrio ácido-base de indicadores e nucleófilos em fase micelar. Heitmann(1968) mostrou que CTAB produz uma diminuição do pK_{ap} de nucleófilos derivados de cisteína. O aumento da força iônica na presença de micelas, entretanto, leva a um aumento do pK_{ap} destes compostos. Este mesmo efeito foi observado no estudo do pK_{ap} de benzimidazol (Mittal, 1977) e Azul de Bromotimol em CTAB (Funasaki, 1979). Em todos os equilíbrios mencionados, a diminuição da concentração de hidróxido da superfície causado pela troca OH/Cl ou OH/Br na micela deve levar a um aumento no pK_{ap} .

Outras interpretações, entretanto, são possíveis. A análise do efeito de sais tanto em equilíbrio como na velocidade de reações em fase micelar tem sido feita, também, - através do modelo de pseudo-fase (Berezim, Martinek e Yatsimirski, 1973). Segundo este modelo o efeito de detergente sobre o pK_{ap} de um nucleófilo pode ser descrito por uma equação que relaciona o pK_{ap} com as constantes de distribuição das duas formas do nucleófilo e concentração de detergentes. (equação 12).

A adição de sais ao meio causa uma diminuição na "constante (aparente Quina e Chaimovich, 1979) de associação" da forma carregada (de carga oposta à da micela) e isto leva a um aumento no pK_{ap}. Segundo este modelo, uma análise correta de uma curva de pK_{ap} vs C_D só pode ser feita determinando-se o valor da "constante" de distribuição da forma carregada a cada concentração de detergente e força iônica (Mittal, 1977).

A análise do efeito de sais em equilíbrio - de corantes proposta por Mukerjee e Banerjee (1962), utilizada por Fernandez e Fronherz (1977) e, mais recentemente, por Funasaki (1979), relaciona o pK_{ap} com o potencial superficial da micela (ψ_0) e o pKⁱ (pK do indicador na interface micelar) segundo a equação (55)

$$\text{pK}_{\text{ap}} = \text{pK}_i - F\psi_0/2,30.RT \quad (55)$$

Quando $\psi_0 = 0$ (numa micela neutra)

$$\text{pK}_{\text{ap}} = \text{pK}_i$$

O valor de ψ_0 é relacionado com a concentração de contra-íon $(B_i)_f$ livre segundo a equação 56

$$\psi_0 = 2,30.RT (-\alpha \log \sum_i (B_i)_f + \log \gamma) / F \quad (56)$$

onde $\alpha = 1$ e γ é uma função da densidade de carga da superfície, temperatura e constante dielétrica (Funasaki, 1979).

O valor de k_ψ é determinado através das medidas de pK_{ap} em micelas neutras e carregadas e, portanto, não existe nenhum dado obtido independentemente que indique se a equação utilizada é correta. Além disso, na equação que relaciona ψ_0 com a concentração de contra-íon livre não existe nenhum termo em que a natureza do contra-íon seja levada em conta. Entretanto, os próprios dados de Fernandez e Fronherz mostram que ψ_0 , calculado através da equação 56, varia muito com a natureza do íon adicionado. Além disso, este tipo de análise não prevê a obtenção de um mínimo na curva de pK_{ap} vs C_D como aquele obtido em nossos resultados.

Existem, por outro lado, evidências diretas de que os íons adicionados a soluções micelares, trocam com os contra-íons da pseudo-fase e a eficiência de troca depende da natureza do íon.

Larsen e Magid (1976) mediram a ligação de íons a micelas de CTAB e mostraram que ânions de compostos aromáticos, como o tosilato, tem grande afinidade por micelas de CTAB e deslocam completamente o brometo da superfície da pseudo-fase quando numa relação de 1:1. Ânions inorgânicos também trocam com brometo com eficiências variáveis. Além disso, para os íons inorgânicos o valor de $(1 - \alpha)$ praticamente não varia com a concentração de sal confirmando a hipótese de Stigter (1964) e a análise feita por Romsted (1975) de dados de literatura.

Apesar do grande número de informações exis

tentes a respeito do efeito de micelas em equilíbrio de indicadores não se encontrou na literatura a descrição de um fenômeno si milar ao do efeito de CTAB no pKap da HM (resultados). O pKap da HM diminui com o aumento da concentração de CTAB até alcançar um valor mínimo. A partir deste valor o pKap aumenta com a con centração de detergente chegando a ultrapassar o valor de pK da mercaptana em fase aquosa. Note-se que para sistemas análogos, como por exemplo benzimidazol em presença de CTAB, observa-se - apenas uma diminuição do pKap com o aumento da concentração de detergente ao invés do mínimo observado em nosso sistema (Mittal 1977). O efeito de CTAB no pKap do Azul de bromotimol também é incomum, observando-se que o pKap do corante aumenta com a con centração de detergente. O valor do pK do azul de bromotimol (AB) na fase aquosa, entretanto, é muito maior que em CTAB (Funasaki, 1979). Assim, se o pKap deste corante fosse determinado a baixas concentrações de detergente, observaríamos, seguramente, um míni mo comparável aos nossos resultados.

Tanto os nossos resultados de pKap de HM quanto os dados de pKap do benzimidazol e azul de bromotimol em função da concentração de CTAB são analisáveis através do formalismo do modelo de Troca Iônica (equação 20)

$$pKap = pK_a \frac{1 + K_{A/Br} (Br_b/Br_f)}{1 + K_{HM} C_D} \quad (20)$$

O efeito de CTAB no pKap da HM foi analisado teoricamente através da eq. 20 utilizando-se valores experimentais de K_{HM} e $K_{A/Br}$ (embora este último dado tenha sido tomado da curva experimental como uma primeira estimativa). Neste caso, embora o valor de K_{HM} seja maior que $K_{A/Br}$, o valor de (Br_b/Br_f) a pequenas concentrações de CTAB, é grande e o pKap diminui com a concentração de detergente. Quando a relação $K_{A/Br} (Br_b/Br_f)$ se torna menor que $K_{HM} C_D$ (a concentrações de CTAB mais altas), ocorre um aumento do valor de pKap. Assim, fica claro que a obtenção de um mínimo na curva de pKap vs C_D depende não só da faixa de concentração de detergente utilizada mas dos valores absolutos da constante de distribuição da forma neutra e da constante de troca.

A curva teórica obtida através da eq. 20 para os dados de pKap vs C_D de HM em CTAB depende criticamente do valor de K_{HM} . A determinação de K_{HM} (através de medidas de solubilidade) é difícil de ser realizada porque experimentos de solubilização são muito demorados (são necessários alguns dias para se estabelecer o equilíbrio) e a mercaptana é oxidada com facilidade durante as etapas necessárias para a determinação de sua concentração (ver métodos). Isso conduz a um erro significativo no valor absoluto de K_{HM} .

A região de baixa concentração de detergente na curva de pKap vs C_D também é crítica já que pequenos erros na concentração de detergente levam a um desvio muito grande de pKap.

Assim, a curva teórica, nesta faixa de concentração, não descreve perfeitamente os dados experimentais. Contudo, a análise teórica feita, utilizando-se os valores experimentais de K_{HM} e $K_{A/Br}$ é válida já que, apesar da superposição da curva teórica aos dados experimentais não ser perfeita, é a melhor descrição causal e quantitativa dos dados experimentais.

O efeito de CTAB no pKap do benzimidazol também é descrito adequadamente pela teoria de troca Iônica. Sabe-se que o valor da constante de associação da forma neutra do benzimidazol (K_{IM}) é muito pequena (da ordem de $40M^{-1}$) (Mittal, 1977). Portanto, para que o valor de $K_{IM}(Br_b/B_f)$ se torne menor que $K_{IM} C_D$, a concentração de detergente deve ser muito alta e este valor não chega a ser atingido.

A análise teórica do efeito de CTAB no pKap da HM trouxe informações que nos permitiram ter uma idéia mais completa sobre os fenômenos que ocorrem na superfície de uma micela quando a concentração da pseudo-fase é alterada.

Observamos inicialmente que a curva teórica utilizando a eq. 20 só descrevia corretamente os dados experimentais quando se incluía no cálculo de Br_b e Br_f a concentração de borato ligado à micela. Portanto, a concentração e natureza dos íons na superfície da micela é função da composição iônica da fase aquosa e das constantes de troca relativas dos ions presentes.

Outra informação, que não é óbvia à primeira

vista, é que a concentração de hidróxido na superfície da micela diminui com o aumento da concentração de CTAB (mesmo na presença de tampão). Com o aumento da concentração de micelas, a concentração de hidróxido ligado (X_b) aumenta até chegar a um valor constante (Quina e Chaimovich, 1979). Entretanto, a concentração local de hidróxido ligado à pseudo-fase ($\bar{X}_b$) diminui com o aumento de C_D (eq. 57)

$$\bar{X}_b = \frac{X_b}{C_D V} \quad X_b = \text{constante a pH alto} \quad (57)$$

A diminuição de $\bar{X}_b$ é um dos fatores responsáveis pelo aumento do pK_{ap} com o aumento da concentração de micelas. Este fenômeno foi demonstrado diretamente num estudo posterior da hidrólise alcalina de ésteres e alquilcianopiridínios em CTAB na presença de tampão (Quina e col., 1980).

Desde que o pK_{ap} de nucleófilos em CTAB, como foi exposto acima, é afetado pela ligação de ânions do tampão e de sais presentes na fase aquosa, pode-se concluir que o pK_{ap} determinado experimentalmente na presença de CTAB só pode ser utilizado para a análise dos resultados cinéticos se estes forem obtidos no mesmo pH e força iônica em que o pK_{ap} foi determinado. Isto pode ser verificado nas equações 31, 32 e 33 onde são calculadas as concentrações de Br_b , Br_f e OH_b . A concentração de cada um destes elementos na superfície da micela depende da concentração de sais no meio de ensaio e da ligação do ânion do tampão

ã pseudo-fase. Portanto, quando se determina o pKap de um composto em presença de tampão, o valor preditivo daquele termo para um outro pH é condicionado pela igualdade de força iônica nesse outro pH. Por isso, embora os valores de pKap em função de CTAB tenham sido determinados experimentalmente, estes dados não podem ser utilizados diretamente para o cálculo da concentração de HM⁻ a um outro pH. Isto é feito calculando-se o pKap a partir das equações 31, 32 e 33 que incluem a concentração de tampão, sal e OH⁻ nas condições de estudos cinéticos. Apesar da imprecisão do método utilizado para as determinações de pKap (feitas a um único pH) este é ainda mais adequado que o método de titulação utilizado rotineiramente em determinações de pK. Isto se deve ao fato de que a composição iônica do meio varia durante a titulação do composto. Os valores de pK determinados por este método são utilizáveis quando as medidas são realizadas a concen-trações altas de sais e detergentes e quando a concentração de -substrato é baixa.

Uma outra consequência da aplicação da teoria de troca iônica para a determinação de pKap em CTAB é que as constantes de associação de HM, constantes de troca ($K_{A/Br}$ e dissociação em fase aquosa (K_a) podem ser relacionadas com a cons-tante de associação aparente na fase micelar K_2 através da seguinte equação (58)

$$\frac{K_a \cdot K_{A/Br}}{K_{OH/Y} \cdot K_2 \cdot K_w} = K_{HA} \quad \text{onde } K_2 = \frac{K_m}{\bar{V}} \quad (58)$$

K_m = constante de associação da HM na fase micelar

$$\bar{V} = 0,37 \text{ l/M}$$

Substituindo-se os termos da equação (58) pelos valores determinados experimentalmente tem-se que $K_2 = 503,37$ e $K_m = 186.2 \text{ M}^{-1}$

O valor da constante de dissociação da HM na fase micelar K^M é dado por $K_m \cdot K_w^m$ e o valor de pK^M (pK da HM na fase micelar) pode ser calculado através da equação

$$pK^M = - \log K_m K_w^m = 11.73$$

onde K_w^m é o produto iônico da água na fase micelar e é considerado igual a 1.10^{-14}

O pK_{ap} da mercaptana na fase micelar é cerca de uma unidade maior que na fase aquosa e este resultado é compatível com uma constante dielétrica baixa na fase micelar (Fernandez e Fromherz, 1977) e com o efeito de solvente sobre o pK da HM (ver Resultados). Além disso, o valor de pK_m se aproxima do pK_{ap} da mercaptana em concentrações altas de SDP o que sugere - que, neste detergente, o efeito de pK_{ap} é devido unicamente a efeito de constante dielétrica.

Portanto, o efeito de CTAB no pK_{ap} da mercaptana é devido aos fenômenos de concentração de íons na pseudo-fase, distribuição das duas formas da HM entre a fase aquosa e micelar e mudança do pK da mercaptana na pseudo-fase. A somatória dos efeitos de concentração de reagentes e efeito do meio sobre

o pK_m leva à obtenção do efeito complexo de CTAB no pK_{ap} da HM observado nos resultados,

O aumento do pK_{ap} da HM em função da concentração de SDP era previsível com base na hipótese de que o sítio na micela onde o substrato é solubilizado tem uma constante dielétrica menor que a da água. Os resultados de pK_{ap} da HM vs C_D foram analisados através do modelo de pseudo-fase segundo o qual o efeito no pK_{ap} do substrato é devido à solubilização diferencial das duas formas da HM em SDP. Para que esta análise seja possível há necessidade de se obter o valor da constante de associação das formas neutra e negativa da HM. Os valores de K_{SH} e K_S^- não foram determinados por métodos independentes. Utilizou-se o mesmo valor de K_{SH} obtido em SDS para a análise de pK_{ap} vs C_D em SDP. Embora não tenhamos certeza que o valor de K_{SH} nos dois detergentes sejam idênticos, esta suposição é aceitável pois sabe-se que a constante de distribuição de substratos neutros está relacionada com o número de carbonos da cadeia hidrofóbica do detergente (Fendler e Fendler, 1975) e ambos os anfifílicos utilizados possuem uma cadeia de 12 carbonos.

Assim, o resultado da análise teórica dos dados de pK_{ap} vs SDP através do modelo de Berezin mostrou que a solubilidade da forma neutra é maior do que da forma negativa e que esta diferença conduz a um aumento no pK_{ap} da HM. A utilização do modelo de pseudo-fase neste sistema é válida porque este detergente é formalmente neutro e, portanto, o seu grau de dis

sociação (α) é zero.

Não sabemos se a concentração de OH na superfície deste detergente é maior ou menor que na fase aquosa ou se existe uma compensação de efeitos entre uma menor constante dielétrica e um aumento da concentração local de hidróxido. Não possuímos, entretanto, dados que nos permitam verificar este ponto e, somente um estudo cuidadoso de efeito de sais neste sistema - pode levar a um esclarecimento sobre a questão.

O efeito de SDS no pK_a de HM também foi analisado através do modelo de pseudo-fase. Apesar do ajuste da curva teórica aos dados experimentais ser muito bom, sabemos que este sistema não está analisado corretamente.

Alguns resultados de nosso laboratório (Politi, dados não publicados) mostram que reações onde o nucleófilo é o hidróxido são inibidos por SDS. A adição de NaCl ao sistema de reação leva a uma aceleração da hidrólise alcalina de cianopiridínicos em micelas negativas (Politi, dados não publicados). Uma análise qualitativa deste sistema indica que a adição de Na⁺ ao meio de reação contendo SDS leva a um deslocamento de H⁺ da superfície da pseudo-fase. Este fenômeno já foi demonstrado por Bunton, Romsted e Smith (1968) no estudo de rearranjos benzidínicos em meio ácido na presença de SDS. Se o próton da superfície da micela for substituído por sódio, para que o produto iônico da água na fase micelar seja mantido deve aumentar a concentração de OH⁻ na pseudo-fase.

Embora a forma negativa da HM se associe muito pouco com o SDS, com o aumento da concentração do detergente haveria um aumento na concentração de Na^+ livre e isto levaria a uma diminuição relativa no pK_{ap} da HM na micela a concentrações altas de SDS.

Os resultados do estudo da variação do pK_{ap} com (SDS) mostram, entretanto, apenas um aumento de pK_{ap} com a concentração de detergente. Provavelmente a diminuição de pK prevista a altas concentrações de SDS não ocorre porque este experimento foi feito em concentração inicial alta de sódio (0.06M). Na máxima concentração de SDS utilizado (0.1M), a concentração total de Na^+ é da ordem de 0.08M. Esta concentração não é suficiente - mente diferente da concentração inicial para que se observe uma diminuição significativa no pK_{ap} do SDS. Portanto, a análise deste sistema pelo modelo de pseudo-fase é adequada somente por que o experimento foi realizado a altas concentrações de sal. O tratamento correto deste sistema, que está sendo desenvolvido em - nosso laboratório, deverá, portanto, ser feito através do modelo de troca Iônica.

A ligação de ânions (de tampão borato) na superfície de micelas de CTAB pode ser verificada através da análise teórica dos resultados que relacionam pK_{ap} com (CTAB). Estes efeitos já haviam sido previstos e observou-se de forma nítida, no estudo da reação de tiólise, que a presença de sais pode alterar de forma dramática a velocidade de reações em fase micelar.

O CTAB acelera a reação de tiólise de NPA por HM por um fator máximo de 6.10^3 em tampão borax/borato pH 7.7 enquanto que a reação de HM e NPO é acelerada por um fator máximo de 8.10^4 . Esta diferença nos fatores de aceleração das duas reações é devida às diferenças nos valores das constantes de associação dos dois ésteres ao CTAB.

A constante de associação do NPA ao CTAB é 54 M^{-1} e, portanto, a concentração de detergente necessária para a incorporação total deste substrato é relativamente grande (veja eq 6). O fator de aceleração máximo é obtido quando as curvas de incorporação de NPA, hidróxido e mercaptana se cruzam. Isto ocorre a uma concentração de detergente da ordem de 2.10^{-3} M . Por outro lado, a constante de incorporação do NPO é da ordem de $1.5.10^4$ e, portanto, este substrato está totalmente incorporado a concentrações muito baixas de detergente. Nesta condição, o efeito de concentração de NPO, HM e hidróxido numa fase muito pequena leva a um aumento no fator de aceleração. Nossos dados experimentais não mostram um máximo de aceleração como na reação de NPA e HM. Consequentemente, uma variação no valor de K_s para NPO não altera os valores dos parâmetros utilizados para o cálculo da curva teórica nas concentrações de detergente utilizados em nossos experimentos.

As duas reações foram estudadas em vários pHs. Observou-se que a reação de NPO e HM é acelerada por fatores muito altos em tampão borax/borato pH 7.6 e em tris/Br pH 8.9. Estes

efeitos são atribuídos à pequena ligação de borato à micela em pH baixo e, em tris/HCl, a uma diminuição da concentração de cloreto com o aumento de pH.

Na reação de NPA e HM na presença de CTAB observa-se que, em tampão borax/borato, o aumento de pH conduz a um aumento da relação $k_{\psi_{\max}}/k_o$. Isto pode ser atribuído a um pequeno aumento na concentração de hidróxido na fase micelar com o aumento de pH.

Em tampão borato (acima de pH 8.3) o aumento de pH leva a uma diminuição da relação $k_{\psi_{\max}}/k_o$. Este efeito é devido ao aumento da concentração do ânion do tampão que provoca um deslocamento de hidróxido da superfície da micela. A eficiência deste ânion no deslocamento de hidróxido é muito menor do que a do cloreto. Por isto, na reação de NPO e HM, estudado em tampão tris/HCl, observa-se que a relação $k_{\psi_{\max}}/k_o$ aumenta com a diminuição de pH já que a concentração de cloreto diminui a pHs altos conduzindo a obtenção de uma inclinação excepcionalmente alta da curva de $\log k_{\psi}$ vs pH da reação de NPO e HM (1.56).

Estes resultados só podem ser interpretados em termos de uma troca de íons entre as fases aquosa e micelar que depende da natureza dos íons.

Ambas as reações foram analisadas teoricamente segundo o formalismo da teoria de troca iônica. Obtivemos curvas teóricas a todos os pHs estudados utilizando-se k_m como único parâmetro ajustável.

Os resultados da análise indicaram que a reação de NPA e HM na fase micelar tem um k_2^m da ordem de 4 vezes maior que k_2^o , enquanto que a reação de NPO e HM tem um $k_2^m = k_2^o$. Entretanto, como os dados obtidos com a reação não catalizada indicavam que uma menor constante dielétrica aumenta a constante de velocidade de tiólise, esperávamos que k_2^m/k_2^o fosse maior para a reação de HM com NPO que deve ser solubilizado numa região mais hidrofóbica da micela que o NPA. Embora aparentemente contraditório, este efeito já foi observado em outras reações. Na reação de ariloximas com ésteres de p-nitrofenol observou-se que o aumento do comprimento da cadeia do éster diminui a relação k_2^m/k_2^o podendo-se obter valores menores que 1 (Mittal, - 1977). Este efeito pode ser devido a uma solubilização dos substratos em regiões distintas da micela. O sítio de solubilização, para cada substrato, vai depender do balanço entre o caráter hidrofóbico e hidrofílico dos compostos. Assim, quando os dois substratos reagentes são solubilizados no mesmo sítio, como no caso do NPO e HM, já que os dois possuem cadeia alifática de 7 carbonos, deveríamos esperar um efeito maior do meio micelar sobre o valor de k_2^m do que na reação de NPA e HM.

O motivo desta aparente inversão de resultados pode ser devido à utilização de um único valor de $\bar{V}$ para as duas reações. Como o NPA é um substrato menos hidrofóbico que o NPO, o primeiro deve se localizar preferencialmente na superfície da micela de CTAB. Assim, o volume onde ocorre a reação na -

fase micelar deve ser menor do que para a reação de HM e NPO (que podem se distribuir no volume micelar total). Pode-se observar na equação 22 que se o valor de $\bar{V}$ for menor do que aquele utilizado ($0,37 \text{ M}^{-1} \text{ l}^{-1}$) o valor de k_m^2 vai diminuir proporcionalmente já que a relação $k_m^2/\bar{V}$ tem que ser mantida. Assim, a aparente aceleração da reação no meio micelar pode ser devida à utilização de um valor superestimado de $\bar{V}$. Apesar da racionalização feita, não temos, no momento, como corrigir o volume a ser utilizado na análise quantitativa destes dados. Apesar disso, pode-se observar que o efeito da micela em k_m^2 tem um papel muito pequeno no fator de aceleração obtido (principalmente para a reação com NPO).

Portanto, reações de tiólise podem ser aceleradas por fatores de 6.10^3 e 7.10^4 em interface positivas e esta aceleração é devida, na sua quase totalidade, à concentração de substratos hidrofóbicos na fase micelar, concentração de hidróxido e desvios no pK_a do nucleófilo. O efeito da interface, em k_2^m , neste caso, é desprezível.

A reação de NPO e HM em presença de SDP é acelerada por um fator de 270 vezes. Note-se que neste caso, o efeito do detergente sobre o pK_a de HM é desfavorável já que, com o aumento do pK_a, diminui a concentração de nucleófilo disponível para a reação. Ainda assim, em condições em que a concentração de detergente é pequena (4.10^{-3} M) a superposição das curvas de distribuição de NPO e HM⁻ conduzem à aceleração da reação.

Este efeito, analisado através do modelo de pseudo-fase, pode ser atribuído unicamente à concentração dos dois reagentes na fase micelar. Note-se que, ainda neste caso, o valor de k_2^m é igual a k_2^o . Embora o valor de K_s para NPO em SDP não tenha sido determinado, observou-se que uma variação em K_s de 5000 a $1.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ não altera significativamente o valor de k_m ou a forma da curva de k_ψ vs C_D . Mesmo para valores de K_s da ordem de $5 \cdot 10^3$ a associação de NPO é quase completa já a baixas concentrações de detergente. Assim, o fator de aceleração máximo e a curva de k_ψ vs C_D deixa de ser afetado por este termo e passa a ser sensível a distribuição de HM.

O efeito de SDS na reação de tiólise de NPO, só pode ser discutido de forma qualitativa já que a análise feita através do modelo de pseudo-fase não descreve de forma correta este sistema. A inibição observada, entretanto, pode ser claramente atribuída a um aumento no pK_a e a uma concentração muito pequena de reagentes na fase micelar pois a forma reativa de HM tem carga idêntica à da micela. O tratamento matemático utilizado levou ao cálculo de um k_2^m cerca de 12 vezes menor que k_2^o . O valor de k_2^m , entretanto, está afetado pelo fato de não ter sido levado em conta a concentração de hidróxido na superfície da micela. Assim, o valor obtido para k_2^m é uma somatória dos efeitos da constante dielétrica e da concentração de hidróxido sobre a reação.

Existe um grande número de estados de reações

bimoleculares em fase micelar (Fendler e Fendler, 1975). Algumas destas reações são aceleradas ou inibidas por ordem de magnitude em presença de micelas (Berezin, Martinek e Yatsimirski, 1973). Sabe-se atualmente que os fatores que mais contribuem para as acelerações observadas são a concentração de reagentes na pseudo-fase e efeito da pseudo-fase sobre pK de nucleófilos. Entretanto, a micela pode alterar a velocidade da reação por efeito de microambiente sobre a reatividade. Para que este efeito seja conhecido, há necessidade de se fazer uma análise quantitativa do sistema de reação na pseudo-fase para separar a contribuição dos demais fatores sobre a velocidade de reação. - Em muito poucos sistemas isto foi feito e em alguns estudos, o tratamento utilizado é incorreto (Martinek e col., 1973; Quina e col., 1980). Desta forma, apesar de existirem numerosos estudos sobre reações em fase micelar, de modo geral não existem dados experimentais suficientes que permitam uma análise quantitativa adequada. Assim, o efeito real do meio micelar sobre a constante de velocidade dessas reações não pode ser determinado nesses trabalhos.

Nas poucas reações bimoleculares analisadas (Yatsimirski, Martinek, Berezin, 1971; Martinek e col, 1975; Yatsimirski, Martinek e Berezin, 1971; Cuccovia e col, 1977; Quina e col, 1978) observou-se que o meio micelar praticamente não altera a constante de segunda ordem (k_2^m) dessas reações. A mudança máxima em k_2^m observada em fase micelar é da ordem de 10 para a reação de m-bromobenzaldoxima e p-nitrofenil carboxilatos

(Berezin, Martinek e Yatsimirski, 1973). Para reações de hidrólise alcalina de NPA, entretanto, a relação k_2^m/k_2^o é 0,37 e para a hidrólise de NPO a relação é 0,29 (Quina e col., 1980). Mesmo para reações extremamente sensíveis a efeito de solventes, como a descarboxilação do 6-nitro-3 carboxibenzisoxazol, o meio altera o k_m por um fator de 100 vezes, enquanto que esta reação em alguns solventes apróticos, chega a ser acelerada por fatores de 1.10^8 com relação à reação em fase aquosa. Assim, aparentemente, o meio micelar afeta muito pouco a constante de velocidade mesmo para reações extremamente sensíveis às variações do meio. A reatividade de nucleófilos, embora o número de dados seja muito pequeno, parece ser igualmente pouco afetada. Os resultados de nossos estudos de tiólise em detergentes mostram que, pelo menos para grupos SH a reatividade praticamente não muda na pseudo-fase. - Apesar disto, o efeito acelerados de CTAB é extremamente alto levando-se em conta simplicidade da estrutura do monômero do detergente quando comparada com uma enzima. Portanto, a formação de micelas permite a criação de um microambiente carregado - capaz de acelerar, por ordens de magnitude, a velocidade de reações.

4.2 - Efeito de Herquat na tiólise de ésteres

O estudo de agregados de sais de dimetildialquilamônios foi iniciado há poucos anos e as características físicas destes agregados ainda não são claras. Mesmo a sua natureza vesicular ainda está em discussão já que os dados de microscopia não são confiáveis (Deguchi e Mino, 1978; Kano e col, 1979). Em nossos estudos com estes compostos verificamos que estes agregados são mais estáveis que as micelas já que, por filtração e refiltração em gel, o agregado não perde sua estrutura.

Os resultados de incorporação de compostos - hidrofílicos não foram conclusivos em estabelecer a existência - de um compartimento aquoso interno nesses agregados. Mesmo para a incorporação de glicose, a adsorção externa é extremamente alta e não podemos saber se o restante da glicose está incorporado num interior aquoso ou não.

Nossos resultados de filtração em gel mostram, entretanto, que as estruturas formadas por Herquat, em diversas condições experimentais, são capazes de reter substratos hidrofóbicos e hidrofílicos. Sua estrutura (vesicular ou não) é mantida durante a refiltração da amostra e tais estruturas são responsáveis pelo efeito sobre a velocidade de reações. Observou-se também que mesmo após a adição de cerca de 60% de HM ao meio de reação o Herquat continua na forma de agregados. Não podemos saber, entretanto, se a estrutura destes agregados está ou não al

terada.

A primeira indicação de que os agregados de Herquat podem ter seus contraíons trocados pelos íons presentes em solução foi obtida através da filtração em gel de vesículas - preparadas em diversos tampões. Observou-se que o íon acetato - desloca o cloreto com uma eficiência muito maior que a do íon borato. Estes resultados indicaram que a análise de dados cinéticos obtidos em presença de Herquat deveria ser feita através de um modelo de troca iônica similar ao aplicado à micelas.

Para a análise dos resultados de cinética, entantanto, defrontamo-nos com o problema da possível existência de um compartimento aquoso interno nos agregados de Herquat. A complexidade da análise decorre, nessas vesículas, da existência de uma bicamada cujas superfícies estão voltadas para ambiente aquoso cuja composição e características podem ser diferentes. Uma primeira tentativa de análise dos resultados cinéticos foi supor que, com ou sem compartimento aquoso, os substratos adicionados ao meio contendo Herquat tem acessibilidade (rápida) ao meio - aquoso externo. Os resultados obtidos através da utilização do modelo de troca iônica para Herquat mostraram que se a suposição acima não é correta, os nossos dados, pelo menos, não são suficientemente precisos para que uma análise mais complexa do sistema seja necessária.

O estudo do efeito de Herquat no pK_a da HM (utilizando-se vesículas preparadas em diversos tampões) mostram

que o comportamento destes agregados quanto à troca de ions é bastante semelhante à de micelas positivas, já que as curvas de pK_{ap} vs Herquat são parecidas, quanto à forma, às de pK_{ap} vs CTAB.

Um dos problemas fundamentais da utilização do modelo de troca para a análise dos dados de pK_{ap} é que este - modelo parte do fato de que α , para micelas, é praticamente constante com o aumento da concentração de detergente e força iônica. Não temos base experimental alguma para supor que em Herquat esta suposição seja válida. Não existe, entretanto, nenhum estudo sistemático que mostre como a força iônica afeta o grau de dissociação destes agregados.

Outra fonte de erro na análise dos nossos resultados é devida ao fato de que as constantes de distribuição - de substratos em Herquat são as mesmas utilizadas para CTAB. Como o Herquat tem 85% de C_{18} , é provável que estejamos subestimando os valores destas constantes. Assim, os resultados obtidos da análise quantitativa dos dados de Herquat deve ser considerado - como uma primeira aproximação na tentativa de se caracterizar melhor o sistema do ponto de vista cinético.

A análise do efeito de concentração de Herquat no pK_{ap} de HM foi feita por etapas, analisando-se inicialmente o efeito do anfifílico em vesículas preparadas em tris/HCl. Os valores de α e $K_{AH/y}$ que permitiram o melhor ajuste foram 0.15 e 110 respectivamente. Estes valores foram utilizados nas demais análises. Devemos notar que o valor de α para Herquat está próximo

mo de valores obtidos para CTAB (Romsted, 1975). Além disso, a curva de pKap vs Herquat, simulada através da equação 20, descreve corretamente a dependência entre pKap e Herquat. Esta é uma indicação de que, se o valor de α varia com a concentração de Herquat, esta alteração é muito pequena para ser detectada através destes experimentos.

O valor de K_T (110) é maior do que em CTAB e isto está de acordo com uma menor capacidade do cloreto em trocar com a HM^- do que o brometo.

Os valores do parâmetro α e $K_{A/Cl}$ determinadas em vesículas preparadas em tris/HCl foram utilizadas nas curvas de pKap em tampão borato e tris/acetato. Foi possível, assim, obterem-se os valores de $K_{OH/B}$ e $K_{OH/AC}$. O valor de $K_{OH/B}$ (2) em Herquat é muito semelhante ao obtido em CTAB. O valor de $K_{OH/AC}$ (0.8) está de acordo com os resultados de filtração em gel de vesículas de Herquat que indicavam que o acetato era mais eficiente que o borato em deslocar o cloreto. Este efeito fica claro calculando-se os valores de $K_{AC/Cl}$ e $K_{B/Cl}$ através das seguintes relações:

$$K_{AC/Cl} = \frac{K_{OH/Cl}}{K_{OH/AC}} = 0.2 \quad \text{e} \quad K_{B/Cl} = \frac{K_{OH/Cl}}{K_{OH/B}} = 0.08$$

O valor de $K_{AC/Cl}$ é maior que $K_{B/Cl}$ o que significa que o acetato desloca o cloreto com maior eficiência que o borato.

Pode-se observar, entretanto, que as curvas

ajustadas de pK_{ap} vs Herquat em tris/AC e tris/Borato não descrevem perfeitamente os dados experimentais. As diferenças entre a curva teórica e os dados experimentais são maiores a altas concentrações de vesículas, indicando uma concentração de cloreto menor do que a prevista pela curva teórica. Como estes experimentos foram realizados na presença de ânions que são facilmente deslocados pelo cloreto, é possível que a falta de ajuste a concentrações altas de Herquat seja devido não só à falta de parâmetros adequados para a análise teórica mas a uma diminuição real de α . Este efeito só é perceptível quando a concentração de tampão é muito baixa como nos experimentos realizados em tampão borato 0.01M e acetato 0.005M.

Portanto, os resultados obtidos com vesículas de Herquat mostram que estes agregados se comportam, frente ao fenômeno de troca de íons, de forma semelhante à micelas. Indicam, também, que o valor do grau de dissociação do Herquat diminui ligeiramente com concentração de vesículas. Além disso, a curva teórica de pK_{ap} vs Herquat foi analisada utilizando-se a concentração analítica de Herquat e isto indica que o compartimento interno é acessível aos íons do meio aquoso externo.

Os agregados de Herquat ^{ram} ~~forma~~ utilizados também no estudo de reações de tiólise de NPO e NPA por HM. As indicações de que estes agregados eram mais estruturados que as micelas (Mortara, dados não publicados) fizeram-nos supor que o efeito da interface sobre a velocidade de reações fosse significati-

vamente maior que em CTAB.

O efeito acelerador destas vesículas sobre ambas as reações de tiólise é impressionante não só pela ordem de magnitude ($5 \cdot 10^4$ para a reação de HM e NPA e $8 \cdot 10^6$ para a tiólise de NPO) mas pelo fato de terem sido realizadas a pHs extremamente baixos. Note-se que a reação de tiólise de NPO foi estudada a pH 4, cerca 6.7 unidades abaixo do pK da mercaptana em fase aquosa.

A análise quantitativa do efeito de Herquat nas reações de tiólise de NPA e NPO foi feita através do modelo de troca iônica. Também nesta análise o valor dos parâmetros utilizados (K_s para NPA e NPO) foram os que melhor descrevem a curva de k_ψ vs Herquat. O valor de K_s para NPO ($4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) é aceitável já que o Herquat é constituído por 85% de derivados contendo 18 carbonos. Para NPA, entretanto, o valor de K_s é muito maior que aquele habitualmente utilizado para CTAB ($\text{NPA}_{\text{CTAB}} = 54 \text{ M}^{-1}$ e $\text{NPA}_{\text{Herquat}} = 150 \text{ M}^{-1}$). É possível que, como fixamos o valor de K_{HM} para a mercaptana protonada, a curva de k_ψ vs Herquat só possa ser ajustada aumentando-se o valor de K_s .

Portanto, os ajustes obtidos tanto para as curvas de pKap como de k_ψ em função de Herquat através do modelo de troca iônica tem que ser considerados como uma tentativa de análise do sistema, na medida em que os parâmetros não foram determinados experimentalmente.

A reação de NPA e HM em tampão borax/borato

é acelerada por Herquat por um fator da ordem de $5 \cdot 10^4$ que é pouco comum para substratos pouco hidrofóbicos em sistemas micelares. A reação é inibida por cloreto e o fator de aceleração em tris/HCl aumenta com a diminuição da concentração de cloreto. Este comportamento, similar ao observado em CTAB, é atribuído ao deslocamento de hidróxido da superfície do Herquat. A análise quantitativa destes resultados levou à obtenção de um valor da ordem de 5 para a relação k_2^m/k_2^o em tris/HCl enquanto que em borato esta relação é da ordem de 1. Neste sistema o volume de fase utilizado foi 0.37 l M^{-1} (Volume obtido para CTAB). O valor de $\bar{V}$ para fosfolipídeos, entretanto, é da ordem de 0.8 l.M^{-1} (Mason e Huang, 1978). Assim, os resultados obtidos para a relação k_2^m / k_2^o deverão estar subestimados já que um aumento em $\bar{V}$ deve levar a um aumento em k_2^m .

A discrepância entre os valores de k_2^m em tampão borax/borato e tris/HCl pode ser atribuída a uma diferença na compactação das vesículas preparadas em diferentes tampões. Somente um estudo da fluidez dessas vesículas preparadas em diferentes meios poderá nos indicar se esta suposição é válida.

A reação de NPO, ao contrário do que se observa em CTAB, possui uma relação k_2^m/k_2^o da ordem de 13 em vesículas preparadas em tampão acetato. Este aumento no valor de k_2^m indica que o microambiente das vesículas de Herquat tem características de fluidez e constante dielétrica bastante diferentes de -

micelas de CTAB. Ainda assim, esta alteração em k_2^m tem um papel muito pequeno na aceleração total da reação.

O aumento de pH na reação de tiólise de NPO e HM em Herquat leva a uma diminuição do fator de aceleração máximo. Este efeito é devido ao deslocamento de hidróxido da superfície da vesícula pelo acetato.

Assim, o efeito acelerador de vesículas de Herquat sobre as reações de tiólise de NPA e NPO pode ser decomposto, da mesma forma que em micelas, em mudança no pK_a do nucleófilo, concentração de reagentes nas vesículas e mudança no valor da constante de segunda ordem da reação na pseudo-fase.

Levamos a efeito um estudo limitado sobre compartimentalização de substratos em vesículas de Herquat. Na reação de TPA incorporado nas vesículas com HM ou GSH não se consegue distinguir entre as reações na face externa ou interna das vesículas. Entretanto, quando o substrato incorporado é o DTNB, a reação com GSH ocorre com uma constante de velocidade única enquanto que a reação com HM ocorre em duas etapas distintas. Aparentemente o TPA incorporado pode atravessar a parede da vesícula e ter acesso à mercaptana. O DTNB, entretanto, não deve atravessar a barreira com a mesma facilidade que o TPA. A reação com HM mostra uma fase mais rápida da reação do substrato (talvez) na face externa e uma mais lenta limitada pela entrada do HM na vesícula.

Na reação de GSH com DTNB, entretanto, -

observou-se uma única constante de velocidade de pseudo primeira ordem. Nesta reação as vesículas de Herquat podem ter-se rompido pela ligação com o GSH, que tem carga residual negativa, e liberado o DTNB incorporado. Estes resultados, entretanto, são preliminares e é necessário um estudo sistemático destas reações a fim de se estabelecer quais os sítios de reação e as características de cada uma destas regiões.

Este estudo, aliado a um conhecimento mais profundo das velocidades de passagem de substratos entre os dois meios aquosos poderá nos dizer se o sistema de vesículas, do ponto de vista cinético, pode ser tratado como micelas ou se há necessidade de se fazer um tratamento específico para cada sítio de reação.

O sistema de vesículas sintéticas é, sem dúvida, extremamente interessante sob o ponto de vista de reatividade química em interfaces. Os resultados apresentados neste trabalho são os primeiros em que se observa um efeito tão dramático na aceleração de reações por modelos simples de interfaces. Embora tenhamos feito uma analogia entre o sistema micelar e as vesículas de Herquat, sem dúvida este último sistema é bem mais complexo que o primeiro. Portanto, há necessidade de um estudo sistemático de estrutura destes agregados, localização dos substratos e sítio de reação para que a análise teórica de resultados cinéticos possa ser feita de modo a descrever corretamente os fenômenos que ocorrem nas vesículas. As propriedades da bicamada -

dessas vesículas parecem ser bastante diferentes das propriedades de micelas e seu efeito em reações pode conduzir a um conhecimento maior sobre os fatores que podem afetar a velocidade de reações. Talvez o resultado mais interessante do estudo de tiólise de ésteres em micelas e vesículas tenha sido a verificação de que se pode obter fatores de aceleração comparáveis a enzimas, em condições de pH onde, em fase aquosa, a reação praticamente não ocorre. Este efeito é claro na reação de tiólise de NPO em Herquat a pH 4 onde o fator de aceleração obtido é da ordem de $8 \cdot 10^6$. E por último, a maior parte dos efeitos de aceleração observados pode ser explicado por efeitos de concentração de reagentes na pseudo-fase, desvios de pK e, em menor escala, a efeito da pseudo-fase sobre a constante de velocidade da reação.

4.3 - Hidrólise de FI em fase micelar

O problema fundamental para a análise dos efeitos de constante dielétrica, força iônica e atividade da água em reações em fase micelar é o desconhecimento da posição ocupada pelo substrato na pseudo-fase. Na reação de hidrólise de FI este problema foi superado porque o substrato reativo tem carga positiva e, em micelas negativas de SDS, sua posição mais provável é a região próxima à camada de Stern.

O estudo da reação de hidrólise de FI foi realizado numa faixa de pH onde o passo limitante da reação é o ataque da água ao substrato positivo. Demonstrou-se que a reação em fase aquosa é inibida por força iônica que esta inibição diminui com o aumento de pH. Este efeito pode ser atribuído a uma diminuição da atividade da água com o aumento da concentração de sal. O efeito inibitório de cloreto de sódio e metilsulfato de sódio são similares. Utilizamos o metilsulfato de sódio na tentativa de mimetizar a região ~~a região~~ da camada de Stern da micela de SDS que é a região onde o FI deve se localizar com maior frequência. Observou-se também que a adição de acetonitrila ao meio de reação conduz a um aumento na constante de hidrólise de FI.

A relação de produtos do FI depende do pH e observa-se uma diminuição na porcentagem de formação de anilina acima de pH 5. Em presença de SDS o pK_a do intermediário tetrahédrico é

aumentado indicando que a forma neutra do mesmo é solubilizado - preferencialmente pela micela. Neste sistema, entretanto, não - foi possível fazer-se uma análise adequada através do modelo de troca iônica já que a constante de distribuição da forma neutra e o pK do Intermediário são desconhecidos.

Os nossos estudos sobre o efeito de pH na - reação de hidrólise de FI em fase aquosa confirmaram dados de Schmir e Cunningham (1965) que mostraram que a reação passa por uma região de máximo em k_{ψ} (entre pH 2 e 4) e, acima de pH 4, a constante de velocidade observada diminui. Como o valor de k_{ψ} é uma função de concentração de forma protonada do FI (cujo pK em fase aquosa é 5.09) podia-se prever que o SDS deslocaria a curva de k_{ψ} vs pH de forma que o pKap do FI aumentasse (Schmir e Cunningham, 1965; Fernandez e Fromherz, 1977). Observou-se que o pK do FI, em presença de 0.02M de SDS, era aumentado cerca de 1.3 unidades e que o detergente provocava um aumento de cerca de 10% no valor de k_{ψ} máximo. Este efeito de SDS sobre o valor de $k_{\psi\text{máx}}$ não era esperado e tentamos analisar teoricamente os resultados e verificar o efeito do ambiente micelar sobre o valor da constante de velocidade de primeira ordem da reação. Utilizamos o formalismo do modelo de troca iônica para esta análise. Uma indicação de que o modelo de troca iônica é aplicável a este sistema é o resultado obtido com o efeito de NaCl na reação em presença de SDS. Observa-se que a adição de sal ao meio de reação (em SDS 0.02M e pH 5) conduz a uma diminuição em k_{ψ} . Como dissemos ante-

riormente, o sódio é capaz de deslocar o H^+ da superfície do SDS. Portanto, o aumento da concentração de NaCl leva a uma diminuição de H^+ da superfície da micela e, conseqüentemente, a um aumento na concentração de OH^- na pseudo-fase. Este efeito, e, ainda, o deslocamento da forma positiva do FI pelo sódio, produz uma inibição da reação (note-se que o pH da fase aquosa é 5 e, portanto, a reação é muito mais lenta em água do que em SDS).

Os resultados foram analisados através do modelo de troca Iônica utilizando-se o valor de $K_{A/Y}$ calculado pelo desvio do pK_a do FI em SDS. Note-se que tanto para o cálculo de $K_{A/Y}$ quando para a simulação das curvas de k_ψ vs pH e k_ψ vs SDS utilizou-se o valor da constante de distribuição da anilina e não do substrato neutro do FI. Portanto, embora as simulações teóricas - para as curvas citadas sejam boas, o valor de k^m tem que ser tomado com reservas.

Os ajustes teóricos indicaram que, na faixa de pH 2 a 4, a relação k^m/k^o é 1.125 e que esta relação diminui ligeiramente com o aumento de pH.

Os resultados da análise teórica mostraram - que o efeito de SDS na hidrólise de FI pode ser decomposto em poucos fatores. A pHs entre 2 e 4, a reação é afetada por um pequeno aumento na constante de primeira ordem na fase micelar, A pHs - maiores do que 4 o efeito acelerados do SDS é devido, principalmente, a um aumento no pK_a do FI e concentração de H^+ na superfície da micela.

O efeito da micela de SDS sobre o valor de k^m , entretanto, não é facilmente explicável.

O pequeno aumento em k_ψ entre pHs 2 e 4 na presença de SDS pode ser atribuído a dois efeitos compensadores sendo um deles uma inibição da reação devida à força iônica da camada de Stern e o outro a uma ativação devido à baixa constante dielétrica da fase micelar. Deve-se notar, entretanto, que a interpretação destes resultados está ligada ao modelo de micela assumido. Segundo o modelo de Stigter, pôde-se calcular uma força iônica de 3M na camada de Stern (Mukerjee, 1962). Segundo este modelo, deveríamos esperar uma inibição da reação em fase micelar da mesma ordem que a observada em 3M de metilsulfato de sódio (cerca de 2.5 vezes).

Segundo o modelo de Menger, entretanto, o efeito de força iônica não seria facilmente previsível devido à fluidez da região de Stern. Portanto, o efeito do SDS sobre k_ψ poderia ser atribuído a um pequeno efeito ativador devido à menor constante dielétrica do meio micelar.

Note-se que, como dissemos anteriormente, o valor absoluto de k^m está afetado por um grande erro já que a análise teórica não foi feita com dados experimentais independentes. Entretanto, o valor de k_ψ entre pH 2 e 4 é apenas 10% maior que o obtido em fase aquosa e não se observa a inibição prevista pelo modelo de Stigter.

Os resultados de Kurz sobre a reação de hi

drólise de SDS e os de Bunton sobre reação de hidrólise de corantes catiônicos através do ataque de água indica que a atividade da água próxima da camada de Stern é muito próxima de água "normal". O estudo da hidratação e aldeídos em fase micelar indicaram que, a atividade da água, na região próxima à da camada de Stern, não diminui mais do que 30% com relação à água "normal". (Albrizzio e Cordes, 1979). Nossos resultados mostram que a reação de hidrólise de FI se processa, na fase micelar, com velocidade similar a um meio de baixa força iônica. Certamente este efeito da micela sobre a reação é uma somatória dos efeitos obtidos em todas as regiões ocupadas pelo substrato na pseudo-fase. Entretanto, a região em que o substrato reside com maior frequência deve ser a camada de Stern e os resultados cinéticos obtidos deve ser um reflexo do microambiente desta região sobre a hidrólise do FI.

É possível que estejamos subestimando o efeito da força iônica na fase micelar pelo desconhecimento de algum fator adicional que contrabalança o primeiro. De qualquer forma para as análises cinéticas convencionais, não nos parece necessário incluir um fator de correção para força iônica na fase micelar - já que todos os dados nos sugerem que este efeito, se existe, deve ser muito pequeno ou neutralizado por outro de mesma intensidade e que atue em direção oposta.

5. SUMÁRIO

Micelas e agregados de cloreto de dimetildialquilamônio (Herquat) foram utilizados como modelos de interfaces para o estudo de reações químicas. As reações de tiólise de acetato de p-nitrofenila (NPA) e octanoato de p-nitrofenila (NPO) por n-heptilmercaptana (HM) foram estudadas na presença de concentrações variáveis de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), dodecilsulfato de sódio (SDS) e 3-(N,N dimetildodecilamônio) propano-1-sulfonato (SDP). O detergente positivo (CTAB) provoca uma alteração máxima da reação de tiólise de NPA de 6.10^3 vezes e da reação de tiólise de NPO por um fator máximo de $1,6.10^4$ vezes. O efeito da concentração de CTAB na constante de pseudo-primeira ordem das reações de tiólise (k_ψ) e no pK aparente (pK_{ap}) da HM foi analisado segundo o modelo de Troca Iônica (Quina, F.H. e Chaimovich, H. (1979)). Os parâmetros necessários para a análise dos resultados descritos acima foram determinados por métodos independentes dos experimentos cinéticos. Um ajuste excelente das curvas teóricas aos dados experimentais foi obtido utilizando-se uma relação entre as constantes de velocidade de segunda ordem nas fases micelar (k_2^m) e aquosa (k_2^o) de 1 e 5 para as reações de tiólise de NPA e NPO, respectivamente. Assim, o efeito de CTAB sobre a k_ψ das reações de tiólise de NPA e NPO pode ser atribuído a uma concentração de substratos na fase micelar, desvio do pK_{ap} da HM e concentração do íon hidróxido na interface.

A velocidade da reação de tiólise de NPO por HM diminui cerca de 70 vezes em 0,1 M de SDS e, na presença de SDP, aumenta por um fator máximo de 270 vezes. O pK_{ap} da HM aumenta com a concentração de ambos os detergentes. O efeito da concentração de SDS e SDP no pK_{ap} da HM e na k_{ψ} da reação de tiólise de NPO foi analisado segundo o modelo de pseudo-fase (Yatsimirski, A.K., Martinek, K. e Berezin, I.V., (1971)). Um ajuste muito bom das curvas teóricas aos dados experimentais foi obtido utilizando-se um valor de 0,085 para a relação k_2^m/k_2^o em SDS e 1 para a relação em SDP. Assim, a inibição da tiólise de NPO por SDS é devida a um aumento do pK_{ap} do substrato, uma k_2^m menor que k_2^o e uma pequena constante de associação entre o SDS e a forma aniônica da mercaptana. A aceleração da reação de tiólise de NPO por SDP pode ser atribuída unicamente a concentração de reagentes na pseudo-fase.

A reação de hidrólise de 2-Feniliminotetrahydrofurano (FI) foi estudada em presença de SDS observando-se que o detergente aumenta o pK_{ap} do substrato e a velocidade da reação de hidrólise (a pHs maiores que 4). A análise destes resultados empregando-se equações derivadas a partir do modelo de Troca-Iônica mostrou que a relação k^m/k^o é praticamente 1 a todos os pHs estudados. Desde que a reação é inibida a alta força iônica em fase aquosa, podemos inferir que, no microambiente no qual o FI é solubilizado (camada de Stern do SDS), a reação ocorre com uma constante de velocidade similar à observada em

baixa força iônica,

Foi feita uma caracterização parcial dos agregados de Herquat (vesículas) por filtração em Sephadex G-25. Demonstrou-se que as vesículas incorporam substratos hidrofóbicos (4-(1-pireno) butanoato de metila) e hidrofílicos ((^{14}C) glicose) e que o contraíon do anfifílico (cloreto) pode ser deslocado do Herquat pelo ânion do tampão. Estes agregados aceleram a reação de tiólise de NPA por HM por um fator máximo de $5 \cdot 10^4$ vezes e a reação de tiólise de NPO por HM por um fator de $7 \cdot 10^6$ vezes. O efeito mais impressionante destes agregados é que a reação de tiólise de NPO por HM em Herquat pode ser estudada a pH 4, portanto, cerca de 6,7 unidades de pH abaixo do pK da mercaptana em água. Após a análise deste sistema de reações utilizando-se o modelo de Troca-Iônica obteve-se uma relação k_2^m/k_2^o da ordem de 5 para a reação de HM e NPA e da ordem de 13 para a reação de tiólise de NPO. A aceleração provocada pelos agregados de Herquat pode ser atribuída a concentração de reagentes nas vesículas, - efeito dos agregados sobre o pK_a da HM e uma constante de segunda ordem na pseudo-fase maior que na fase aquosa.

SUMMARY

Micelles and dialkyldimethylammonium chloride aggregates (Herquat) were employed as model interfaces for the study of interfacial effects on chemical reactions. The thiolyses of p-nitrophenyl acetate (NPA) and p-nitrophenyloctanoate (NPO) by n-heptylmercaptan (HM) were investigated as a function of concentration of added hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS) and 3- (N,N-dimethyl-N-dodecyl ammonium) - propane-1-sulfonate (SDP). In the presence of the cationic detergent (CTAB), maximum rate acceleration of 6×10^3 and 1.6×10^4 were observed for the thiolyses of NPA and NPO, respectively. The CTAB concentration dependences of the pseudo first-order rate constants (k_ψ) for these reactions and of the apparent pK (pKap) of HM were analyzed within the framework of the conceptual Model for Ion Exchange (Quina, F.H. and Chaimovich, H., 1979), the requisite parameters for the analysis being determined independently of the kinetic results. Excellent simulations of the experimental results were obtained using ratios of second order rate constants in the micellar (k_2^m) and aqueous (k_2^o) phases of 1 and 5 for thiolysis of NPA and NPO, respectively. Thus, in this case, the effect of CTAB on k_ψ may be attributed to the interplay of concentration of the substrate in the micellar phase, changes in the pKap of HM and concentration of the hydroxide ion at the interfaces.

The rate of thiolysis of NPO by HM diminishes by roughly a factor of 70 upon addition of 0.1M SDS (anionic

detergent) and increases by a factor of 270 at the maximum in the presence of SDP (zwitterionic detergent). The pK_a of HM increases in the presence of both detergents. The effect of detergent concentration on the pK_a of HM and on k_{ψ} for thiolysis of NPO were analyzed in terms of the pseudo-phase model (Yatsimirski, Martinek, Berezin, 1971). Reasonable simulation of the experimental data were obtained using values of 0.085 for the ratio k_2^m/k_2^o in SDS and 1 for this same ratio in SDP. Thus, the inhibition of the thiolysis of NPO by SDS may be ascribed to an increase in the pK_a of HM, coupled with a small value of the constant for association of the mercaptide ion of HM with the micellar phase and an apparent decrease in k_2^m relative to k_2^o . The acceleration of this same reaction by SDP can be attributed exclusively to extrinsic factors, concentration of the reagents in the micellar phase predominating over the increase in the pK_a of HM.

The hydrolysis of 2-Phenyliminotetrahydrofuran (FI) was studied in the presence of SDS, it being verified that both the pK_a of the substrate and the velocity of hydrolysis (at pH values higher than 4) increase in the presence of the detergent. Analysis of these results, using equations derived from the conceptual Model for Exchange, demonstrates that the ratio k^m/k^o is essentially 1 over the entire pH range investigated. Since this reaction is inhibited at high ionic strength in aqueous solution, one may infer that, in the micro environment in which FI is solubilized (Stern layer of SDS), the reaction occurs with a rate constant similar to that observed in aqueous medium at low ionic strength.

A partial characterization of the aggregates (vesicles) formed by Herquat in aqueous dispersion was performed by gel filtration on Sephadex G-25. In this manner, it was demonstrated that the vesicles incorporate hydrophobic (methyl 4-(1-pir_eno)butanoate) and hydrophilic (¹⁴C-glucose) substrates and that the chloride counterion of Herquat can be exchanged with anionic buffer components. These aggregates accelerate the thiolysis of NPA by HM by up to a factor of 5×10^4 and that of NPO by up to a factor of 7×10^6 . The most impressive aspect of these Herquat aggregates is the fact that the thiolysis of NPO by HM can be studied at pH 4, some 6.7 pH units below the pK_a of HM in water. Applying an ion-exchange formalism analogous to that employed for reactions in CTAB to the analysis of these thiolyses, k_2^m/k_2^o ratios of about 5 for the reaction between NPA and HM and of roughly 13 for the reaction between NPO and HM were obtained. The acceleration observed in the presence of these aggregates may thus be attributed to concentration of the reagents in the vesicle phase, effects on the pK_a of HM and a somewhat larger second-order rate constant in the vesicle phase relative to the aqueous phase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albrizzio, J.P. e Cordes, E.H (1979) J.Coll.I.Sci., 68, 292
2. Aldrigue, V., Carvalho, F.R.F e El Seoud, O.A. (1978) An.Acad. Bras. Cienc., 50, 499
3. Bangham, A.D. e Horne, R.W. (1964) J.Molec.Biol, 8, 660
4. Bangham, A.D., Standish, M.M. e Watkins, J.C. (1965) J. Mol. Biol, 13, 238
5. Barry, B.W. e Russel, G.F.J. (1972) J.Coll.I.Sci., 40, 174
6. Batzri, S. e Korn, E.D. (1973) Biochim.Biophys.Acta., 298,1015
7. Berezin, I.V., Martinek, K., Yatsimirski, A.K. (1973) Russ.Chem. Revs. (English Transl.), 42, 487
8. Block, M.L., Van Deenen, L.L.M. e De Gier, J. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 433, 1
9. Bunton, C.A., Fendler, E.J., Sepulveda, L. e Yang, K. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 90, 5512
10. Bunton, C.A. e Huang, S.K. (1972) J.Org.Chem., 37, 1790
11. Bunton, C.A., Kamego, A. e Minch, M.J. (1972) J.Org.Chem.,37, 1388
12. Bunton, C.A., Minch, M. e Sepulveda, L. (1971) J.Phys Chem., 75, 2707
13. Bunton, C.A., Ohmenzetter, K. e Sepulveda, L. (1977) J. Phys. Chem., 81, 2000

14. Bunton, C.A. e Robinson, L. (1969) J.Phys.Chem., 73, 4237
15. Bunton, C.A., Romsted, L.S. e Smith, H.J. (1978) J. Org.Chem.,
43, 4299
16. Chaimovich, H. (1979) Tese de Doutorado, Dept? de Bioquímica,
Instituto de Química - USP.
17. Chaimovich, H., Blanco, A., Chayet, L., Costa, L.M., Monteiro,
P.M., Bunton, C.A., Paik, C. (1975) Tetrahedron, 31,1139
18. Chester, M., McCloskey, M. e Coleman, G.H. (1955) Organic Syn-
theses, Coll.Vol.III, 433.
19. Clifford, J. (1965) Trans. Faraday Soc., 61, 1276
20. Coetzee, J.F. e Ritchie, C.D. (1969) "Solute-Solvent Interactions",
Marcel Dekker, Inc.
21. Cope, A.C. e Trumbull, E.R. (1960) Org. Reactions, 11, 317
22. Cordes, E.H. (1978) Pure Appl. Chem., 50, 617
23. Cuccovia, I.M., Aleixo, R.M.V., Mortara, R.A.,Berci Filho, P.,
Bonilha, J.B.S., Quina, F.H. e Chaimovich, H. (1979)
Tetrahedron Lett., 3065
24. Cuccovia, I.M., Schröter, E.H., Baptista, R.C. e Chaimovich,H.
(1977) J. Org. Chem., 42, 3400
25. Cuccovia, I.M., Schröter, E.H., Monteiro, P.M. e Chaimovich,H.
(1978) J. Org. Chem., 43, 2248
26. Cunningham, B.A., Schmir, G.L. (1966) J.Amer.Chem.Soc.,88,551

27. Deamer, D.W., Hill, M.W., Bangham, A.D. (1976) Biophys. J., 16 A, 111
28. Deguchi, K. e Mino, J. (1978) J. Coll.I.Sci., 65, 155
29. Dervichian, D.G. (1964) Prog. Biophys. and Mol. Biol, 14, 263
30. Ellman, G.L. (1959) Arch.Biochem.Biophys., 82, 70
31. Ericksson, J.C. e Gilberg, G. (1966) Acta Chem. Scand., 20, 2019
32. Escabi-Perez, J.R., Romero, A., Lukac, S. e Fendler, J.H. (1979) J. Amer.Chem.Soc., 101, 2231
33. Fendler, E.J., Day, C.C. e Fendler, J.H. (1972) J. Phys.Chem., 76, 1460.
34. Fendler, E.J. e Fendler, J.H. (1970) Chem. Commun., 816
35. Fendler, J.H. e Fendler, E.J. (1975) "Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems", Academic Press, New York, N.Y.
36. Fernandez, M.S. e Fromherz, P. (1977) J. Phys.Chem.,81, 1755
37. Fieser, L.F. e Fieser, M. (1966) Reagents for Organic Synthesis 41. John Wiley and Sons, Inc. New York
38. Friedman, M. (1973) "The Chemistry and Biochemistry of the Sulphydryl, Peptides and Proteins". Pergamon Press, New York
39. Funasaki, N. (1979) J. Phys. Chem., 83, 1998
40. Gebicki, J.M. e Hicks, M. (1976). Nature (London), 243, 232

41. Geer, R.D., Eylar, E.H. e Anacker, E.W. (1971) J. Phys.Chem., 75, 369
42. Gitler, C., e Ochoa-Solano, A. (1968) J.Amer.Chem.Soc., 90, 5004
43. Grunhagen, H.H. (1975) J. Coll.I.Sci., 53, 282
44. de Haas, G.H., Bensen, P.P.M., Pieterse, W.A., van Deenen, L.L.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta, 239, 252
45. Hargreaves, W.R. e Deamer, D.W. (1978) Biochemistry, 17, 3759
46. Harrold, S.P. (1960) J. Colloid Sci., 15, 280
47. Hartley, G.S. (1934) Trans. Faraday Soc., 30, 444
48. Heitmann, P. (1968) Eur. J. Biochem., 5, 305
49. Herrmann, U. e Fendler, J.H. (1979) Chem. Phys. Lett., 64, 270
50. Hinz, H.J. e Sturtevant, J.M. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6071
51. Huang, C.H. (1969) Biochemistry, 8, 344
52. Huang, C., Sipe, J.P., Chow, S.T. e Martin, R.B. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 71, 359
53. Hubbell, W.L. e McConnell, H.M. (1971) J.Amer.Chem.Soc., 93, 314
54. Hupe, D.J. e Jencks, W.P. (1977) J. Amer.Chem.Soc., 99, 451
55. Hutton, W.C., Yagle, P.L. e Martin, R.B. (1977) Chem. Phys. Lipids, 19, 255
56. Israelachvili, J.N., Mitchel, D.I e Ninham, B.W. (1976) J.Chem.Soc. Faraday II, 72, 1525

57. Jencks, W.P. e Carriuolo, J. (1960) J.Amer.Chem.Soc., 82,1778
58. Jencks, W.P. e Salvesen, K. (1971) J.Amer.Chem.Soc., 93,4433
59. Jocelyn, P.C. (1972) "Biochemistry of the SH Group",Academic Press, Inc., London Ltd.
60. Kano, K. e Fendler, J.H. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 509, 289.
61. Kano, K., Romero, A., Djermouni, B., Ache, H.J. e Fendler, J.H. (1979) J. Amer. Chem. Soc., 101, 4030
62. Kemp, D.S. e Paulo, K.G. (1975) J. Amer. Chem. Soc. 97, 7305
63. Kolthoff, I.M. e Johnson, W.F. (1951) J.Amer.Chem.Soc., 73 , 4563
64. Kunitake, T. e Okahata^a, Y. (1977) Chem.Lett., 1337
65. Kunitake, T. e Okahata^b, Y. (1977) J.Amer.Chem.Soc., 99, 3860
66. Kunitake, T. e Okahata, Y. (1978) Bull.Chem.Soc.Jpn.,51,1877
67. Kunitake, T., Okahata, Y., Tamaki, K., Kumamaru, F. e Takayanagi, M. (1977) Chem. Lett., 387
68. Kunitake, T. e Sakamoto, T. (1978) J.Amer.Chem.Soc.,100,4615
69. Kurz, J.L. (1962) J. Phys. Chem., 66, 2239
70. Ladbroke, B.D. e Chapman, D. (1969) Chem. Phys. Lipids,3, 304
71. Lang, J., Tondre, C., Zana, R., Bauer, R., Hoffman, H. e Ulbricht, W. (1975) J. Phys. Chem., 79, 276

72. Larsen, J.W. e Magid, L.J. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 5774
73. Lawrence, A.S.C. e Perason, J.T. (1967) Faraday Soc. Trans., 63, 495
74. Lapinte, C. e Viout, P. (1973) Tetrahedron Lett., 1113
75. Lee, A.G. (1975) Progr. in Biophys. and Molec. Biol., 29, 163
76. Lim, Y.Y. e Fendler, J.H. (1979) J. Amer. Chem. Soc., 101, 4023
77. Lipp, P. e Casper, F. (1925) Ber., 58, 101
78. Lippert, J.L. e Peticolas, W.L. (1971) Proc.Natl.Acad. Sci. USA., 68, 1572
79. Lippert, J.L. e Peticolas, W.L. (1972) Biochim. Biophys.Acta, 282, 8
80. Martinek, K., Levashov, A.V. e Berezin, I.V. (1975) Tetrahedron Lett., 1275
81. Martinek, K., Yatsimirski, A.K., Osipov, A.P. e Berezin, I.V. (1973) Tetrahedron, 29 , 963
82. Mason, J.T. e Huang, C. (1978) Ann. New York Ac. Sci., 308, 29
83. McBain, J.W. (1935) J. Amer. Chem. Soc., 57, 1916
84. Menger, F.M. (1979) Acc. Chem. Res., 12, 111
85. Menger, F.M. e Jerkunica, J.M. (1978) J. Amer. Chem. Soc., 100, 688
86. Menger, F.M., Jerkunica, J.M. e Johnston, J.C. (1978) J. Amer. Chem. Soc., 100, 4676

87. Menger, F.M. e Portnoy, C.E. (1967) J. Amer. Chem. Soc., 89, 4698
88. Mittal, K.L. ed. (1977) "Micellization, Solubilization and Microemulsions". Vol. 1 e 2. Plenum Press., New York
89. Molyneaux, P., Rhodes, C.T. e Swarbrick, I. (1965) Trans. Faraday Soc., 61, 1043
90. Montal, M. e Gitler, C. (1973) Bioenergetic, 4, 363
91. Mortara, R.A., Quina, F.H. e Chaimovich, H. (1978) Biochim. Biophys. Res. Comm., 81, 1080
92. Moss, R.A., Lee, Y. e Lukas, T. (1979) J. Amer. Chem. Soc., 101, 2499
93. Moss, R.A., Talkowski, C.J., Reger, D.W. e Powell, C.E. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 5215
94. Mukaiyama, T. e Sato, K. (1963) Bull. Chem. Soc. Jpn., 36, 99
95. Mukerjee, P. (1962) J. Phys. Chem., 66, 943
96. Mukerjee, P. e Banerjee, K. (1964) J. Phys. Chem., 68, 3567
97. Newman, G.C. e Huang, C. (1975) Biochemistry, 14, 3363
98. Ogilvie, J.W., Tildon, J.T. e Strauch, B.S. (1964) Biochemistry, 3, 754
99. Ohnishi, S., Cyr, T.J.R. e Fukushima, H. (1970) Bull. Chem. Soc. Jpn., 43, 673

100. Okahata, Y., Ando, R. e Kunitake, T. (1977) J. Amer. Chem. Soc., 99, 3067
101. Papahadjopoulos, D., Hui, S., Vail, W.J. e Poste, G. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 448, 245
102. Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S. e Isac, T. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 311, 330
103. Pierci, J., Jones, M.N. e Ibbotson, G. (1971) J. Coll.I.Sci., 37, 165
104. Podo, F., Ray, A. e Némethy, G. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 6164
105. Politi, M., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., Almeida, M.C.C., Bonilha, J.B.S. e Quina, F. (1978) Tetrahedron Lett., 115
106. Quina, F.H. e Chaimovich, H. (1979) J.Phys.Chem., 83, 1844
107. Quina, F.H., Politi, M.J., Cuccovia, I.M., Baumgarten, E., Martins-Franchetti, S.M. e Chaimovich, H. (1980) J.Phys. Chem., no prelo.
108. Quina, F.H. e Toscano, V.G. (1977) J.Phys.Chem., 81, 1750
109. Romsted, L.R. Tese de Doutorado, Dept. Chem., Indiana University. Bloomington, Indiana
110. Romsted, L.R., Dunlap, R.B. e Cordes, E.H. (1967) J. Phys. Chem., 71, 4581
111. Romsted, L.R. e Cordes, E.H. (1968) J.Amer.Chem.Soc., 90, 4404

112. Sackmann, E. e Träuble, H. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 4482
113. Salsbury, N.J. e Chapman, P. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 163, 314
114. Sasaki, T., Hattori, M., Sasaki, J. e Nukina, K. (1975) Bull. Chem. Soc. Jpn., 48, 1397
115. Schales, O. e Schales, S.S. (1941) J. Biol. Chem., 140, 379
116. Schmir, G.L. e Cunningham, B.A. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 5692
117. Shimshick, E.J. e McConnell, H.M. (1973) Biochemistry, 12, 2351
118. Shinkay, S. e Kunitake, T. (1976) Bull. Chem. Soc. Jpn., 49, 3219
120. Shinitzky, M., Dianoux, A.C., Gitler, C. e Weber, G. (1971) Biochemistry, 10, 2106
121. Shinoda, K., Hakagawa, T., Tamamushi, B.I., Isemura, T. (1963) em "Colloidal Surfactants", Academic Press, New York.
122. Schreier-Muccillo, S., Marsh, D. e Smith, I.C.P. (1976) Arch. Biophys., 172, 1
123. Stigter, D. (1974) J. Phys. Chem., 78, 2480
124. Sukenik, C.N., Weissman, B.A. e Berman, R.G. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 445

125. Swain, C.G. e Kreevoy, M.M. (1955) J. Amer. Chem. Soc., 77, 1122
126. Tagaki, W., Amada, J., Yamashita, Y., Yano, Y. (1972) J.C.S. Chem. Comm., 1131
127. Tanford, C. (1973) "The Hydrophobic Effect". J.Wiley & Sons, New York, N.Y.
128. Tokiwa, F. e Moriyama, N. (1969) J. Coll. I. Sci., 30, 338
129. Tong, L.K.J. e Glesmann, M.C. (1957) J. Amer. Chem. Soc., 79, 4305
130. Tran, C.D., Klahn, A.R., Romero, A. e Fendler, J. (1978) J. Amer. Chem. Soc., 100, 1622
131. Van Dijek, P.W.M., De Kruijff, B., Arts, P.A.M.M., Verkleij, A.J. e De Gier, J. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 506, 183
132. Ververgaert, P.H.J. (1973) Biochim.Biophys.Acta, 311, 320
133. Whitaker, J.R. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 1900
134. Yatsimirski, A.K., Martinek, K. e Berezin, I.V. (1971) Tetrahedron, 27, 2855
135. Yeagle, P.L., Hutton, W.C., Martin, R.B., Sears, B. e Huang, C. (1976) J. Biol. Chem., 251, 2110