

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**INTERAÇÃO ENTRE O HIALURONATO E SURFACTANTE
CATIÔNICO - PROPRIEDADES CATALÍTICAS E
FÍSICO-QUÍMICAS**

TESE SUBMETIDA A UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
"MESTRE EM CIÊNCIAS"

SÔNIA DE FÁTIMA SANTOS

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
NOVEMBRO - 1993

**INTERAÇÃO ENTRE O HIALURONATO E SURFACTANTE
CATIONICO - PROPRIEDADES CATALÍTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS.**

SÔNIA DE FÁTIMA SANTOS

Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca examinadora.

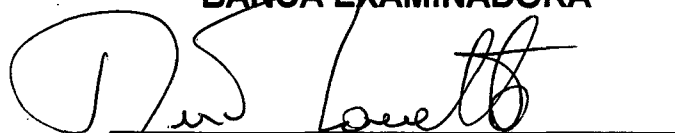


Prof. DINO ZANETTE, Ph. D.
(ORIENTADOR)



Prof. BRUNO SZPOGANICZ, Ph. D.
(COORDENADOR)

BANCA EXAMINADORA



Prof. DINO ZANETTE, Ph.D.



Prof. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Ph. D.



Prof. VALDIR ROSA CORREIA, Ph. D.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maurício e Ma. de Lourdes, que
sempre foram companheiros e apoiaram-
me em todas as fases da minha vida. Aos
meus irmãos e ao meu sobrinho Lucas.*

AGRADECIMENTOS

*"Majestoso em esplendor, tremendo em Santidade,
ilimitado em poder, imutável em fidelidade,
estonteante em beleza ..."*

Obrigada Senhor meu Deus.

"Ao mestre com carinho." Quero expressar minha gratidão ao prof. Dino Zanette por sua brilhante orientação e amizade no desenvolvimento científico e feitura desse trabalho.

Ao prof. Faruk Nome por sua egrégia participação e instigação.

Ao prof. Wayne Reed (University of Tulane, USA) por sua complementação interdisciplinar e célebre colaboração deste magnífico projeto que agrupa cientistas do Brasil e USA.

Ao prof. Valdir Correa por sua participação especial.

Ao maravilhoso grupo de pesquisa e de amizade (303 e 305): Prof. Zucco, Vera, Jaime, Dilma, Sandro, Bird, Zé, Salim, Jean, Deo, Sérgio, Cléia, Francine e Márcio, Alex, Athos e Danil (co-co-orientadora) e os meus amigos de luta Santiago e Evandro.

Aos meus amigos de fé, irmãos e camaradas: Janete, Rejane, Beta, Róger, Beto, Teo, Bene e Angélica.

O meu carinho especial para Tânia, que ajudou-me na revisão bibliográfica, Diva, Selma, Rose, Vanika, Eliete, Jadir e Graça.

A todos os professores e demais amigos e funcionários de todos os grupos de pesquisa do curso de Química que contribuíram de uma forma calorosa e significativa para a realização desse trabalho.

A todos aqueles que têm no sangue a garra e a força de lutar pela ética, moral, justiça e democracia; buscando humanizar a guerra, a fome, a miséria e a exploração causados pelos "donos do poder" (verdadeiros fósseis da tirania).

Um agradecimento especial ao Rafael (Artprint), por seu cuidadoso trabalho de digitação do manuscrito em suas diversas fases.

Aos órgãos financeiros CNPq e PADCT.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	XI
Abreviaturas	XV
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
Capítulo I - Introdução	1
1 - Acido Hialurônico	1
1.1 - Estrutura	3
1.2 - Propriedades Físicas e Químicas	5
1.3 - Importância Biológica	6
2 - Sistemas Micelares - Surfactantes	7
2.1 - Definição e Classificação	7
2.2 - Micelas - Concentração Micelar Crítica (CMC)	9
2.3 - Fatores que Afetam a Concentração Micelar Crítica	12
2.4 - Estrutura: Tamanho e Forma - Modelos Micelares	13
2.5 - Reações Químicas em Sistemas Micelares	17
3 - Interação Polímero - Surfactante	20
3.1 - Considerações Gerais	20
3.2 - Influência da Adição de Polímeros em Soluções Micelares	24
3.3 - Separação de Fase	27

3.4 - Reação de Associação	28
3.5 - Efeito do Sal - Concentração Crítica do Eletrólito (CCE)	29
3.6 - Efeito dos Complexos sobre Reações Químicas de Oximólise e Hidrólise	30
4 - Sistemas em Estudo	31
4.1 - Oximas	31
4.2 - Esquema Cinético	32
5 - Objetivos	35
Capítulo II - Parte Experimental	36
1 - Materiais	36
1.1 - Reagentes	36
1.2 - Preparação de Compostos	37
1.2.1 - Brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB)	37
1.2.1.1 - Preparação do Brometo de Dodecila	37
1.2.1.2 - Preparação do DoTAB	38
1.2.2 - Preparação do Acetato de p-Nitrofenila	41
1.3 - Equipamentos	43
2 - Métodos	45
2.1 - Concentração Micelar Crítica	45
2.2 - Cinéticas	46
2.2.1 - Cinética de Hidrólise dos Esteres Acetato de p-Nitrofenila (NPA) e Octanoato de p-Nitrofenila (NPO).	46
2.2.2 - Cinéticas de Oximólise dos Substratos NPA e NPO	47
2.3 - Medidas de pKa e pKa Aparente (pKap) das Oximas I e II	47
2.4 - Polarização e Fluorescência	48

Capítulo III - Resultados e Discussão	50
1 - Concentração Micelar Crítica do DoTAB em Presença e na Ausência de Hy	50
2 - Medidas Cinéticas	54
2.1 - Reação de Oximólise e Hidrólise de Ésteres de p-Nitrofenila em Presença e na Ausência de Hy-DoTAB ..	54
3 - Medidas de pKa e pKap das Oximas	64
3.1 - Medidas do pKa das Oximas em Água	65
3.2 - Medidas dos pKa Aparente (pKap) das Oximas em Presença de Miceias	69
4 - Medidas de Intensidade de Fluorescência	73
Capítulo IV - Conclusão	81
Tabelas	82
Referências Bibliográficas	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema ilustrativo da agregação de proteoglicânios com ácido hialurônico	2
Figura 02 - Unidade repetitiva do ácido hialurônico	4
Figura 03 - Esquema das ligações de hidrogênio proposta para a conformação do ácido hialurônico.....	5
Figura 04 - Processo de micelização	9
Figura 05 - Efeito da concentração do surfactante sobre as propriedades físicas: tensão superficial e condutância específica	11
Figura 06 - Diferentes estruturas de micela	15
Figura 07 - Representação esquemática de uma micela esférica catiônica	16
Figura 08 - Representação esquemática do complexo polímero-surfactante	22
Figura 09 - Representação esquemática do complexo PEO-SDS.....	23
Figura 10 - CMC de um agregado	25
Figura 11 - Concentração crítica do eletrólito (CCE)	30
Figura 12 - Estrutura das oximas	34
Figura 13 - Espectro de absorção no infravermelho do brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB)	39
Figura 14 - Tensão superficial e condutância específica do DoTAB	40
Figura 15 - Espectro de absorção no infravermelho do acetato de p-nitrofenila (NPA)	42

Figura 16 - Espectro de ressonância magnética nuclear do acetato de p-nitrofenila	43
Figura 17 - Arranjo geométrico de um polarizador	49
Figura 18 - Tensão superficial do DoTAB em 175mM de NaBr	51
Figura 19 - Tensão superficial do DoTAB em 1mM de Hy e 175mM de NaBr	53
Figura 20 - Tensão superficial do DoTAB em 2,5mM de Hy e 175mM de NaBr	53
Figura 21 - Efeito da concentração de DoTAB sobre a reação de oximólise do acetato de p-nitrofenila com a oxima II sem polímero e com 1mM de Hy em tampão borato pH 9,80 e 175 mM de NaBr (T=30°C)	56
Figura 22 - Efeito da concentração de DoTAB sobre a reação de oximólise do NPA com a oxima I sem e com 1 mM de Hy em tampão borato pH 9,80 e 175 mM de NaBr (T=30°C)	57
Figura 23 - Efeito da concentração de DoTAB na velocidade de hidrólise e oximólise do octanoato de p-nitrofenila (NPO) para as oximas I e II sem Hy em tampão borato pH 9,80 e 175 mM de NaBr (T= 30°C)	60
Figura 24 - Efeito da concentração de DoTAB na velocidade de hidrólise e oximólise do octanoato de p-nitrofenila (NPO) para as oximas I e II na presença de 1 mM de Hy em tampão borato pH 9,80 e 175 mM de NaBr (T= 30°C)	61
Figura 25 - Efeito da concentração do hialuronato na reação de oximólise do NPA com a oxima II, em presença de 25mM de DoTAB, tampão borato pH 9,80 e 175mM de NaBr (T= 30°C)	62
Figura 26 - Efeito da concentração do hialuronato na reação de oximólise do NPO com a oxima I, em presença de 25mM de DoTAB, tampão borato pH 9,80 e 175mM de NaBr (T= 30°C)	62

Figura 27 - Efeito da concentração do hialuronato na reação de oximólise do NPA com a oxima I, em presença de 25mM de DoTAB, tampão borato pH 9,80 e 175mM de NaBr (T= 30°C)	63
Figura 28 - Determinação do pKa em água da oxima II (T= 30°C)	66
Figura 29 - Determinação do pKa das oximas I e II em presença de 175mM de NaBr (T=30°C)	66
Figura 30 - Espectro de absorção UV-Visível das oximas I e II em 175 mM de NaBr em diferentes concentrações de NaOH (T=30°C)	69
Figura 31 - Efeito da [DoTAB] no pKa aparente (pKap) da oxima II em 175 mM de NaBr e pH=9,80 (T=30°C)	71
Figura 32 - Representação do vetor elétrico da radiação não-polarizada e polarizada	73
Figura 33 - Espectro de absorção UV-Visível para a sonda livre (NBD) e ligada no polímero (Hy-NBD)	75
Figura 34 - Intensidade de Fluorescência do Hy-NBD em função da [DoTAB] e CMC do DoTAB em presença de 1mM de Hy e 175 mM de NaBr (T=30°C)	78
Figura 35 - Polarização de Fluorescência em função da [DoTAB] em 175mM de NaBr (T=30°C)	78
Figura 36 - Intensidade de Fluorescência em função da % volume da mistura H ₂ O/THF	79
Figura 37 - Representação esquemática do complexo Hy-DoTAB em solução	80

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 01 - Exemplo de glicosaminoglicanos	3
TABELA 02 - Valores de tensão superficial do DoTAB em água	83
TABELA 03 - Valores de tensão superficial do DoTAB em presença de 175mM de NaBr	84
TABELA 04 - Valores de tensão superficial do DoTAB em presença de 1mM de Hy e 175mM de NaBr.....	85
TABELA 05 - Valores de tensão superficial do DoTAB em presença de 2,5mM de Hy e 175mM de NaBr.....	86
TABELA 06 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy (T=30°C)	87
TABELA 07 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na presença de 1mM de Hy (T=30°C)	87
TABELA 08 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy (T=30°C)	88

TABELA 09 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na presença de 1mM de Hy (T=30°C)	88
TABELA 10 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de hidrólise do NPA em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy (T=30°C)	89
TABELA 11 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy (T=30°C)	89
TABELA 12 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy (T=30°C)	90
TABELA 13 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de hidrólise do NPO em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy (T=30°C)	90
TABELA 14 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e 1mM de Hy (T=30°C)	91
TABELA 15 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em 1mM de Hy (T=30°C)	91

TABELA 16 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de hidrólise do NPO em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em 1mM de Hy (T=30°C)	92
TABELA 17 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima II em função da concentração de hialuronato, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e $2,5 \times 10^{-2}$ M de DoTAB (T=30°C)	92
TABELA 18 - Variação dos valores da constante de velocidade (K_{obs}) da reação de hidrólise do NPO com a oxima I em função da concentração de hialuronato, em presença de 175 mM de NaBr, pH 9,80 e em $2,5 \times 10^{-2}$ M de DoTAB (T=30°C)	93
TABELA 19 - Efeito da concentração de polímero sobre a reação de oximólise do NPA com a oxima I em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em $2,5 \times 10^{-2}$ M de DoTAB (T=30°C)	93
TABELA 20 - Determinação do pKa da oxima II em água. Variação dos valores de pH em função da expressão $\log[OX^-]/[HOX]$ nos comprimentos de ondas: 270, 291 e 300 nm	94
TABELA 21 - Determinação do pKa da oxima II em presença de 175mM de NaBr. Variação dos valores de pH em função da expressão $\log[OX^-]/[HOX]$ nos comprimentos de ondas: 270, 291 e 300nm (T=30°C)	95
TABELA 22 - Determinação do pKa da oxima I em presença de 175mM de NaBr. Variação dos valores de pH em função da expressão $\log[OX^-]/[HOX]$ nos comprimentos de ondas: 270, 291 e 300nm (T=30°C)	95
TABELA 23 - Determinação do pKa da oxima II em presença de 175mM de NaBr em diferentes concentrações de DoTAB (T=30°C)	96

- TABELA 24 - Variação dos valores de absorbância da oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 0,05M de NaOH e 175mM de NaBr. Os valores de A_{HOX} e A_{OX-} foram medidos em Tris/HBr, pH 8,0 e 1,0 M de NaOH, respectivamente 97
- TABELA 25 - Variação dos valores de absorbância da oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 0,05M de NaOH e 175mM de NaBr. Os valores de A_{HOX} e A_{OX-} foram medidos em Tris/HBr, pH 8,0 e 1,0 M de NaOH, respectivamente 98
- TABELA 26 - Variação dos valores de intensidade de fluorescência em diferentes planos vibracionais: horizontal-horizontal (H-H), horizontal-vertical (H-V), vertical-vertical (V-V) e vertical-horizontal (V-H) em presença de diferentes concentrações de DoTAB, 175mM de NaBr (T=30°C) 99
- TABELA 27 - Variação dos valores de polarização (P) e intensidade de fluorescência (I) do Hy-NDB, em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr (T=30°C) 100
- TABELA 28 - Variação dos valores de intensidade de fluorescência (I) do Hy-NBD, em função da concentração do tetrahidrofurano (THF), em presença de 175mM de NaBr (T=30°C) 100

ABREVIATURAS

- A_{HOX} = absorbância da espécie protonada
- A_{OX^-} = absorbância da espécie desprotonada
- A_{mis} = absorbância da mistura
- CMC = concentração micelar crítica
- CCE = concentração crítica do eletrólito
- CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio
- DeTAB = brometo de deciltrimetilamônio
- DoTAB = brometo de dodeciltrimetilamônio
- Hy = hialuronato
- Hy-DoTAB = complexo formado por DoTAB e Hy
- Hy-NBD = hialuronato modificado por uma sonda fluorescente
- I = intensidade de fluorescência
- I_{HH} = intensidade de fluorescência medidos com os polarizadores de excitação e emissão orientados nas posições horizontal e horizontal
- I_{HV} = idem (horizontal-vertical)
- I_{VV} = idem (vertical-vertical)
- I_{VH} = idem (vertical-horizontal)

K_w = constante de velocidade de 2^a. ordem na fase aquosa

K_m = constante de velocidade de 2^a. ordem na fase micelar

K_s = constante de incorporação do substrato na micela

K_{obs} = constante de velocidade observada

K_{OX^-/Br^-} = constante de troca iônica

NaHy = hialuronato de sódio

NPA = acetato de p-nitrofenila

NPO = octanoato de p-nitrofenila

NBD-F = 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol

Oxima I = acetofenoxima

Oxima II = 4-(9-carboxinonil)-1-(9-carboxi-
hidroxiiminonil)benzeno

P = grau de polarização de fluorescência

PEO-SDS = complexo formado por dodecilsulfato de sódio e
polióxidoetileno

PIE = Modelo de pseudo-fase com troca iônica

pK_{ap} = pK aparente

RMN = ressonância magnética nuclear

TTAB = brometo de tetradeciltrimetilamônio

THf = tetrahidrofurano

UV = ultra-violeta visível

[] = concentração molar

γ' = tensão superficial (dina/cm)

RESUMO

Estudou-se o efeito catalítico do complexo hialuronato-brometo de dodeciltrimetilamônio (Hy-DoTAB), em função da concentração de DoTAB, sobre reações de oximólise e hidrólise do acetato e octanoato de p-nitrofenila em presença de 1mM de Hy, tampão borato pH 9,80 e em 175mM de NaBr. Foram utilizados dois nucleófilos de distintas hidrofobicidades, acetofenoxima (hidrofilica) e 4-(9-carboxinonil)-1-(9-carboxi-1-hidroxi-iminonil)benzeno (alta hidrofobicidade) e observou-se que os perfis, constante de velocidade observada versus concentração do surfactante são diferentes, estritamente relacionados com suas diferentes hidrofobicidades. Para efeito de comparação, verificou-se também o efeito catalítico do DoTAB na ausência de Hy e, para ambos os nucleófilos, os perfis cinéticos são análogos aos perfis quando Hy está presente. Sob o ponto de vista cinético, a influência do complexo Hy-DoTAB sobre as reações de oximólise nas condições analisadas, é análogo àquela exercida por micelas normais de surfactante DoTAB. As conclusões mais significativas e esclarecedoras deste trabalho, foram a partir dos resultados de polarização e intensidade de fluorescência da sonda (4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), ligada covalentemente no polímero. A formação do complexo Hy-DoTAB a altas concentrações de NaBr é consistente com o aparecimento de micelas livres associadas ao polímero aniônico.

ABSTRACT

Was studied the effect of the hyaluronate-dodecyltrimethylammonium bromide complex on the rate of oximolysis and hydrolysis of p-nitrophenylacetate and p-nitrophenyloctanoate, at 175 mM of NaBr, pH 9,80, as a function of the surfactant concentration. Was used two different hydrophobic oximes, acetophenoxime and 4-(9-carboxynonanyl)-1-(9-carboxi-1-hydroxyiminonanyl) benzene and it was found that the shapes of the rate surfactant concentration profiles for the oxymolysis by the nucleophiles are different concerning to the respective hidrophobicities. Also it was not observed significant differences on the profiles in the presence and absence of 1mM of Hy polymer, meaning that, at these experimental conditions, Hy-DoTAB complex exhibits similiar Kinetic behavior to normal micelles of DoTAB. The more expressive results in this work, were observed by measuring the fluorescence intensitie and the depolarization in the presence of 175 mM NaBr, of the complex formed by the hyaluronate, partially modified by a covalently bound fluorescent probe (4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole). Formation of the surfactant-polymer complex at high concentration of salt is consistent with appearence of free micelle associate with the anionic polymer.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 - Ácido Hialurônico

Alguns tipos de polissacarídeos têm sido muito estudados em razão de situarem-se sobre a superfície das células e estarem envolvidos em fenômenos de reconhecimento celular. Entre estes compostos estão os glicoesfingolípídeos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (ou mucopolissacarídeos).

Os glicosaminoglicanos ácidos são macromoléculas pertencentes a uma família de polissacarídeos carregados (biopolieletrólitos) constituídos de duas ou mais unidades monoméricas de monossacarídeos diferentes, distribuídas por todo tecido conetivo. O membro mais abundante desta classe é o ácido hialurônico.

O ácido hialurônico é um polímero linear de alto peso molecular aproximadamente 5×10^6 com mais de 10.000 unidades dissacarídicas que conferem alta viscosidade em soluções aquosas. É encontrado nas válvulas do coração, na pele e em concentrações elevadas no humor vítreo dos olhos, nos

líquidos sinoviais, cordão umbilical, paredes vasculares, cartilagens e na crista de galo (onde sua concentração depende da influência da testosterona). Ocorre ligado aos proteoglicânios pelo seu centro protéico através de uma proteína de ligação. Estes tipos de agregados dão origem às estruturas complexas de ordem superior (Fig.01).

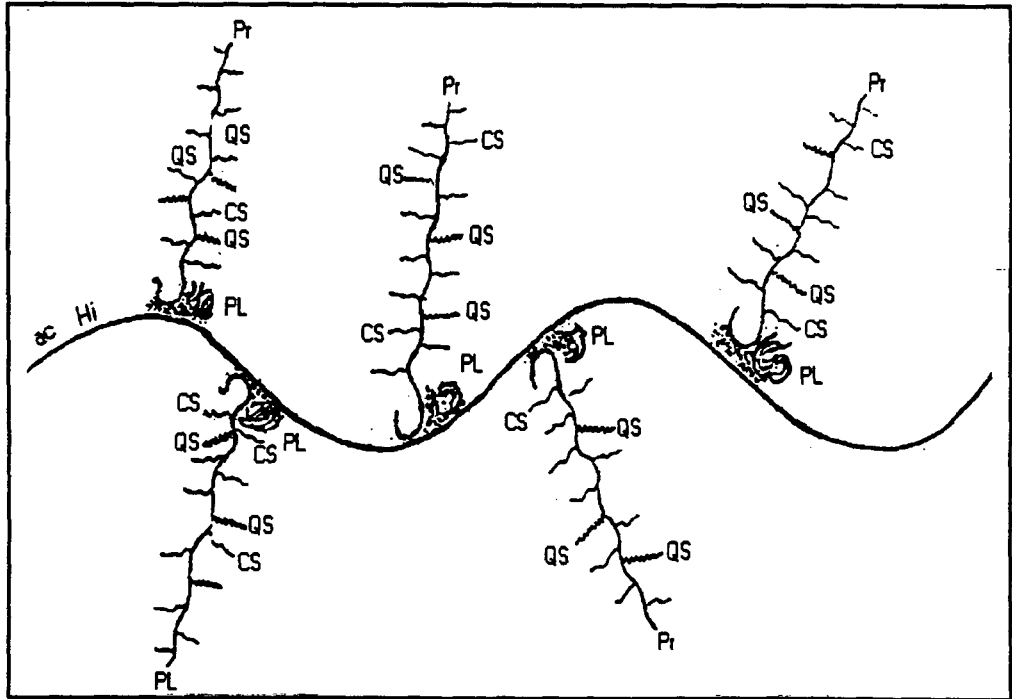


Fig. 01 - Esquema ilustrativo da agregação de proteoglicânios com ácido hialurônico (Ac.Hi), ligado diretamente através de uma parte protéica (Pr) e de uma proteína de ligação (PL), CS identifica as cadeias de condroitino-sulfato e QS as de queratam-sulfato.

Pertencem ainda a esta classe β -heparina e o queratam-sulfato, cujos derivados são importantes componentes das cartilagens, dos ossos e da córnea. A β -heparina (ou dermatam-sulfato) e o queratam-sulfato são polímeros facilmente reconhecidos por suas propriedades anticoagulantes, sendo encontrados no fígado, pulmão e artérias (Tab.01).

TABELA 01 - Exemplos de Glicosaminoglicanos

POLISSACARÍDEO	CONSTITUINTES	OCORRÊNCIA
Ácido hialurônico	Ácido glucurônico, <i>N</i> -acetil-D-glucosamina	Líquido sinovial
Condroitina	Ácido glucurônico, <i>N</i> -acetil-D-galactosamina	Córnea
Condroitina-4-sulfato	Ácido glucurônico, <i>N</i> -acetil-D-galactosamina-4-sulfato	Cartilagem
Dermatam-sulfato	Ácido idurônico, <i>N</i> -acetil-D-galactosamina-4-sulfato	Pele
Queratam-sulfato	Galactose, galactose-6-sulfato, <i>N</i> -acetil-D-galactosamina-6-sulfato	Córnea
Heparina	Glucosamina-6-sulfato, ácido glucurônico-2-sulfato, ácido idurônico	Pulmão

As composições dos glicosaminoglicanos nos tecidos variam com a idade do indivíduo. Por exemplo, a concentração de queratam-sulfato nos tecidos aumenta com a idade, enquanto que a concentração de condroitina-sulfato (nos discos vertebrais) bem como o ácido hialurônico (na pele) diminuem com a idade. Entretanto, quando há uma formação excessiva de glicosaminoglicanos no corpo pode acontecer uma série de problemas como retardamento mental, gargolismo e deformações esqueléticas chamadas mucopolissacaridoses. Isto acontece porque algumas enzimas responsáveis pela degradação dos glicosaminoglicanos apresentam falhas genéticas em sua estrutura ^{1, 2 e 3}.

1.1 - Estrutura

Em 1953 Weissmann e Meyer propuseram uma estrutura para o ácido hialurônico através de estudos por oxidação com periodatos. O ácido seria formado por unidades alternadas do ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina. Os dois diferentes monossacarídeos são ligados por uma unidade β -1,3 formando um dissacarídeo que se liga na próxima unidade por ligação glicosídica β -1,4 (Fig. 02).

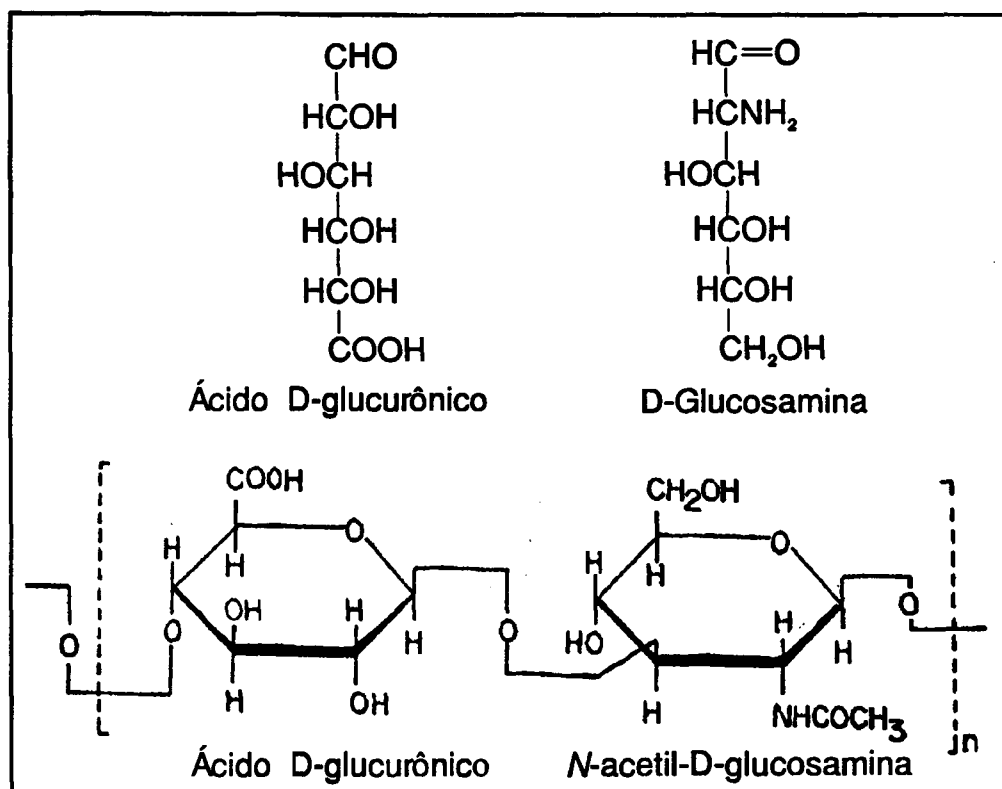


Fig. 02 - Unidade repetitiva do ácido hialurônico.

Edwin e colaboradores estudaram as conformações e interações dinâmicas do ácido hialurônico em solução e no estado sólido e observaram uma considerável versatilidade na conformação estrutural. Essa conformação do polímero é bastante influenciada pela contaminação por outros glicosaminoglicanos, pela natureza do contra-íon, grau de hidratação e pH do meio. A influência dominante parece ser a do contra-íon. Quando em presença de íons cálcio, o hialuronato cristaliza-se de uma forma bem diferente daquela quando em presença de íons monovalentes, cristalizando-se em forma de hélice em soluções levemente acidificadas (desta forma o ácido hialurônico apresenta uma simetria enroscada para a esquerda na forma de hélice). Uma explicação razoável para as suas cadeias rígidas poderia ser existência das ligações de hidrogênio que seriam estereoquimicamente incluídas dentro da cadeia do ácido hialurônico. Desta forma, a configuração "trans" favoreceria uma estrutura espiral com os dois grupos acetoamidas envolvidos na ligação (Fig.03) ^{4,5}.

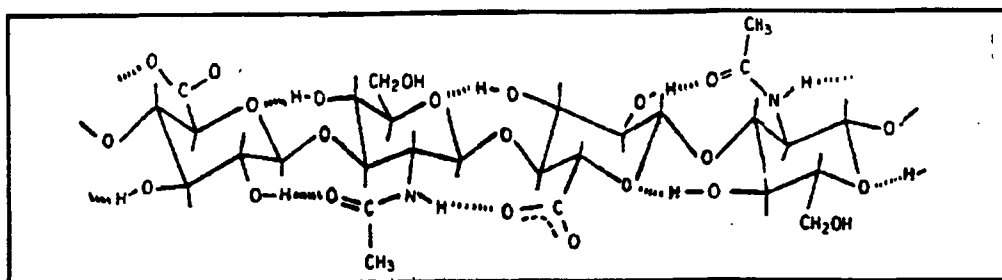


Fig. 03 - Esquema das ligações de hidrogênio proposta para a conformação do ácido hialurônico.

1.2 - Propriedades Físicas e Químicas

O ácido hialurônico apresenta os seus grupos carboxilados completamente ionizados em pH 7, conferindo solubilidade em água cuja solução adquire um aspecto gelatinoso formando soluções altamente viscosas até mesmo em baixas concentrações (0,1% ou menos), podendo ocupar 80% do total da viscosidade em alguns fluidos biológicos^{2, 6 e 7}.

Os métodos empregados para preparar e purificar estes polímeros dependem muito de sua estrutura carregada. Alguns métodos físico-químico (espectrofotométrico, turbidez e titulação) são utilizados de maneira suave sem causar quebras na cadeia polimérica⁸. A diálise é também muito usada na remoção de sais, aminoácidos e peptídeos.

O ácido hialurônico tem vários grupos que podem ser modificados através de reações químicas características, como por exemplo, hidrólise do grupo N-acetoamido para a amina ligado ao carbono C-2 da unidade D-glucosamina; esterificação do grupo carboxílico ou ainda em reações de deslocamento nucleofílicos pelas hidroxilas. Em todos esses processos é necessário preservar a identidade natural do polímero como o peso molecular e as unidades monoméricas repetitivas da cadeia, juntamente com os grupos funcionais. Sendo assim, deve-se evitar meios ácidos que resultariam em hidrólises dos grupos acetais e em consequência fragmentação das cadeias. Um meio fortemente básico tam-

bém pode provocar quebras das cadeias. O efeito de NaOH na conformação, interação, difusão e velocidade de hidrólise do ácido hialurônico foi observado utilizando técnica de espalhamento de luz. O resultado encontrado foi a quebra intramolecular das ligações glicosídicas e destruição das ligações de hidrogênio causando com isso diminuição das interações intermoleculares. Uma concentração de 0,1M de hidróxido é suficiente para causar quebras da cadeia polimérica⁹.

A quebra da cadeia é observada também por uma diminuição da viscosidade da solução. Esta diminuição pode ser medida se a viscosidade da solução polimérica estiver quantitativamente relacionada com o peso molecular do polímero. As mudanças de viscosidade então, podem ser calculadas através de um número médio de quebras de cadeia por molécula¹⁰.

1.3 - Importância Biológica

O ácido hialurônico apresenta grande importância biológica, todas relacionadas com suas propriedades polieletrólíticas. Basicamente as suas principais funções estão relacionadas com a manutenção da pressão osmótica e compressibilidade nos tecidos conectivos (em cartilagens, ossos e veias). Outras com importantíssimo papel no corpo no que se refere às propriedades de transportes e mecânicas, conferem elasticidade nos joelhos e rigidez aos discos das vértebras.

São utilizados na área médica para controlar a viscosidade do sangue, na manutenção da pressão osmótica durante uma cirurgia oftalmológica e na cura de feridas da pele. Atualmente estão sendo testados como diagnóstico do câncer, observando glicosaminoglicanos marcados extraídos de pacientes. Uma boa molécula marcada identificaria a doença e atuaria como guia nos vários estágios do câncer¹¹. Na indústria cosmética é utilizado na forma de sal, na fabricação de pomadas para a pele, pois é um excelente emulsificante.

2 - Sistemas Micelares - Surfactantes

Estudos dos efeitos de sistemas com interfaces carregadas sobre reações químicas apresentam uma série de aspectos importantes. Alguns desses envolvem muitas vezes reações catalisadas ou inibidas por sistemas como polieletrólitos, ciclodextrinas e micelas. Estas reações frequentemente ocorrem na interface entre o solvente, usualmente água ou uma mistura de soluções orgânicas e os agregados. Outras reações, como catálise enzimática e complexação de enzimas, também são estudadas em interfaces carregadas e muitas delas tem grande interesse biológico ¹².

2.1 - Definição e Classificação

As substâncias que são absorvidas na superfície aquosa atuam no sentido de diminuir a sua tensão superficial. Essas substâncias, denominadas de surfactantes ou agentes tensoativos, pertencem à classe de compostos chamados anfífilicos, cuja estrutura molecular é constituída por uma parte polar e outra apolar. A parte polar consiste de uma cabeça hidrofílica (afinidade pela água) enquanto que a parte apolar de uma longa cadeia parafínica hidrofóbica (pouca afinidade pela água), geralmente com 8 a 18 átomos de carbono, denominada de "cauda" ^{13, 14}.

Existem uma variedade de tipos estruturais de surfactantes que são classificados conforme a natureza do grupo hidrofílico, podendo ser catiônicos, aniônicos, zwitteriônicos e não-iônicos. Os catiônicos possuem a parte hidrofí-

lica da molécula constituída por um átomo ou um grupo carregado positivamente. É de especial interesse os surfactantes cuja cabeça é constituída por nitrogênio quaternário. Apresentam importantes aplicações no setor industrial, por exemplo, inibidores de corrosão, lubrificantes, emulsificantes e na fabricação de amaciantes de roupa. No setor da saúde é muito utilizado na inibição de microorganismo, pois são excelentes bactericidas. Ainda são utilizados como catalisadores de reações químicas^{15,16}. Os aniônicos apresentam a parte hidrofílica carregada negativamente, sendo que os mais comuns são constituídos por grupos sulfonatos, fosfatos ou carboxilatos. Já os não-iônicos apresentam uma região mais polar que a outra proporcionando afinidade pela água. Os zwitteriônicos apresentam grupamentos com características ácida ou básica e passam a ter comportamento aniônico ou catiônico dependendo do meio em que se encontram¹⁷. O esquema 1 mostra exemplos baseados na classificação acima definida.

- | |
|--|
| (a) $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$
brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB) |
| (b) $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{SO}_4^- \text{Na}^+$
dodecilsulfato de sódio (SDS) |
| (c) $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n \text{N}^+ (\text{CH}_3)_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{COO}^-$
propionato de N-alkuil-N,N-dimetil- β -amônio |
| (d) $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_n - \text{C}_6 \text{H}_4 - \text{O} - (\text{CH}_2 \text{CH}_2 - \text{O})_m \text{H}$
n-alkuilfenol-m-polioxietileno |

Esquema 1 - Exemplos de alguns surfactantes: (a) catiônico; (b) aniônico; (c) zwitteriônico e (d) não-iônico.

2.2 - Micelas - Concentração Micelar Crítica (CMC)

As micelas são agregados coloidais formadas por moléculas de surfactantes em equilíbrio com seus monômeros. Os monômeros rearranjam-se espontaneamente de tal forma que adquirem uma conformação termodinâmica estável. O processo de agregação, também chamado de micelização, é ilustrado na figura 04. A energia livre do processo de micelização terá que ser negativa para que a agregação seja espontânea. Parâmetros físico-químicos como entalpia (H) e entropia (S), que estão relacionados com a energia livre do sistema ($G = H - TS$), podem ser usados para estimar as mudanças que acontecem no processo de micelização. Os agregados apresentam muitas aplicações importantes em processos de emulsificação, extração, catálise, modelo de membranas e solubilização^{18, 19 e 20}.

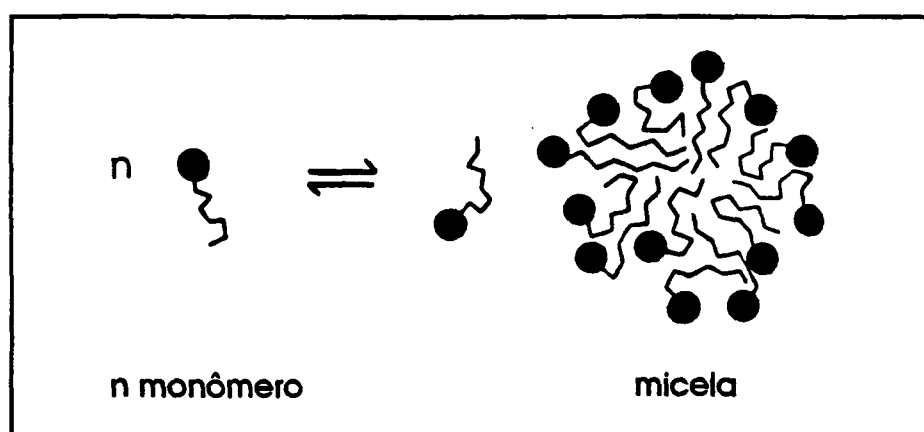


Fig. 04 - Processo de micelização.

Os surfactantes catiônicos e aniônicos, na ausência de sal, geralmente agregam-se em número de 50 a 100 monômeros por micelas (número médio de agregação)¹⁵.

Os agregados micelares podem apresentar estruturas que dependem do solvente onde são formados. Quando uma molécula de surfactante é dissolvida na água, ela orienta-se de forma que a região hidrofílica da molécula fica voltada para a água e a parte hidrofóbica voltada para o interior da micela,

denominadas de micelas aquosas (por exemplo, brometo de dodeciltrimetilamônio). Neste caso, considerando uma dispersão, a água seria a fase contínua. Quando as micelas apresentam os seus grupamentos hidrofóbicos voltados para o solvente apolar (benzeno ou hexano) e a parte hidrofílica voltada para "dentro" temos as micelas reversas, por exemplo, di-2-etilhexilsulfosuccinato de sódio (aerosol AOT). As micelas naturais ocorrem em abundância nos organismos vivos e apresentam importantíssimo papel no que confere às interações com proteínas e emulsificações de gordura (por exemplo, lecitinas)^{21, 22}.

À medida que a concentração do surfactante em solução aquosa é aumentada, várias propriedades físicas da solução mudam repentinamente. A mudança da propriedade está relacionada com o aparecimento em solução de agregados (micelas). A concentração máxima das moléculas do monômero na qual começa a formação de micelas é chamada CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC). É o parâmetro mais exato para informar sobre o ponto de formação das primeiras micelas e é considerada uma propriedade de destaque dos anfifílicos. Entre as propriedades físicas que são utilizadas para determinar o valor da CMC em determinadas condições experimentais são: Tensão Superficial, Condutividade, Viscosidade, Espectroscopia e Índice de Refração. Os métodos são fundamentados em medidas das propriedades antes e depois da formação do agregado. A CMC corresponde ao ponto médio da inflexão da curva, que depende de fatores como: hidrofobicidade da cadeia parafínica, carga do surfactante, natureza do grupo polar e do contra-íon, do tipo e da concentração do eletrólito adicionado, da temperatura e pressão^{22, 23}. A figura 05 ilustra as variações de duas propriedades físicas, tensão superficial e condutância específica, em função da concentração do surfactante e o intervalo onde começa a surgir as primeiras micelas ou mais precisamente, a faixa de saturação de monômeros em água. Abaixo da concentração crítica micelar existem monômeros atuando como eletrólitos fortes, cuja concentração, na maioria dos casos, é considerada constante em concentrações acima da CMC^{24,25}.

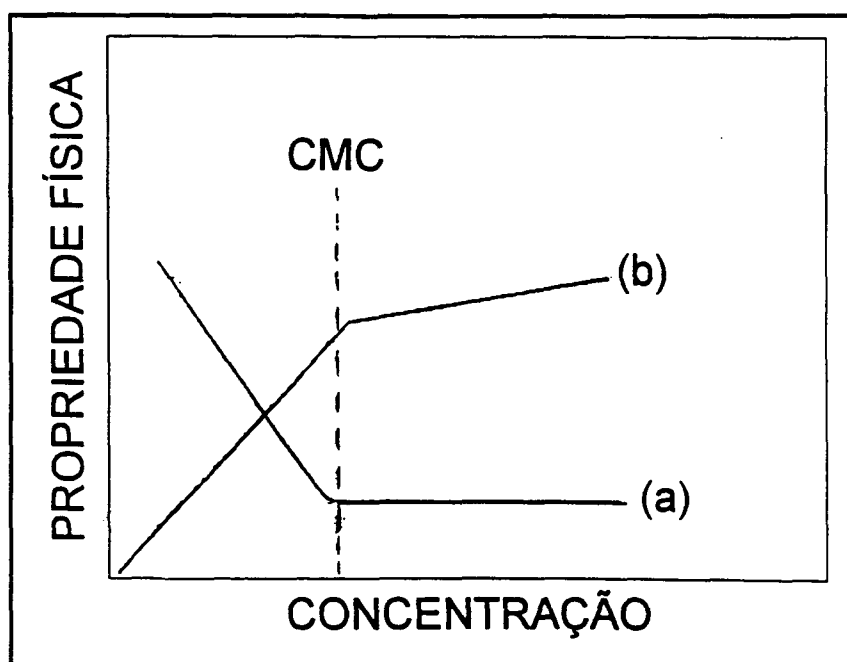
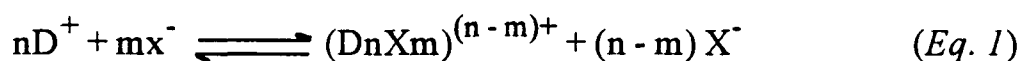


Fig. 05 - Efeito da concentração do surfactante sobre as propriedades físicas (a) tensão superficial e (b) condutância específica^{26, 27}.

A formação termodinâmica das micelas tem sido considerada como base nos modelos que incluem ação das massas, separação de fase e teoria esférica da dupla camada. O modelo de separação de fase considera a formação das micelas como uma separação de duas regiões distintas que acontece na faixa da CMC, conduzindo a mudanças de propriedades físico-químicas. O modelo de ação das massas considera um equilíbrio dinâmico entre monômeros e agregado²⁵, equação 1.



onde D é o surfactante catiônico ou aniônico, X é um contra-íon com carga oposta à molécula de surfactante, n é o número de monômeros e m é o número de contra-íons ligados. A equação representa o arranjo dinâmico dos monômeros para atingirem uma forma estável através de associações sucessivas de equilíbrio químico²⁸.

2.3 - Fatores que Afetam a Concentração Micelar Crítica

Existem muitos fatores que afetam a concentração micelar crítica, induzindo a um abaixamento ou aumento no seu valor. Estes efeitos são importantes, pois informam sobre a atividade superficial do surfactante em contato com a superfície do componente adicionado.

A CMC diminui logaritmicamente com o aumento da cadeia parafínica. Esta dependência é expressa pela equação 2, onde A e B são constantes para uma série homóloga e m é o número de átomos de carbonos.

$$\log \text{CMC} = A - Bm \quad (\text{Eq. 2})$$

Para os surfactantes não-iônicos os valores de CMC geralmente são muito pequenos quando comparados com os surfactantes iônicos¹².

A adição de aditivos como eletrólitos também causam diminuição na CMC. Os valores de CMC medidos em presença de sal são interpretados como uma redução das forças repulsivas entre as cabeças do surfactante causando mudanças estruturais^{12, 29}. A expressão matemática deduzida para este efeito é uma relação logarítmica do tipo:

$$\log \text{CMC} = -K \log[\text{Sal}] + \text{Constante} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde K é uma constante experimental e apresenta valores entre 0,4 - 0,6²⁹.

Reações químicas cujos reagentes são espécies positiva ou negativa podem ser afetadas dramaticamente pela adição de sal na solução, causando alteração das propriedades de superfície como: mudança da polaridade, pH, potencial de superfície e troca iônica. A presença de sal ainda altera significativamente o valor da constante de velocidade e de equilíbrio^{22, 30}. Portanto, a adição de eletrólitos promove micelização de surfactantes iônicos porque eles estabilizam as micelas por neutralização parcial das cargas das cabeças iônicas que dependem fortemente da natureza do contra-íon. Para contra-íons monova-

lentes a CMC de surfactantes iônicos diminui segundo a ordem: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ e para contra-íons divalentes a CMC também diminui obedecendo a ordem: $\text{Mg}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{Sr}^{+2} > \text{Ba}^{+2}$. Quando o contra-íon for um haleto, a ordem mantém-se: $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. A interação predominante entre as cabeças e os contra-íons é puramente eletrostática sem perda de água de hidratação pelos contra-íons ou pelos grupos iônicos do surfactante na formação das micelas³¹.

Outros fatores como, a presença de grupos polares na cadeia parafínica, o tipo de grupos hidrofílico, temperatura, pressão entre outros estudados por Shinoda²⁹ alteram significativamente o valor da CMC.

2.4 - Estrutura: Tamanho e Forma - Modelos Micelares

As soluções de surfactantes são fascinantes e revelam muitas propriedades interessantes ao redor da CMC. A geometria micelar é um assunto polêmico que tem inspirado muitos estudos. O tamanho e a forma destes microreatores³² tem sido descritos por modelos audaciosos que permitem avaliar sua estrutura. Primeiramente, McBain propôs um modelo esférico para micelas iônicas e lamelar para as micelas neutras. Harkins e Mittelman propuseram um modelo cilíndrico. Philipoff disse que a micela apresentava uma dupla camada ionizada e parcialmente hidratada. Debye propôs uma micela cilíndrica formada por uma distensão lateral da micela de Hartley. Para Stigter a micela seria um agregado esférico composto por três regiões distintas: o núcleo, a camada de Stern e a dupla camada difusa de Gouy-Chapman. O núcleo seria formado por cadeias parafínicas cujo raio seria aproximadamente o comprimento da cadeia esticada. A superfície seria lisa e entre o núcleo e a superfície estaria a camada aquosa de Stern com "n" cabeças iônicas do surfactante

micelizado e $(1-\alpha)n$ contra-íons, sendo que α seria o grau de ionização definido como uma medida da distribuição entre a fase micelar e a fase aquosa. O modelo "bloco de surfactante" foi proposto por Fromherz, que consiste de cadeias paralelas e ortogonalmente congregadas para formar as micelas. Para Menger, além das cadeias parafínicas estarem reunidas no núcleo, haveria alguns monômeros flutuando na periferia junto com as cabeças iônicas. A sua micela seria altamente porosa com vazios na cadeia parafínica, possibilitando a penetração de água até no sétimo átomo de carbono. Cabane não concorda com os argumentos de Menger e afirma que não há água no núcleo da micela reafirmando que a superfície da micela seria lisa. Esta micela seria formada por duas regiões: uma camada que contém carga hidratada e água e uma outra camada que contém o primeiro CH_2 hidratado. Atualmente o modelo mais consistente com os vários dados experimentais é o modelo proposto por Hartley, que considera a micela esférica com os grupos hidrofóbicos voltados para o centro e os grupos hidrofílicos voltados para a periferia da micela. Hartley reforça a idéia que abaixo da CMC existem eletrólitos fortes e que na CMC começa o processo de agregação^{33, 34}.

As micelas são frequentemente pequenos agregados esféricos, mas podem mudar esta forma quando se aumenta a concentração de surfactante e com isso, a micela poderia adquirir uma forma mais ampla tornando-se cilíndrica. Com um aumento posterior da concentração de surfactante, o empacotamento hexagonal torna-se predominante. Numa fase mais rica em surfactante pode-se encontrar cristais sólidos de surfactante. Finalmente, em altas concentrações de surfactante em presença de um aditivo apolar com pouca quantidade de água, a micela inverte sua forma^{35, 36}. A figura 06 mostra o espetacular arranjo das possíveis estruturas formados por surfactante em determinadas condições físico-químicas. O "crescimento" das micelas é muito sensível às mudanças do meio, como por exemplo, tornando-se favorável por adição de eletrólitos, pelo comprimento da cadeia do surfactante ou, ainda, por influência

da temperatura. A diferença de energia entre a forma esférica e a lamelar não é muito significativa. Mas, a entalpia de formação micelar, que tem um valor de $-2,2$ KJ/mol para o SDS em água torna-se muito mais exotérmica quando se adiciona um eletrólito no meio (por exemplo, NaCl). Para surfactantes catiônicos o crescimento micelar é surpreendente, pode aumentar com a diminuição de temperatura e com o aumento do tamanho do contra-íon (Br^- , Cl^- e I^-)²⁵.

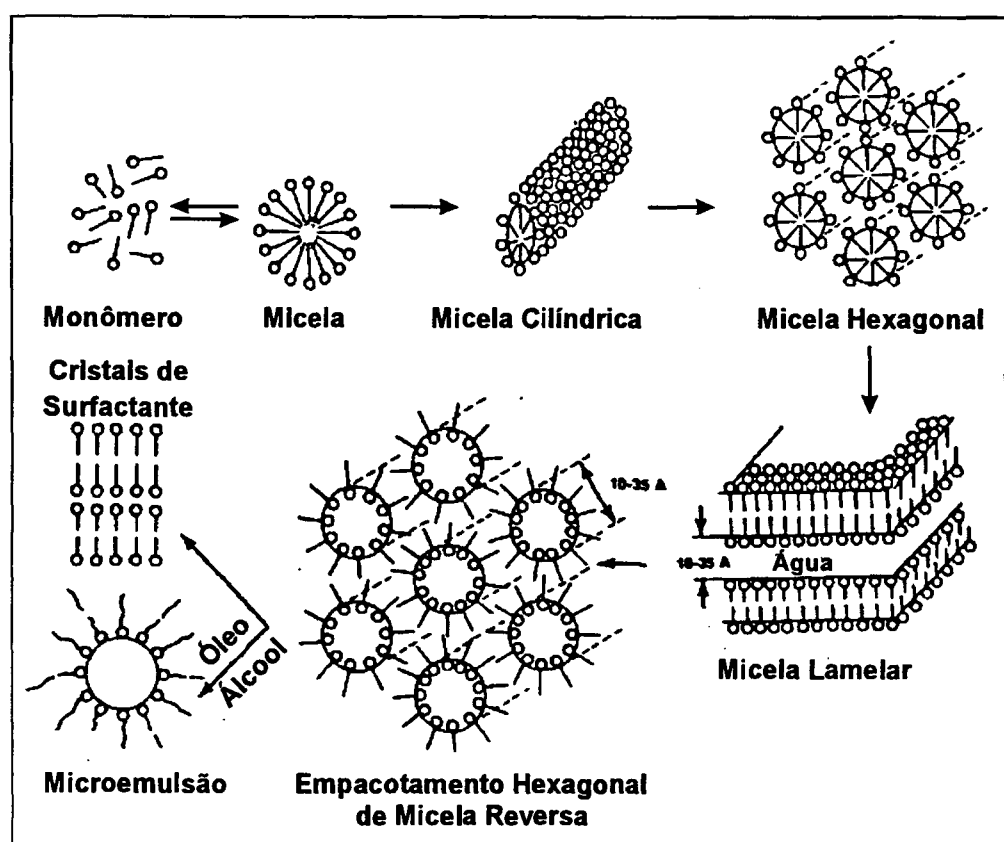


Fig. 06 - Diferentes estruturas da micela.

O modelo proposto por Stigter tem ajudado na interpretação de modificações das propriedades micelares como o efeito de aditivos e de tamanho das cabeças do surfactante. A representação esquemática de um corte na micela de Stigter pode ser visualizada na figura 07, onde pode-se distinguir as regiões características desse modelo. Admite que a micela é composta por três regiões distintas arranjadas num agregado esférico. O núcleo da micela seria composto pelas cadeias parafínicas de moléculas de surfactante. Circulando o núcleo estão

as cabeças polares do surfactante, junto com um certo número de contra-íons (0,6-0,9/grupos iônicos), constituindo a parte hidrofílica localizada na interface água/ micela. Os contra-íons que atuam na interface, conferem neutralidade elétrica ao sistema. Esta é a chamada região de Stern. A largura da região de Stern é aproximadamente o tamanho da cabeça do surfactante. Por último, tem-se uma região contendo contra-íons mais compactamente associados numa dupla camada elétrica e difusa, chamada de região de Gouy-Chapman^{14,15,32}.

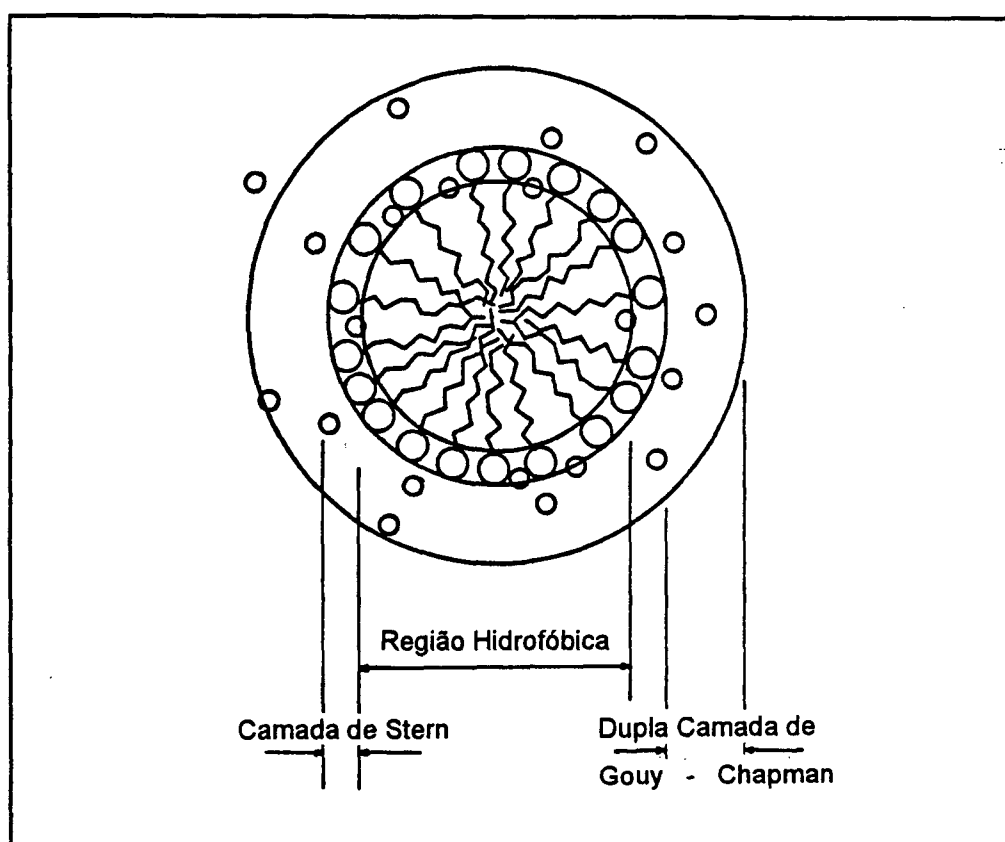


Fig. 07 - Representação esquemática das regiões de uma micela esférica catiônica de DoTAB. Os contra-íons são representados por (Br^-), as cabeças polares por (N^+) e as cadeias parafínicas por ($\wedge\wedge\wedge\wedge$).

Stigter aceitava que os íons na camada de Stern estariam hidratados comportando-se como esferas duras e que na extensão desta camada não haveria dependência da força iônica. Romsted^{31,37} concordava com os argumentos de Stigter e reafirmava que o grau de dissociação e a concentração de contra-íons

na camada de Stern são essencialmente independente da concentração do surfactante e da força iônica. Para Romsted, tanto um substrato orgânico como um contra-íon, na camada de Stern, estariam sujeitos a um potencial invariável com o aumento da concentração do contra-íon hidrofílico. O grau de dissociação(α) daria uma medida precisa da distribuição de contra-íons entre a fase micelar e a fase aquosa, sendo que mudanças em α refletiriam impecavelmente em mudanças da concentração de contra-íons na camada de Stern. Qualquer excesso posterior de contra-íons que circundam a dupla camada difusa de Gouy-Chapman, neutralizaria a carga da micela³⁸.

2.5 - Reações Químicas em Sistemas Micelares

As reações químicas que ocorrem em interfaces carregadas, produzem efeitos catalíticos ou inibitórios sobre a velocidade das reações, causado pela incorporação dos reagentes na micela. Estes efeitos são controlados por dois fatores: interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. As interações eletrostáticas são caracterizadas pelas forças atrativas e repulsivas dos grupos carregados e contra-íons. O efeito hidrofóbico é acentuado quando há interação entre substratos e surfactantes, ambos com longa cadeia parafínica²². Hartley observou que micelas aniônicas aumentam a velocidade da reação para substrato de moléculas catiônicas enquanto que micelas catiônicas inibem (devido à repulsão das cargas). Este efeito é causado pela habilidade das micelas de incorporar bem ou mal moléculas carregadas¹². A grande maioria das reações estudadas em sistemas micelares ocorrem provavelmente na superfície micelar, isto é, na camada de Stern. Por exemplo, estão incluídas reações como hidrólise básica de ésteres p-nitrofenil-n-alcanoatos que são definidos pela expressão matemática da velocidade:

$$\text{velocidade} = k_{obs}[ST] = k_2[ST][NT] \quad (\text{Eq. 4})$$

onde S é o substrato e N é o segundo reagente ($[N] \geq 10[S]$). O índice T refere-se a concentração total em moles/litro de solução, k_{obs} é a constante de velocidade observada de primeira ordem e k_2 é a constante de velocidade de segunda ordem³².

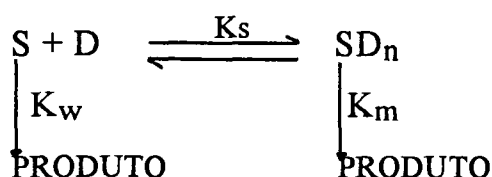
Muitos modelos matemáticos tem sido propostos para avaliar a reatividade de micelas em reações químicas e ajustar os dados às condições experimentais. Estes modelos consideram que os reagentes se distribuem em duas fases, aquosa e micelar.

O modelo de Berezin é utilizado para reações unimoleculares e bimoleculares envolvendo substratos neutros.

O modelo de Romsted que suporta a teoria da troca iônica (PIE), considera não só o contra-íon distribuindo-se na camada de Stern, como qualquer outro íon adicionado, implicando numa troca de íons da fase aquosa para a fase micelar. Este modelo assume ainda que a micela se encontra numa pseudo-fase separada e que o grau de dissociação (α) do surfactante pode ser considerado constante. O modelo de Romsted não se aplica às reações em presença de tampão e a dissociação de ácidos e bases fracas.

O modelo de Quina e Chaimovich considera a teoria de troca iônica permitindo analisar os efeitos interfaciais sobre a velocidade de reações em sistemas micelares tamponados e não-tamponados com substratos de carga oposta à micela bem como estudar as reações em presença de sal^{33, 39,40}.

Um tratamento quantitativo do efeito cinético das micelas sobre reações unimoleculares, baseia-se no modelo de pseudo-fase expresso pelo esquema :



ESQUEMA 2

Através desse esquema podemos observar que o substrato S forma um complexo com a micela D_n. O equilíbrio dinâmico é dado por K_s, constante de ligação do substrato. K_w e K_m são as constantes de velocidade de primeira ordem nas pseudo-fases aquosa (w) aquosa e micelar (m), respectivamente. A constante de ligação K_s é definida pela equação 5:

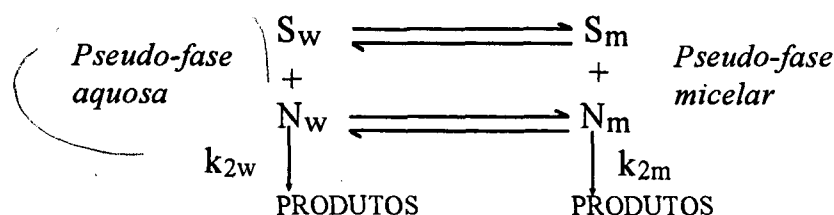
$$K_s = \frac{[SD_n]}{[S][D_n]} \quad (\text{Eq. 5})$$

As concentrações são escritas em termos do volume total da solução e D_n o surfactante micelizado. Onde:

$$[D_n] = [D_T] - \text{CMC} \quad (\text{Eq. 6})$$

sendo [D_T] a concentração total do detergente¹².

Para reações bimoleculares, o tratamento matemático é semelhante ao caso anterior e pode ser definido pelo esquema 3:



ESQUEMA 3

As constantes k_{2w} e k_{2m} significam as constantes de velocidade de segunda ordem nas pseudo-fases aquosa e micelar, respectivamente³². Os valores das constantes de velocidade são muito afetadas pela mudança de velocidade do substrato quando passa do meio aquoso para o meio micelar, definido pelo equilíbrio do esquema 3. O processo causado pela passagem do substrato da fase aquosa para a fase micelar é afetado pelo aumento da concentração dos reagentes no meio micelar, o que causa uma maior interação iônica e hidrofóbica das moléculas dos reagentes e das micelas⁴¹.

3 - Interação Polímero-Surfactante

3.1 - Considerações Gerais

A formação de complexos entre polímero e surfactante é um assunto que tem sido vastamente explorado desde muitas décadas. O estudo da formação e existência de lipo-proteínas agregadas em fluidos biológicos foi o trabalho precursor desta área. Na década de 40 foram estudados interações de proteínas com surfactantes iônicos, com o objetivo de avaliar a relevância dos fatores eletrostáticos do sistema contendo um surfactante carregado. Sistemas envolvendo polímero sintético não-iônico e surfactante iônico foram muito estudados nas décadas de 50 e 60. Saito contribuiu muito com seus trabalhos de complexação de surfactantes não-iônicos, com polímeros polietoxilados e ácidos policarboxílicos, sendo considerado o grande pioneiro dessa área ⁴².

A recuperação de polissacarídeos do tecido epitelial exigia reações suaves que evitassem quebras das ligações peptídicas. O método da diálise foi utilizado frequentemente para remover sais e moléculas pequenas que apareciam como subprodutos da extração. A técnica de extração era feita utilizando volumes de etanol na presença de sais. O processo era considerado fácil, porém exigia muitas etapas e em algumas vezes o precipitado obtido era insolúvel em água. Uma técnica alternativa envolvia titulações de surfactantes em soluções poliméricas sob determinadas condições de pH, isto é, a solução era tamponada com borato pH 9-10, no caso dos queratam-sulfato, e pH neutro no caso do ácido hialurônico, até formação do complexo polímero-surfactante que precipitava

em solução. Este tipo de associação envolvendo técnicas de recuperação de polissacarídeos pela agregação de surfactante foi observado por Kuhn em 1940⁸.

A interação entre polímeros sintéticos ou macromoléculas biológicas com surfactantes tem importâncias biológicas (separação de proteínas ligadas em membranas), químicas (solubilização de polímeros, mudanças conformacionais de biopolímeros, floculação, flotação mineral, tintas para roupas e recuperação de óleos), farmacêuticas (produtos cosméticos), em processos de mineração, em aplicações na engenharia do petróleo e na medicina. O simples processo de misturar surfactante com uma solução polimérica causa mudanças imediatas nas propriedades do surfactante, como estabilidade das soluções coloidais, absorção, solubilização, concentração micelar crítica, hidrofobicidade e efeitos elétricos⁴³. Estes efeitos tem sido estudados por medidas de tensão superficial⁴⁴, condutimetria⁴⁵, viscosidade⁴⁶, fluorescência⁴⁷ e espalhamento de luz⁴⁸. Através destas técnicas várias estruturas do complexo formado por polímero-surfactante tem sido propostas para elucidar o arranjo destes agregados nas observações experimentais das técnicas citadas, porém é desconhecida a estrutura desses agregados e ainda não se tem uma base sólida de como o surfactante pode influenciar na conformação do polímero. Existem alguns modelos que tentam justificar uma possível estrutura para os agregados, como por exemplo: o surfactante estaria ligado numa única camada ou numa bicamada de polímero. A ligação de surfactante-polímero seria definida através de "pontes". Outro modelo supõe que o polímero estaria solubilizado por micelas. O surfactante estaria preso no polímero através de "armadilhas". Outros definem uma configuração do tipo gotas de micela envolvidas numa "corda" polimérica, e existem outros modelos propostos apenas para ilustrar algumas observações experimentais⁴⁹. Apesar dessas estruturas não explicarem alguns fenômenos observados, acredita-se numa possível associação polímero-surfactante como modelo em solução. Este modelo refere-se a um complexo que consiste numa molécula de polímero cercado um número considerável de micelas de surfac-

tante, como se fosse uma "armadilha polimérica", onde o polímero penetra parcialmente na região polar das micelas (Fig. 08). A existência destes agregados implica que as micelas são cooperativamente ligadas nas moléculas de polímero como num aglomerado de surfactante ⁴³.

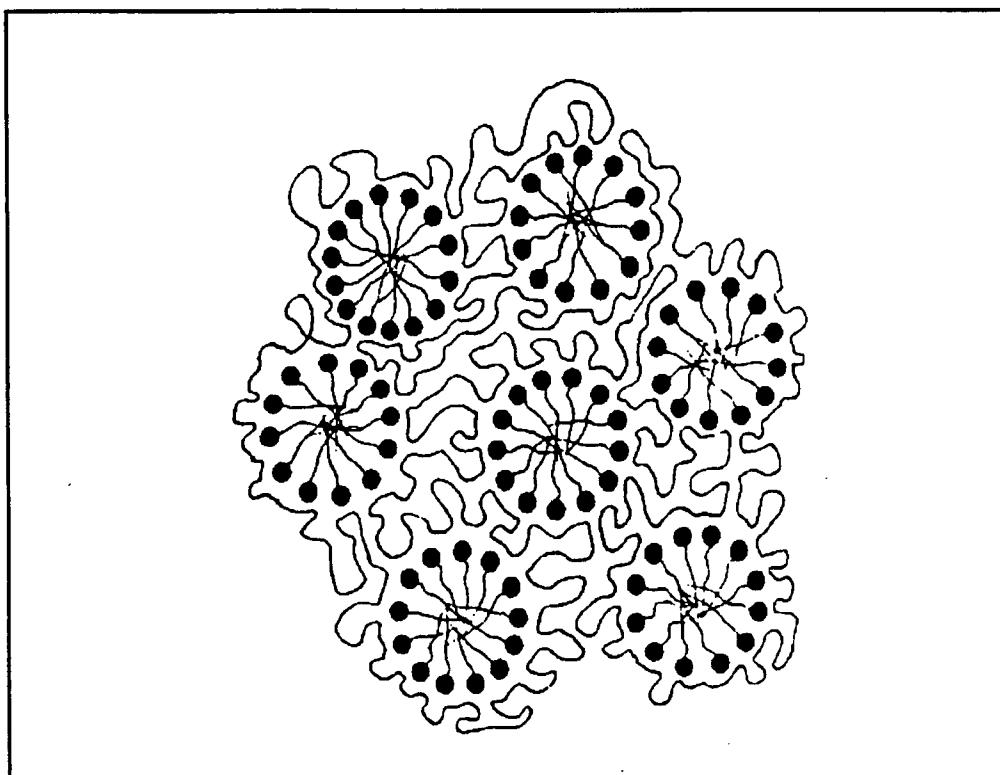


Fig. 08 - Representação esquemática do complexo polímero-surfactante em solução aquosa.

Os fatores mais importantes na formação desses agregados são as influências das cargas da região polar dos surfactantes na estabilidade do complexo e o efeito hidrofóbico. Estes efeitos dependem da estrutura dos surfactantes e dos polímeros. Para polímeros não-iônicos a ligação ocorre próximo da CMC do surfactante, e para polímeros carregados a ligação começa a uma ordem de magnitude abaixo da CMC do surfactante de carga oposta ^{50,51}.

Recentemente foi estudado um modelo que ajustasse aos dados obtidos por espalhamento de luz e RNM do complexo formado por polióxido-etileno-dodecilsulfato de sódio (PEO-SDS). Neste modelo, admite-se que 10%

do PEO estaria ligado diretamente na superfície micelar enquanto o restante estaria ligado nas margens das micelas. Estes resultados seriam consistentes com as propriedades macroscópicas estudadas por condutimetria e viscometria mas, não especificam a natureza da interação do PEO e SDS (Fig. 9a)⁴⁸. Estudos de RNM feitos também por Cabane mostraram que a contribuição das interações hidrofóbicas e eletrostáticas são comparáveis e ambas ocorrem na superfície micelar⁵². Kwak estudou pela mesma técnica de Cabane e afirmou que o polímero PEO estaria totalmente solubilizado dentro da micela⁵³.

Dubin e colaboradores mostraram que cátions como (Li^+ , Na^+ e NH_4^+) podem afetar as propriedades da camada de Stern. O cátion interage simultaneamente com a micela (forças eletrostáticas) e com o polímero (complexação-coordenação). O cátion coordenaria na dupla camada com o polímero para formar um "pseudo-policátion". Estas interações estariam atuando na dupla camada elétrica da micela (Fig. 9b)⁴⁸.

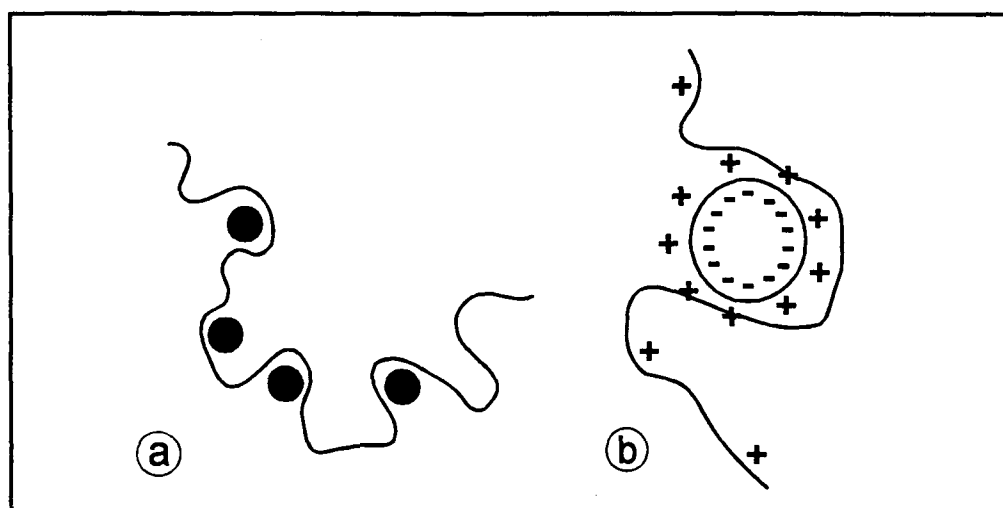


Fig. 09 - Representação esquemática do complexo PEO-SDS.

Scaiano e autores utilizaram sonda fluorescente para estudar o tipo de agregação do poliestireno sulfonado e brometo de dodeciltrimetilamônio e observaram que este complexo afeta a fluorescência da sonda, causado por

mudanças na polaridade do ambiente químico no qual esta se encontra. Eles afirmam que a formação do agregado polímero-surfactante é acompanhado por um "enroscamento" da cadeia polimérica fazendo com que poucas moléculas de surfactante fiquem agregadas nessa cadeia. O modelo seria semelhante a um arquipélago, onde os surfactantes seriam "pequenas ilhas" rodeadas pelo polímero enroscado ⁵⁶.

Outros modelos foram propostos por Gilányi, Wolfram e Nagarajan, que se baseavam em estudos do número de agregação do polímero ligado na micela ⁶.

Vários modelos matemáticos tem sido desenvolvido com base em tratamentos teóricos para descrever a absorção cooperativa de surfactante nos diversos tipos de polímeros, isto é, carregados e neutros. Estes modelos estão brevemente descritos na literatura. ^{42, 43}.

3.2 - Influência da Adição de Polímeros em Soluções Micelares

O processo de micelização do surfactante iônico consiste num delicado balanço de várias forças e na resistência da região polar dos surfactantes em permanecer na periferia da micela. A alta densidade de carga nesta região favorece a ligação apertada de contra-íons, diminuindo com isso o potencial elétrico e a repulsão das cabeças do surfactante. O modelo da micela esférica de Hartley descreve bem estas propriedades em soluções diluídas. A adição posterior de uma molécula que apresenta uma flexibilidade suficiente para acomodar a associação íon-dipolo entre o dipolo do grupo hidrofílico do surfactante com os segmentos hidrofóbicos de um polímero, resulta numa proteção das cargas elétricas, diminuição da extensa área parafínica e perturbação das propriedades do surfactante ⁴².

O complexo formado por polímero-surfactante apresenta propriedades bem diferentes de uma solução contendo apenas surfactante. O polímero causa perturbações nas propriedades físicas das soluções contendo surfactante como: tensão superficial, condutividade elétrica, viscosidade e eletroforese^{6,42,45}.

O método da tensão superficial é utilizado para estudar complexos formados por polímeros carregados (polieletrólitos) e surfactantes. A figura 10 representa um exemplo de medida de tensão superficial de uma mistura de dodecilsulfato de sódio (SDS) e o polieletrólito hidroxietilcelulose. Em concentrações diluídas de SDS aceita-se que o polímero está em equilíbrio com os monômeros do surfactante. Aumentando a concentração de SDS, os monômeros começam a ligar-se sobre o polímero formando agregados semelhantes às micelas normais de SDS neutralizando as cargas residuais causando precipitação do complexo, observado na figura 10 e definida pela zona de precipitação. Em concentrações altas de SDS a solução torna-se homogênea devido à solubilização dos agregados. Nestas condições a solução é formada por uma mistura de micelas de SDS normais e complexos polímero-SDS⁵⁴.

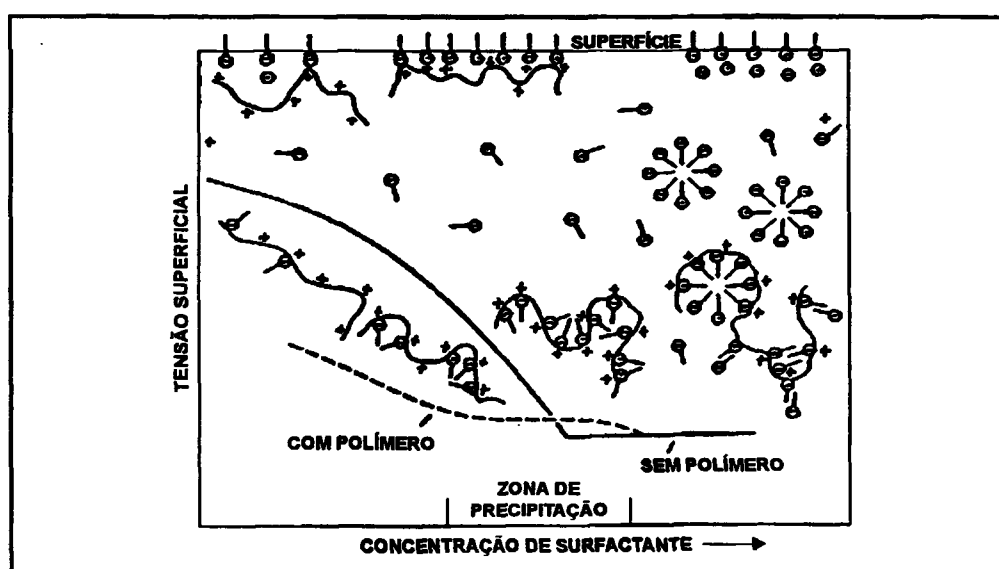


Fig. 10 - Medida da tensão superficial de um agregado. A linha cheia é a tensão superficial do surfactante e a linha tracejada é a tensão superficial do complexo.

Para os surfactantes iônicos, uma redução no valor da CMC é uma forte evidência da interação com o polímero. A energia livre de Gibbs que define a estabilização do complexo é dada por:

$$\Delta G^{\text{O}}(\text{mic-pol}) - \Delta G^{\text{O}}_{\text{mic}} = RT \ln(\text{CMCp}/\text{CMC}) \quad (\text{Eq. 7})$$

onde CMCp e CMC são os valores de concentração micelar crítica do surfactante em presença e na ausência de polímero. $G^{\text{O}}(\text{mic-pol})$ e $G^{\text{O}}(\text{mic})$ é a energia livre do complexo e do surfactante respectivamente. Esta energia corresponde a energia necessária quando um mol de surfactante é transferido da micela normal para micela ligada no polímero⁵⁰.

O método da condutividade elétrica revela uma interessante observação experimental que consiste de duas quebras no gráfico da condutância específica versus concentração do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS), na presença de óxido de polietileno. As duas quebras representam a existência de "duas concentrações micelar crítica" definida por C1 que representa a concentração na qual começa a ligação do polímero com o surfactante e C2 que representa a concentração na qual o polímero torna-se saturado de surfactante ligado. Para o ácido hialurônico a ligação com o surfactante catiônico brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) começa a ser bem definida em C1 abaixo da CMC do surfactante quando na ausência de sal. O resultado corresponde à formação de uma ligação fortemente cooperativa dos monômeros de surfactante agregados na cadeia do polímero^{6,55,56}.

Há evidências que o grau de dissociação iônica (α) aumenta nos complexos formados por dodecilsulfato de sódio (SDS) com os polímeros polivinilpirrolidona (PVP) e óxido de polietileno (PEO), assumindo valores de 0,85 e 0,65, respectivamente, quando comparados com $\alpha = 0,35$ para micelas de SDS somente^{42, 54, 57}.

Frequentemente quando o polímero é adicionado numa solução

micelar há um aumento da viscosidade, que depende da carga do polímero, das mudanças conformacionais, do seu peso molecular e da força iônica do meio. Em outros casos, pode acontecer um colapso no sistema (polímero se enrosca) causando uma diminuição da viscosidade^{50, 55}, ocasionando a formação de um sistema heterogêneo.

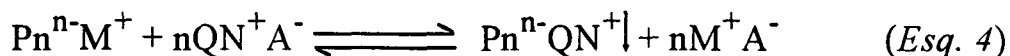
3.3 - Separação de Fase

As interações de polímeros carregados com surfactantes de carga oposta geralmente resultam em precipitação (neutralização de cargas). O aparecimento de "regiões" de interação distintas, definida mais precisamente como separação de fases, caracterizada pela turbidez da solução, está relacionado com a agregação do surfactante no polímero^{6,56}. O início dessa ligação causa redução das cargas e da hidrofobicidade do complexo formado. A opalescência observada é muito estável e ainda não é bem definida. Sua observação é feita visualmente e constata-se três regiões distintas:

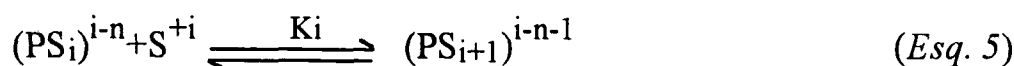
- 1) Uma região transparente, onde o polímero está em excesso. Há um aumento considerável na viscosidade, devido ao alto peso molecular do polímero.
- 2) Uma região de precipitação, onde ocorre a interação estequiométrica (neutralização de cargas). Há uma redução da viscosidade provavelmente ocasionada pela redução da densidade de carga e por uma mudança conformacional.
- 3) É o reaparecimento de uma região novamente transparente de redissolução, onde o complexo insolúvel é solubilizado por um excesso de surfactante, e um novo aumento da viscosidade é observado⁴⁹.

3.4 - Reação de Associação

A complexação entre o polímero e o surfactante pode ser representada pela equação 10, em água:



onde $Pn^{n-}M^+$ é o sal do cátion M^+ com o polímero de valência n (no caso do ácido hialurônico tem valência negativa pelos grupos carboxilas) e QN^+ um detergente catiônico (por exemplo, brometo de dodeciltrimetilamônio). A reação também pode ser escrita em termos de equilíbrio envolvendo uma série de etapas adicionais:



onde P é o polímero contendo n carga negativa e S surfactante univalente. A reação pode conduzir a uma neutralização de cargas ^{8, 58}:



A reação de associação é influenciada por vários fatores, da mesma forma que a micelização de surfactantes, evidenciando assim, a similiaridade dos dois processos. Alguns fatores são citados, como por exemplo: temperatura, adição de sal, comprimento da cadeia do surfactante, estrutura do surfactante, peso molecular do polímero, estrutura do polímero, pH e hidrofobicidade do polímero ^{6,42,54}.

O efeito da adição de sal é um fator de destaque neste trabalho por favorecer a solubilidade do complexo em solução aquosa. A seguir faremos um breve estudo do efeito salino sobre o complexo formado pelo sal do ácido hialurônico e surfactantes catiônicos.

3.5 - Efeito do Sal - Concentração Crítica do Eletrólito (CCE)

Os complexos formados são geralmente insolúveis em água e poderão tornar-se solúveis pela simples adição de surfactante. O mesmo efeito poderá ser observado pela adição de sal no sistema⁵⁶. Scott estudou o efeito da variação da natureza do eletrólito na solubilização dos complexos sulfato de dextrana-cetilpiridíneos, de heparina e hialuronato. A concentração de sal necessária para solubilizar o complexo polímero-surfactante é chamada CONCENTRAÇÃO CRÍTICA DO ELETRÓLITO (CCE). O CCE para o sulfato de dextrana em presença de KCl apresenta um valor de 2,0 N (para altas concentrações de polímero). Para a heparina o CCE é 1,10 N, em KCl e para o hialuronato na presença dos sais KCl, MgCl₂, Na₂ SO₄ e MgSO₄ o CCE apresenta os seguintes valores 0,22, 0,19, 0,15 e 0,22 respectivamente. As concentrações são dadas em número de equivalente-grama por litro⁸.

A figura 11 mostra diferentes diagramas determinados por Lindman e colaboradores⁶, da concentração de surfactante versus concentração de NaBr para diferentes surfactantes alquiltrimetilamônios em presença de 1mM de hialuronato (NaHy). As linhas contínuas determinadas para cada composição ([surfactante]/[NaBr]) em cuja composição o complexo é insolúvel. Em concentrações de NaBr acima da linha contínua a solução é homogênea. Para o brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB) observa-se que a solução é homogênea em concentrações de NaBr de aproximadamente acima de 100mM.

Observa-se ainda, uma forte dependência do CCE com o tamanho da cadeia do surfactante. Quanto maior a cadeia parafínica, maior é a quantidade de sal requerida para redissolução do polímero. Para os surfactantes da cadeia curta, a formação de micelas é energeticamente preferida para ligar com o hialuronato^{6, 8}.

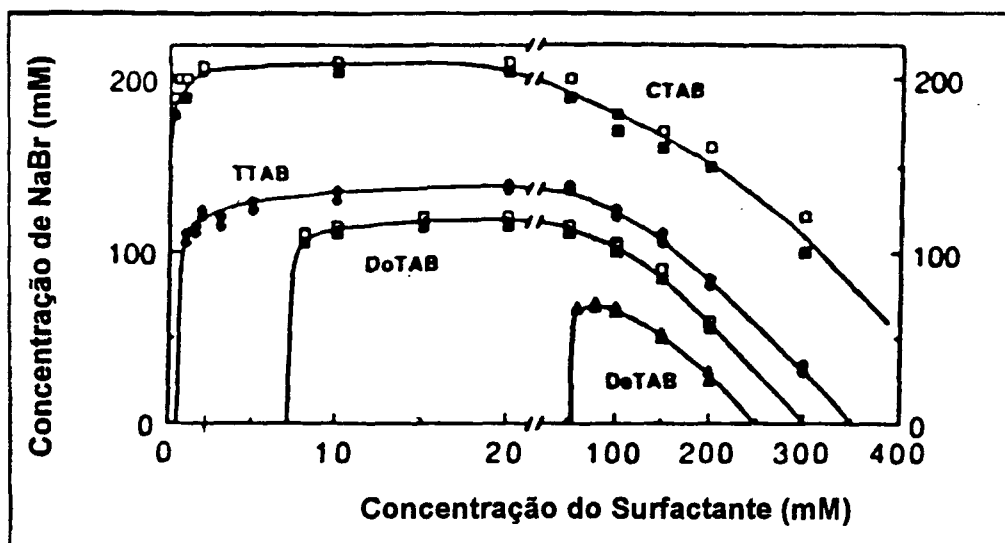


Fig.11 - Concentração crítica do eletrólito (CCE) em soluções contendo NaBr e Brometo de alquiltrimetilamônio: Brometo de cetiltrimetilamônio(CTAB), Brometo de tetradeciltrimetilamônio(TTAB), Brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB) e Brometo de Deciltrimetilamônio e 1mM de Hialuronato (NaHy), peso molecular $6,0 \times 10^4$. Os símbolos claros referem-se à região monofásica e os escuros referem-se à região bifásica.

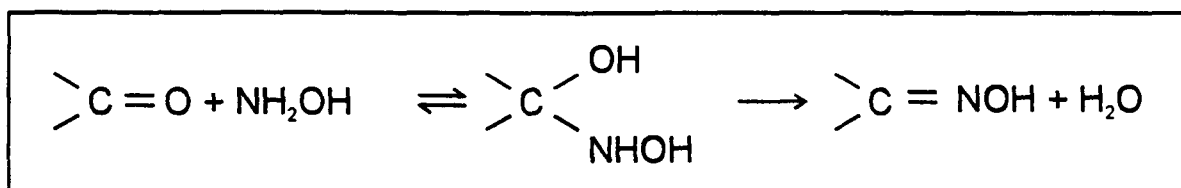
3.6 - Efeito dos Complexos em Reações Químicas

A presença de micelas nas reações químicas causam efeitos catalíticos ou inibição. Engbert⁴⁵ estudou a reação de hidrólise do 1-benzoil-3-fenil-1,2,4 triazol na presença do complexo polióxidoetileno-SDS e polióxido-propileno-SDS. Esta reação se processa por catálise nucleofílica da água, sendo independente do pH. Os resultados mostraram a hidrólise de inibição para ambos os complexos, causados pela redução da micropolaridade do substrato nos sítios da ligação na região de Stern. A presença de sal no sistema diminui o grau de ligação do surfactante no polímero e diminui a velocidade de hidrólise. Os dados cinéticos para esta reação são analisados por modelos de pseudo-fase e assume a estabilização de "minimicelas" pela ligação com o polímero⁴⁵.

4 - Sistema em Estudo

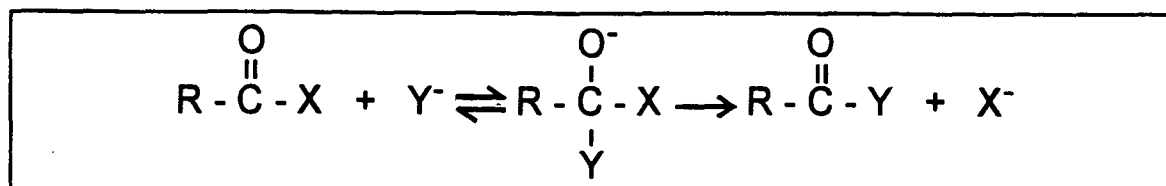
4.1 - Oximas

As oximas são compostos orgânicos que apresentam o grupo hidroxiimino na sua estrutura molecular e cujo grupo quando dissociado tornam-se excelentes nucleófilos. Basicamente, são as oximas consideradas derivadas das cetonas e aldeídos cuja reação é caracterizada por duas etapas: adição de hidroxilamina e desidratação do carbinolamina ou semicarbazona (Esq. 7).



Esquema 7

O mecanismo de oximólise de ésteres de p-nitrofenila compreende o ataque do nucleófilo à carbonila, cuja etapa é determinante, seguida de rápida decomposição do intermediário tetraédrico (Esq. 8).



Esquema 8

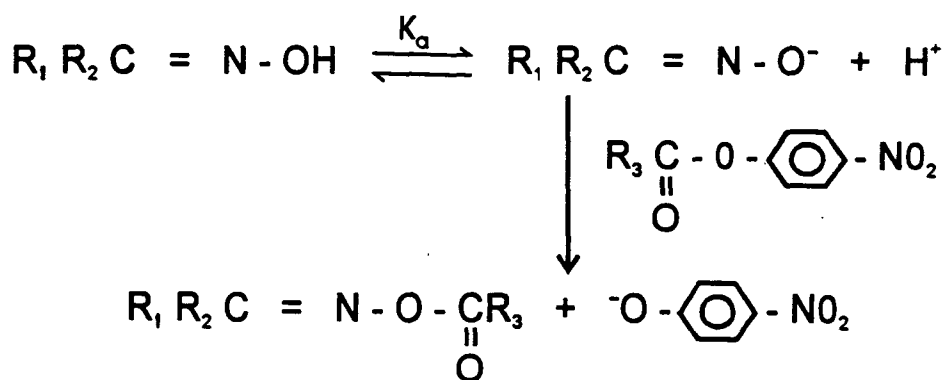
Em solução aquosa, as oximas I e II (Esq. 9) apresentam pequenas diferenças de reatividade. Quando em solução micelar, as suas reatividades são muito diferentes e dependem de sua estrutura, isto é, de sua respectiva hidrofobicidade ³³.

Os ésteres de p-nitrofenila têm sido usados como modelo de reações na presença de micelas com vários tipos de nucleófilos para estudar propriedades e mudanças de reatividade de agregados micelares. Essas reações são bem conhecidas e são facilmente acompanhadas, medindo a absorvância do produto íon p-nitrofenóxido que absorve fortemente em 405 nm ³³. O octanoato de p-nitrofenila compreende os ésteres com uma longa cadeia paranífrica e são mais sensíveis na reação de hidrólise em solução micelar do que o acetato de p-nitrofenila. Esse fato é causado provavelmente pela grande tendência do substrato de se incorporar dentro dos agregados micelares.

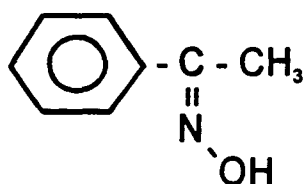
4.2 - Esquema Cinético

Este trabalho descreve o efeito do complexo polímero - surfactante (ácido hialurônico - brometo de dodeciltrimetilamônio) sobre a velocidade de oximólise (reação 1) do acetato de p-nitrofenila e do octanoato de p-nitrofenila pela oxima I (hidrofilica) e oxima II (hidrofóbica) (Esq. 9).

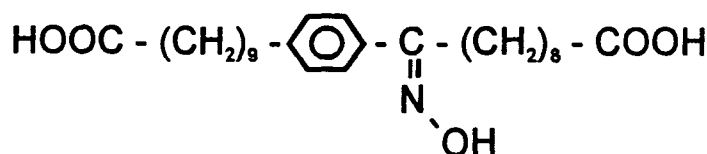
0.224.927-2



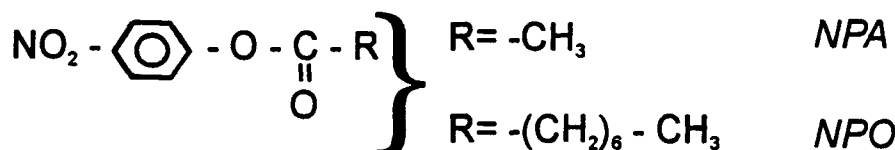
REAÇÃO 1



OXIMA I



OXIMA II



Esquema 9 - OXIMA I, acetofenoxina; OXIMA II, 4 - (9-carboxi-nonanil)-1-(9-carboxi-1-hidroxiiminononanil) benzeno; NPA, acetato de p-nitrofenila e NPO, octanoato de p-nitrofenila.

A incorporação dos reagentes na micela e a região que eles ocupam são fatores importantes no estudo dos efeitos catalíticos ou inibitórios das reações. A estrutura do substrato pode determinar estas posições, por exemplo a oxima II que apresenta nas suas extremidades grupos carregados negativamente (Esquema 9) estaria acomodada na superfície micelar e sua parte parafínica incorporada no núcleo. A oxima I estaria acomodada na camada de Stern, por ser hidrofílica, como mostra a figura 12³¹.

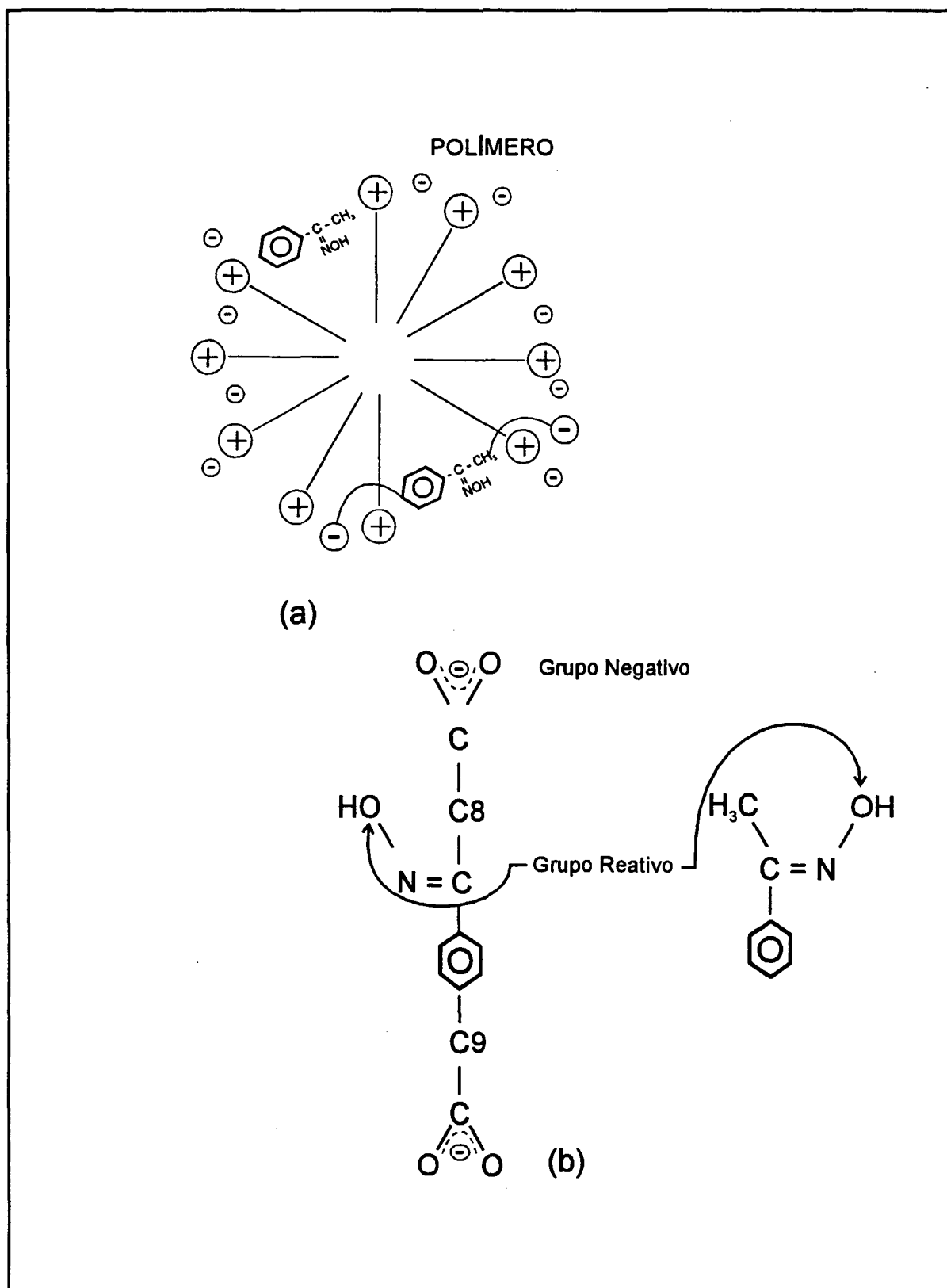


Fig. 12 - a) Posições esperadas das oximas na micela;

b) Estruturas das oximas.

5 - Objetivo

A formação dos complexos de polímeros com surfactantes apresentam propriedades bem distintas em solução quando comparadas na ausência de polímero. Vários tipos de polímeros sintéticos e surfactantes iônicos ou não-iônicos foram minuciosamente explorados conforme as suas naturezas estruturais e hidrofóbicas. O estudo mais recente de complexos formados por polímero-surfactante foi a elaboração de um review muito bem detalhado por Goddard ^{41,48}.

O interesse por esta área nos motivou em trabalhar com um polímero natural da família dos glicosaminoglicanos, o ácido hialurônico (Hy) e um surfactante catiônico, brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB), com o objetivo de estudar o efeito catalítico do complexo (Hy-DoTAB) sobre reações químicas na presença de 175 mM de NaBr, previamente tamponado a pH 9,80. As reações escolhidas foram a oximólise e hidrólise de ésteres de p-nitrofenila no qual tem sido extensivamente exploradas como modelo de entendimento de propriedades interfaciais em solução micelar ³³. Ainda como objetivo primordial do trabalho, foi de estudar algumas propriedades físico-químicas baseadas em medidas de tensão superficial do complexo Hy-DoTAB em diferentes concentrações de polímeros e um breve estudo de fluorescência do complexo hialuronato marcado covalentemente com uma sonda fluorescente, 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol e brometo de dodeciltrimetilamônio (Hy-NBD/DoTAB) na presença de 175 mM de sal.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

1 - Materiais

1.1 - Reagentes

Os principais reagentes utilizados durante todo o desenvolvimento deste trabalho estão citados abaixo. Outros reagentes precursores estão citados no item 1.2, Preparação de Compostos.

O sal de sódio do ácido hialurônico (Sigma) é de origem da bactéria *Streptococcus Zooepidemicus* e foi utilizado sem purificação prévia. O brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB) foi preparado como mostrado no item 1.2.1 e também utilizou-se produto da Sigma, que foi usado após recristalização prévia em etanol/ acetato de etila. O acetato de p-nitrofenila (NPA) foi preparado conforme item 1.2.2. O octanoato de p-nitrofenila (NPO) (Sigma) foi utilizado como foi recebido. A acetofenoxima (oxima I) e o 4-(9-carboxinonil)-1-(9-carboxi-1- hidroxiiiminononil)benzeno são os mesmos compostos utilizados

por Chaimovich e Zanette³³. Neste trabalho foi utilizado também o ácido hialurônico parcialmente modificado marcado com uma sonda fluorescente, 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol(NBD-fluoride), ligada covalentemente no Hy^{9, 59}. Os solventes usados foram: acetonitrila, acetona, etanol e acetato de etila. Os sais, bases e ácidos inorgânicos utilizados foram: brometo de sódio, hidróxido de sódio, solução padrão de HCl 1N titrisol e ácido bromídrico. Os reagentes usados para preparar os tampões foram: ácido bórico e tris-(hidroximetil)aminometano. Todos são provenientes da Merck. A água utilizada para preparar todas as soluções foi proveniente de um deonizador de marca Millipore.

1.2 - Preparação de Compostos

1.2.1 - Brometo de Dodeciltrimetilamônio (DoTAB)

1.2.1.1 - Preparação do Brometo de Dodecila

Num balão de três bocas de 500 ml, foram adaptados um condensador de refluxo, um agitador mecânico e um funil de adição contendo 17,8 ml de bromo (Merck). Foram adicionados no balão 4,21 g de fósforo vermelho, 1,5 g de zinco comercial e 100 g de álcool dodecílico (Aldrich 98%). A mistura foi aquecida em banho de óleo e a reação transcorreu sob refluxo numa temperatura de 120°C durante 5 horas. O bromo era adicionado aos poucos durante as três primeiras horas. Terminada a reação, o conteúdo foi transferido para um funil onde separou-se a fração aquosa da orgânica com uma mistura quente de 7:3 de álcool etílico/água. Em seguida lavou-se a fração orgânica com uma solução de bicarbonato de sódio e finalmente com água. O produto foi purificado mediante destilação à vácuo (0,5 mmHg, 120°C) obtendo-se um rendimento de 83%.

1.2.1.2 - Preparação do DoTAB

Num micro-reator de aço revestido internamente com teflon, foram misturados 45 ml de brometo de dodecila e 60ml de solução metanólica de trimetilamina, preparada a partir de uma destilação de uma solução aquosa da amina. A concentração da amina foi determinada por titulação com HCl padrão utilizando como indicador o metilorange. A reação transcorreu durante 6,5 horas numa temperatura de 80°C. O produto tinha aspecto de um sólido amarelo que foi recristalizado em etanol, lavado a frio com acetato de etila e finalmente seco a vácuo. O sólido branco foi conseguido com um rendimento de 61%. A identificação estrutural e pureza do composto foi feita por análise no infravermelho (Fig. 13) e por medidas de CMC (Fig. 14).

Na figura 13 podemos identificar as principais bandas características dos grupos funcionais do DoTAB. A frequência de deformação axial da ligação C-N, aparece com baixa intensidade, em 1050cm^{-1} . Em 2900 e 2810cm^{-1} tem-se as frequências provenientes das deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H de metilas e metilenas. Em 1380 e 1475cm^{-1} observa-se as bandas características de deformações angulares simétrica e assimétrica das ligações C-H das metilas e metilenas.

A figura 14 mostra a variação da tensão superficial (Fig.14a) e condutância específica (Fig.14b) em função da concentração de DoTAB. As inflexões observadas (Fig. 14a e Fig. 14b) são arrojadas às CMC do surfactante cujos valores determinados foram $1,62 \times 10^{-2}\text{ M}$ (literatura $1,40 \times 10^{-2}\text{ M}$, 25°C) ⁶⁰ e $1,60 \times 10^{-2}\text{ M}$ (literatura $1,58 \times 10^{-2}\text{ M}$, 25°C) ⁶⁰.

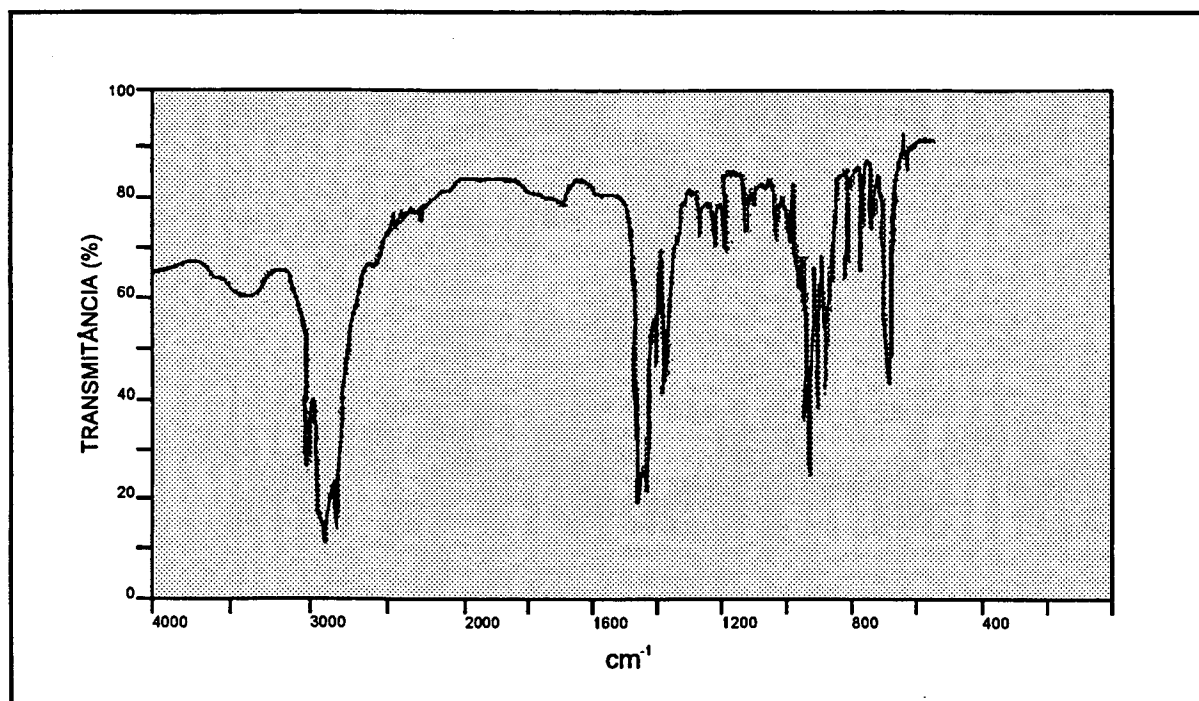
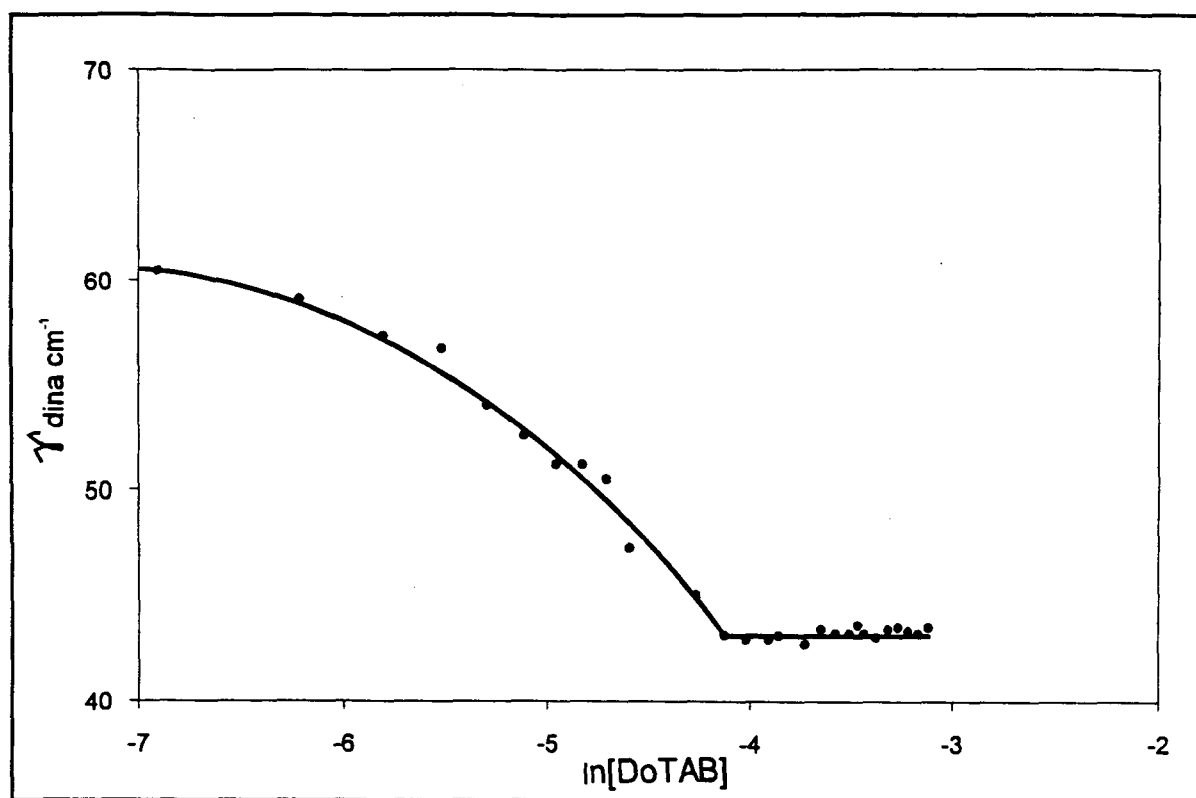
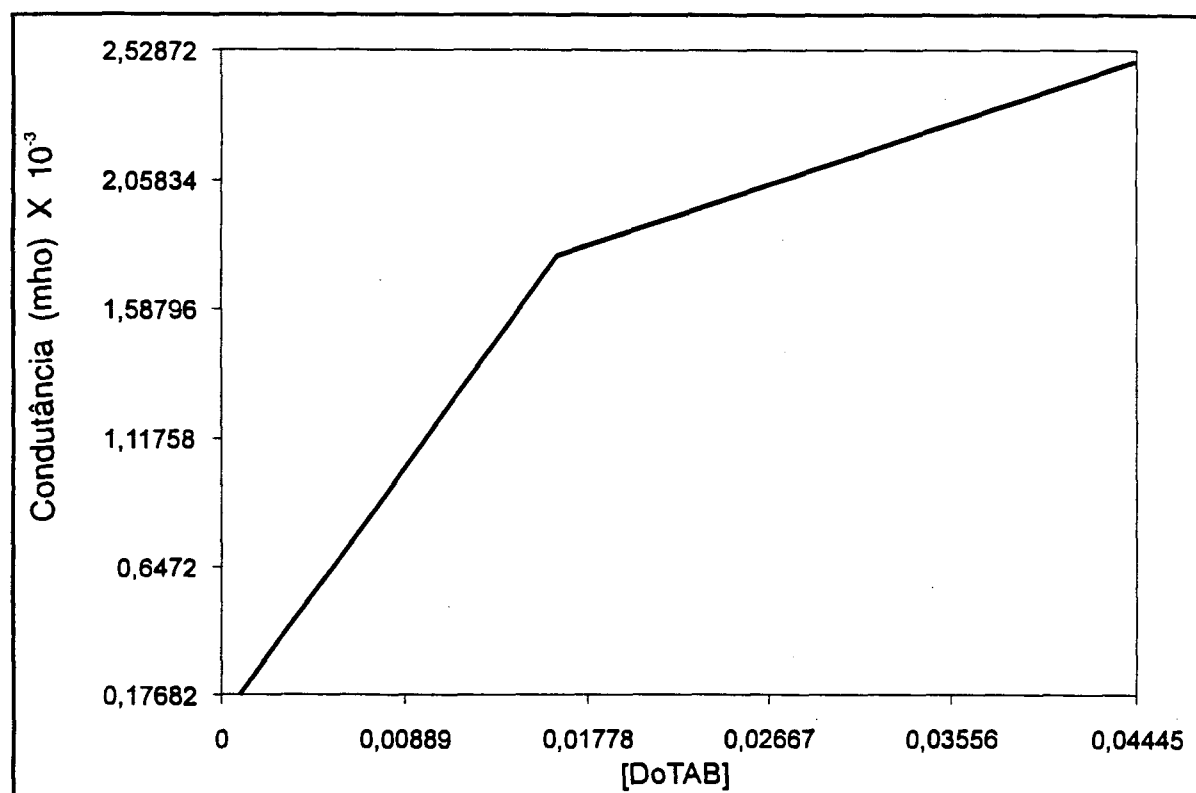


Fig. 13 - Espectro de absorção no infravermelho do brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB).



(a)

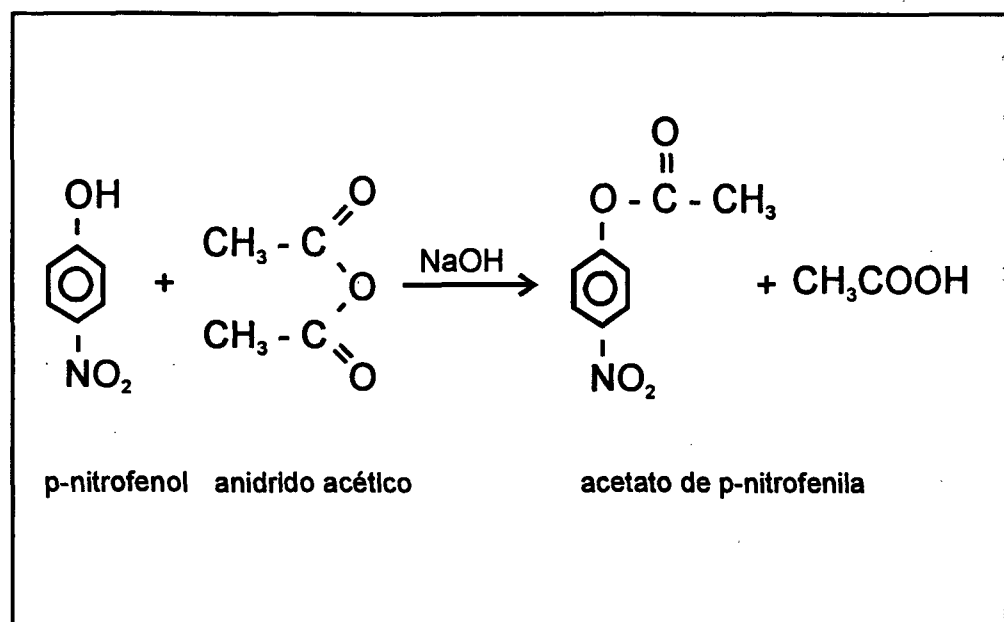


(b)

Fig. 14 - Efeito da concentração de DoTAB sobre a tensão superficial (a) e sobre a condutância específica (b). Os valores de $[\text{DoTAB}]$ onde ocorrem as discontinuidades são atribuídos aos valores da concentração micelar crítica do surfactante.

1.2.2 - Preparação do Acetato de p-Nitrofenila

Num balão de três bocas de 250 ml foram acoplados um agitador mecânico e um funil de adição contendo 1,8 g de anidrido acético (Merck). Adicionou-se no balão uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 M contendo 2 g de p-nitrofenol (Merck) e aproximadamente 500 g de gelo moído. O sistema foi colocado em uma cuba contendo gelo. A seguir foi adicionado rapidamente o anidrido acético. Após 20 minutos de agitação formaram-se cristais amarelados que foram filtrados, lavados com água gelada, recristalizados em etanol e finalmente secos a vácuo. O rendimento obtido foi de 15% (literatura 16%)⁶¹.



Esquema 10 - Reação de acilação do p-nitrofenol⁶¹.

O composto obtido foi confirmado através de análises de absorção no infravermelho (Fig. 15), ressonância magnética nuclear (Fig. 16) e ponto de fusão. O espectro de infravermelho mostra em 1740 cm^{-1} uma banda intensa correspondente à deformação axial da ligação C=O característica de ésteres

conjugados com o anel benzeno. O anel benzeno é caracterizado pelas bandas correspondente às deformações axiais da ligação C=C do anel em 1580 cm^{-1} e através da deformação axial das ligações C-H aromáticas compreendida entre $3000\text{-}3020\text{ cm}^{-1}$. Em 1180 cm^{-1} observa-se uma banda larga característica da deformação axial da ligação -OC(=O)C . O grupo nitro é caracterizado pelas bandas intensas em 1500 e 1330 cm^{-1} devido às deformações axiais assimétrica e simétrica, respectivamente. No espectro de ressonância magnética nuclear observa-se um duplo dublete entre $\delta\ 7,6\text{-}9,0\text{ ppm}$ que estão na região dos aromáticos característicos de prótons aromáticos p-substituídos. O singlete em $\delta\ 2,55\text{ ppm}$ representa o grupo metila ligado ao carbono da carbonila.

O ponto de fusão medido foi 80°C (lit., 83°C)⁶¹.

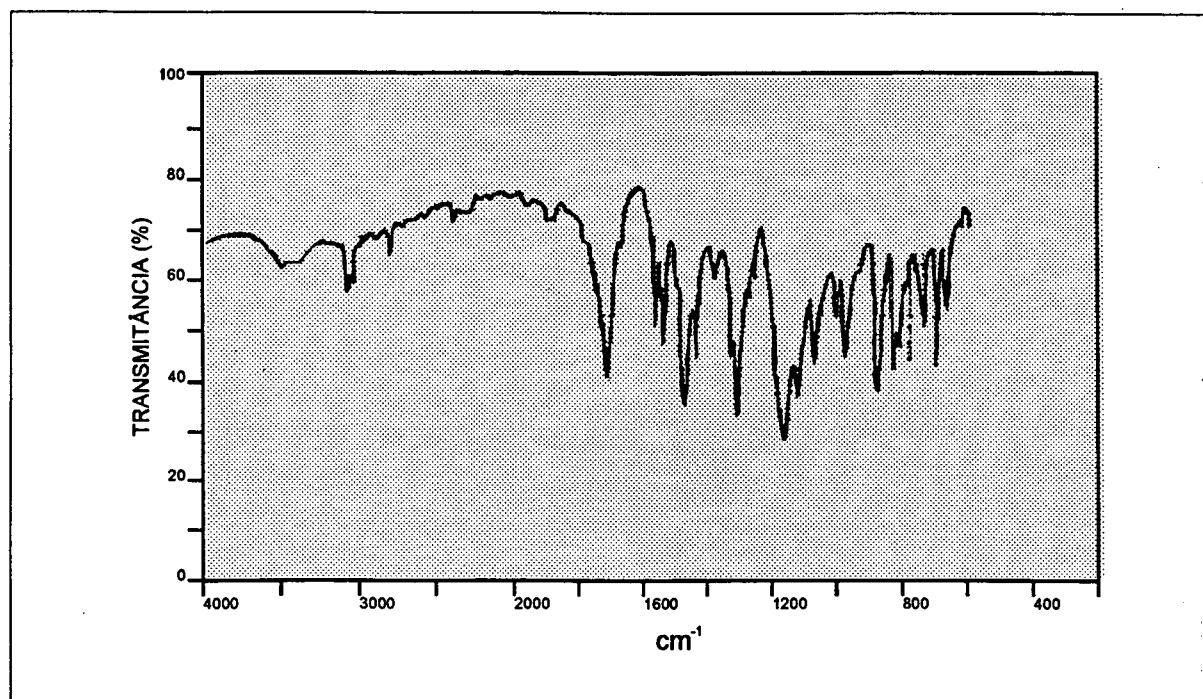


Fig. 15 - Espectro de absorção no infravermelho do acetato de p-nitrofenila (NPA).

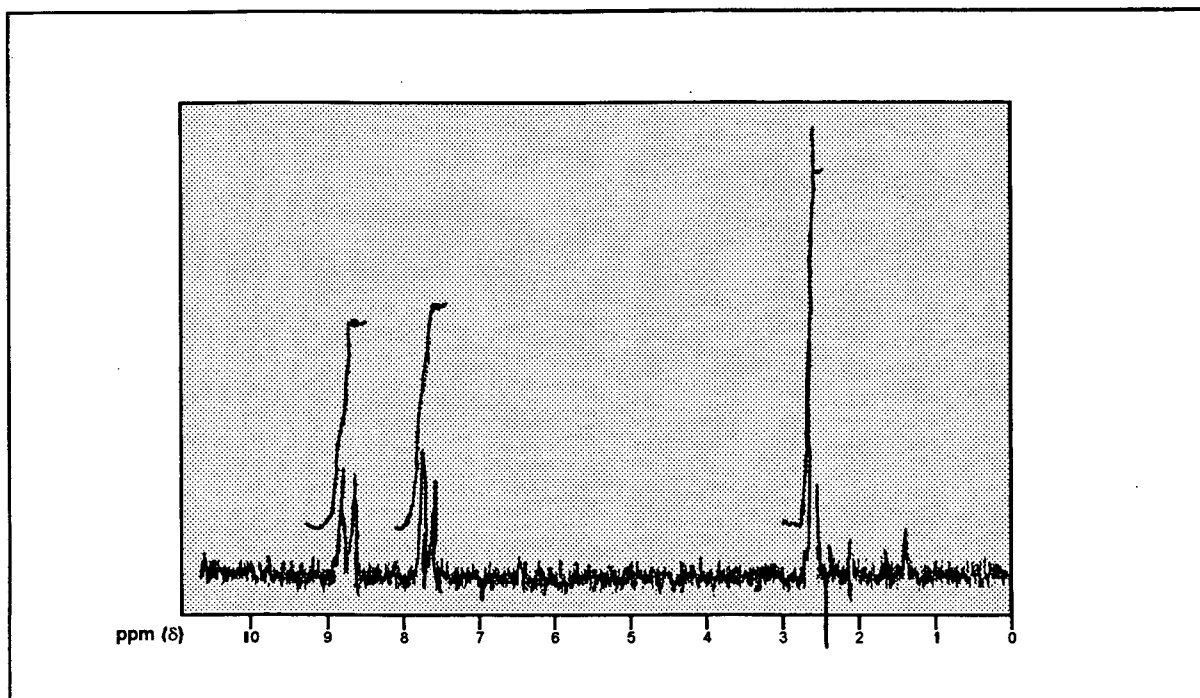


Fig. 16 - Espectro de ressonância magnética nuclear do NPA.

1.3 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados para medir CMC foram: tensiômetro Fisher, modelo 20, baseado no método de Dü Noüy (método do anel); tensiômetro modelo MQ-TS31 da Micro Química, fundamentado no método do peso da gota^{26, 27} no qual foi acoplado ao sistema uma bomba de injeção em fluxo. Um condutivímetro modelo Analion C-701 acoplado também em uma bomba de injeção em fluxo, um banho termostático da Micro Química, um computador Megabyte e uma impressora Elgin Lady 90.

As medidas de pH foram feitas utilizando um pHmetro Beckman Φ 71 equipado com um eletrodo de vidro combinado. Os tampões preparados foram: borato 20 mM pH 9,80, contendo 175 mM de NaBr preparado por adição de solução de hidróxido de sódio sobre uma solução de ácido bórico e o tampão tris/HBr, 20mM, pH 8,00, preparado a partir de uma solução aquosa de tris

(hidroximetil)aminometano com solução de ácido bromídrico.

As medidas da absorvância foram feitas com auxílio de dois espectrofotômetros modelo Shimadzu UV 210A e Simo Aminco SLM instruments, inc DW 2000.

As medidas de fluorescência foram feitas num fluorímetro modelo Aminco SLM 500 SPD equipado com um polarizador.

Os espectros de absorção no ultravioleta com o objetivo de medir o pKa das oximas foram feitos utilizando um HP espectrofotômetro Hewlett Packard Super VGA Vectra 286/12 Diodo Array 8425A. Todos os equipamentos citados estavam interfacionados com computador e termostatizados com banho da Micro Química.

As caracterizações dos compostos preparados foram feitas por espectroscopia ultravioleta visível (UV-Vis), por ressonância magnética nuclear (espectrofotômetro Varian EM 360L (RMN)) e por infravermelho Perkin Elmer (IV).

Os pontos de fusão foram determinados utilizando aparelho da Micro Química modelo MQAPF - 301.

2 - Métodos

2.1 - Concentração Micelar Crítica

As determinações da concentração micelar crítica (CMC) do surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio foram feitas em temperatura ambiente através de medidas de tensão superficial e condutimetria. As técnicas de tensão superficial utilizadas foram: método do anel e do peso da gota. O método do anel consiste em adicionar alíquotas de uma solução do surfactante de concentração 0,1 M num volume inicial de 10 ml de água para se ter por diluição, o valor das demais concentrações de DoTAB. Deste modo, foram feitas medidas de tensão superficial (γ , DYNA/cm) de solução de DoTAB em água, utilizando uma concentração inicial de 3 vezes a CMC do surfactante. Do gráfico de γ versus $\ln[\text{DoTAB}]$ obteve-se o valor da CMC, dado pela inflexão da curva. A ausência de um mínimo na curva é uma boa indicação da pureza do surfactante preparado (Fig. 14a).

O método condutimétrico consiste primeiramente em calibrar o eletrôdo com uma solução saturada de KCl 1M para então medir a condutância inicial da solução. A seguir com uma seringa ômega de 20 ml, adicionava-se solução de surfactante 0,1 M sobre um volume inicial de água contida numa cela. Os dados de condutimetria eram armazenados num microcomputador usando uma interface da Micro Química 12 bits A/D.

O método do peso da gota consiste em coletar numa seringa ômega 10 ml de solução do surfactante 0,1M, conectá-la em uma bomba de injeção e

registrar as medidas de tensão superficial pelo rompimento da gota num capilar entre duas células fotovoltaicas. Este tensiômetro fornecia ainda o valor do tamanho das gotas. Por este método foi medido o valor da CMC do complexo ácido hialurônico-DoTAB, em diferentes concentrações de polímeros: 1,0 , 2,5 e 5,0 mM de Hy (Figs. 19 e 20). Em todas as medidas de CMC, as soluções de surfactante eram preparadas com adição de 175 mM de NaBr em tampão borato, pH 9,80.

2.2 - Cinéticas

As reações de oximólise e hidrólise dos ésteres de p-nitrofenila foram acompanhadas por meio de um espectrofotômetro UV-Visível seguindo o aparecimento do íon p-nitrofenolato a 405 nm⁶². As cubetas utilizadas eram de quartzo com tampas de teflon, tendo um volume máximo 3 ml e um caminho ótico de 1 cm.

2.2.1 - Cinética de Hidrólise dos Ésteres Acetato de p-Nitrofenila (NPA) e Octanoato de p-Nitrofenila (NPO)

As cinéticas de hidrólise do NPA e do NPO em presença do surfactante DoTAB e do complexo Hy-DoTAB em tampão borato 20 mM, pH 9,80, em presença de 175 mM de NaBr foram acompanhadas conforme o seguinte procedimento: adicionava-se sobre um determinado volume de tampão uma alíquota de solução estoque de DoTAB (0,1 - 0,3 M) dissolvido no tampão contendo 1 mM de Hy, para obter a concentração final desejada do polímero e do surfactante. Em seguida, com auxílio de uma microseringa Hamilton, adicionavam-se 7,5 µl de solução estoque de NPA ($1,23 \times 10^{-3}$ M) ou de NPO

($1,0 \times 10^{-3}$ M) em acetonitrila. Agitava-se rapidamente e registrava-se a curva de variação da absorbância versus tempo. O volume final da cubeta era de 2,5 ml e as concentrações finais de NPA e NPO eram $3,69 \times 10^{-6}$ e $3,00 \times 10^{-6}$ M, respectivamente.

2.2.2 - Cinéticas de Oximólise dos Substratos NPA e NPO

As cinéticas de oximólise dos substratos NPA e NPO pelas oximas I e II foram feitas em presença de DoTAB e do complexo Hy-DoTAB, tampão borato 20mM, pH 9,80, contendo 175mM de NaBr. O procedimento consistia em adicionar sobre um volume de tampão borato uma alíquota de solução estoque de DoTAB (0,1 - 0,3 M), dissolvido no tampão contendo 1 mM de Hy para obter-se a concentração final desejada do surfactante para um volume final de 2,5ml. A seguir acrescentavam-se 20 μ l da solução de oxima estoque. A reação começava com adição de 7,5 μ l de solução estoque de NPA ou NPO. As concentrações eram as mesmas do item 2.2.1.

Para termos comparativos, as cinéticas de hidrólise e oximólise foram estudadas também na ausência do ácido hialurônico, com o objetivo de observar o efeito catalítico do complexo Hy-DoTAB.

2.3 - Medidas do pKa e pKa Aparente (pKap) das Oximas I e II

Os pKas das oximas em água, contendo 175 mM de NaBr, foram obtidos através das medidas de absorbância das espécies protonada (AHOX) e desprotonada (AOX⁻), em 20 mM de tampão tris/HBr pH 8,20 e em solução 1M de NaOH, respectivamente. As soluções eram preparadas mediante a adição de

20 µl das oximas I e II em 2,5 ml de solução do tampão ou de base. A técnica de medida do pKa consistia em determinar as absorbâncias das soluções de oximas em três diferentes comprimentos de onda, 270, 291 e 300 nm, para diferentes soluções de base cujas concentrações tinham valores de pH próximos dos pKa das oximas. Os comprimentos de onda utilizados serviram para identificar possíveis bandas de absorção, e em todos os casos, constatou-se que os espectros estavam "limpos".

O pKa em presença do surfactante para cada oxima foi determinado adicionando-se 20 µl de oxima sobre uma solução de NaOH 0,05 M contendo 175 mM de NaBr e em presença de DoTAB. Os valores de absorbância eram medidos nos comprimentos de onda 300, 291 e 270 nm enquanto variava-se a concentração de DoTAB adicionando-se diferentes alíquotas de uma solução estoque 0,3 M.

2.4 - Polarização da Fluorescência

As soluções do polímero marcado (Hy-NBD) eram feitas com uma solução de 1 mM do complexo em presença de 175 mM de NaBr, em tampão borato, pH 9,80. As medidas foram obtidas quando adicionava-se alíquotas de uma solução do surfactante DoTAB 0,1 M na solução de Hy-NBD (em 175mM de NaBr), para obter-se a concentração final desejada do surfactante para um volume final de 4,0ml em uma cubeta de quartzo com tampa de teflon. Agitava-se o conteúdo da cubeta e lia-se 19 vezes a intensidade de fluorescência com o objetivo de obter um média estatística de valores. Para medir a polarização foi conectado um polarizador no caminho óptico de excitação e de emissão em diferentes planos, segundo a geometria esboçada na figura 17. As fendas de excitação/ emissão utilizadas foram 20/ 7,5 nm. Em geral, polarizava-se a

excitação no vetor vertical e realizavam-se medidas de emissão de fluorescência nos planos orientado horizontal (perpendicular para o vetor elétrico incidente) e vertical (paralelo para o vetor elétrico incidente), ou seja, medidas de intensidade de fluorescência $0-90$ e $0-0^\circ$.

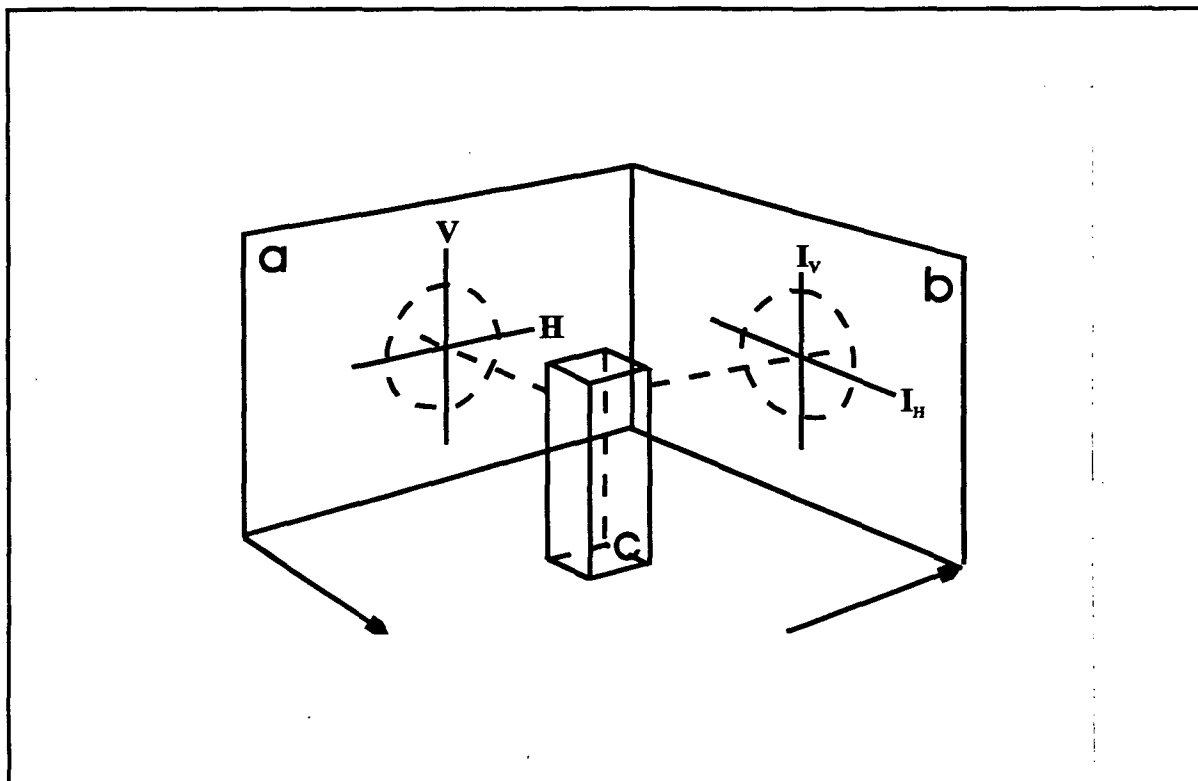


Fig. 17 - Arranjo geométrico para medir a polarização de fluorescência: "a", "b" e "c" representam os polaróides de excitação, emissão e a cubeta, respectivamente. As letras V e H são as posições dos polaróides.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Concentração Crítica Micelar do DoTAB em Presença e na Ausência de Hy

Surfactantes carregados como o brometo de dodeciltrimetilamônio, interagem fortemente com polieletrólitos de carga oposta, por exemplo, com o ácido hialurônico^{6, 56}. Segundo Lindman⁶, a ligação do surfactante no polímero começa numa concentração bem definida denominada C1, abaixo da CMC do surfactante. A interação de surfactantes iônicos com polieletrólitos de carga oposta conduz a uma separação de fase que depende das concentrações do surfactante e do sal. A fig. 11 mostra o diagrama de separação de fase em função das concentrações de DoTAB e de NaBr. Considerando o diagrama para o DoTAB, qualquer composição de CCE abaixo da curva é referente ao precipitado do complexo Hy-DoTAB e em quaisquer composições acima da curva a solução é transparente. Portanto, a razão principal da adição de 175 mM de NaBr nas soluções cinéticas foi para obter as condições experimentais nas quais o complexo Hy-DoTAB fosse solúvel em toda faixa de concentração de DoTAB.

Estas condições foram obtidas por titulação de uma solução de 20 mM de DoTAB em presença de 1 mM de Hy com solução 1 mM de NaBr. Curiosamente, observou-se que em 145 mM de NaBr na mesma concentração de DoTAB acima, a solução resultante era turva, contrariamente ao que era esperado quando considera-se o diagrama da fig. 11. A partir da fig. 11, a concentração crítica eletrolítica em 100 mM de DoTAB deveria ser aproximadamente 100 mM de sal e com 145 mM de NaBr deveria satisfazer as condições experimentais ideais para processar os estudos cinéticos.

A figura 18 apresenta a variação da tensão superficial em função da concentração do DoTAB em presença de 175 mM de NaBr e em tampão borato pH 9,80. O ponto de descontinuidade da curva refere-se à CMC, cujo valor foi 0,0042 M que está próximo do valor da literatura, 0,0032 M em 200mM de NaBr⁶⁰. A adição de sal ocasiona um abaixamento da atividade do íon surfactante estabilizando as micelas e aumentando o número de agregação^{6,44}.

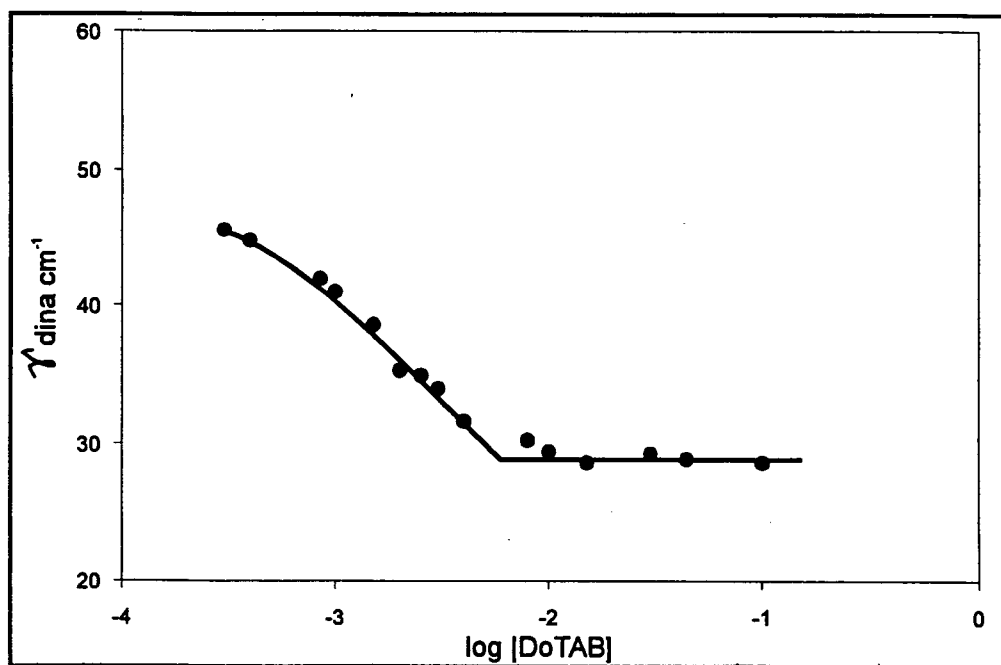


Fig. 18 - Tensão superficial versus Concentração de DoTAB em 175mM de NaBr e tampão borato pH=9,80.

As figuras 19 e 20 mostram as variações de tensão superficial com o aumento da concentração de DoTAB em presença de diferentes concentrações de polímero $1,0 \times 10^{-3}$ e $2,5 \times 10^{-3}$ M, cujos valores de CMC obtidos foram $3,60 \times 10^{-3}$ e $2,40 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. Observou-se ainda que em $5,0 \times 10^{-3}$ M de Hy ocorria uma acentuada turvação em decorrência da precipitação do complexo Hy-DoTAB, que provavelmente é devido ao fato que a composição formada da mistura por Hy, DoTAB e NaBr não alcança o correspondente valor da concentração crítica eletrolítica necessária para que a solução seja homogênea. Uma possibilidade para redissolver o precipitado seria a de aumentar a concentração de NaBr.

Os resultados de CMC em função da concentração de Hy mostram que, pelo menos quando $[Hy]$ é $1,0 \times 10^{-3}$ e $2,5 \times 10^{-3}$ M ocorre uma significativa diminuição dos valores da CMC quando comparados com o valor na ausência de polímero ($4,2 \times 10^{-3}$ M). No entanto, para tirar algumas conclusões mais concretas sobre a interação Hy-DoTAB nas condições experimentais estudadas utilizando a técnica de medida de tensão superficial, seria necessário um estudo mais sistemático, verificando, por exemplo, o efeito de diferentes surfactantes catiônicos versus concentração de Hy sobre a concentração crítica micelar. Atualmente Zanette e col. estão estudando um possível mecanismo para a interação de polímeros carregados com surfactantes de carga oposta, baseado num equilíbrio dinâmico entre a micelização do surfactante e agregação surfactante-polímero.

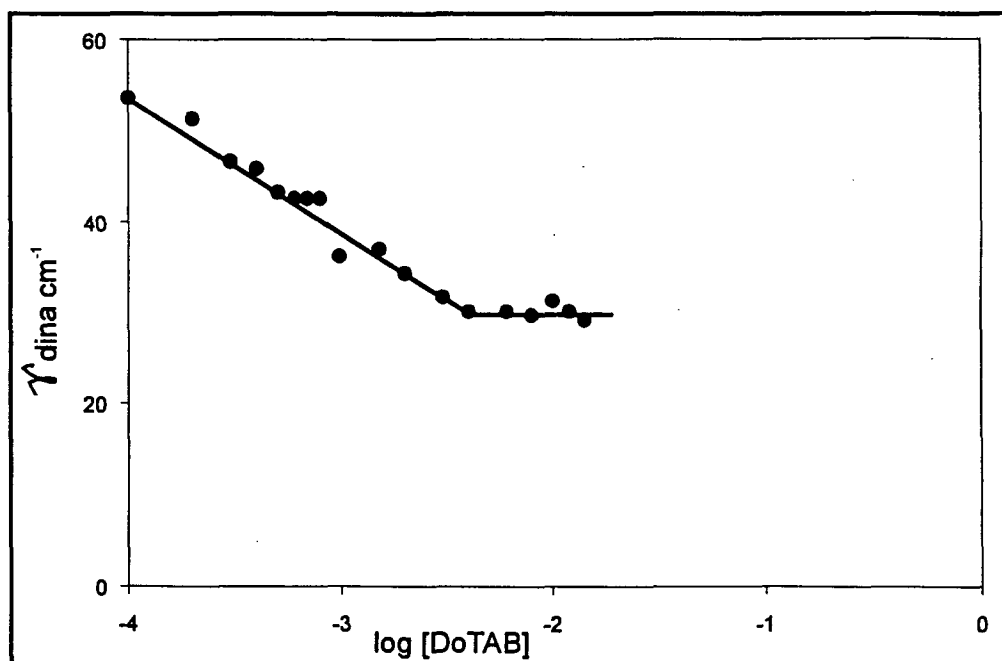


Fig. 19 - Tensão superficial versus concentração de DoTAB contendo 1 mM de Hy em presença de 175 mM de NaBr.

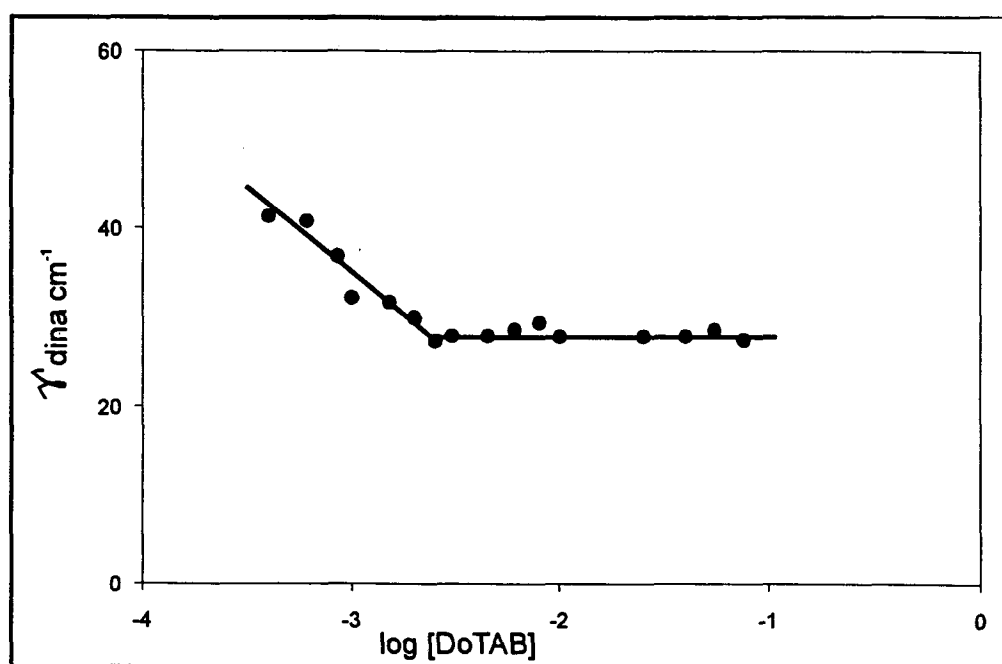


Fig. 20 - Tensão superficial versus concentração de DoTAB contendo 2,5 mM de Hy em presença de 175 mM de NaBr.

2. Medidas Cinéticas

2.1 - Reações de Oximólise e Hidrólise de Ésteres de p-nitrofenila em Presença e na Ausência de Hy-DoTAB

Os valores das constantes de velocidade para as reações de oximólise das oximas I e II são muito semelhantes em soluções aquosas na ausência de DoTAB. Entretanto, as reações do íon oximato com ésteres de p-nitrofenila são fortemente catalisadas por micelas catiônicas^{62, 63}. Recentemente, foi analisado quantitativamente o efeito micelar sobre a constante de velocidade do acetato e do octanoato de p-nitrofenila com diferentes oximas, empregando o modelo de pseudo-fase de troca iônica para tratar os resultados cinéticos⁶³.

As figuras 21 e 22 mostram o efeito da concentração de DoTAB sobre a constante de velocidade observada (K_{obs}) da oximólise do NPA pelas oximas I e II, respectivamente, em presença e na ausência de 1 mM de Hy. Na figura 21, os perfis das curvas cinéticas mostram que a aceleração máxima da velocidade da reação ocorre entre 22-25 mM de surfactante, cujo K_{obs} máximo é aproximadamente 5 vezes maior do que o valor da concentração micelar crítica do surfactante nas mesmas condições experimentais ($CMC = 4,2 \times 10^{-3} M$). Já a figura 22 mostra que o K_{obs} máximo é deslocado para menores concentrações do surfactante, próximo ao valor da CMC. Estas diferenças estão relacionadas com às diferentes hidrofobicidades das oximas I e II, cujas constantes de incorporação (K_s), medidas com o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr), são 110 e $15.000M^{-1}$ (33), respectivamente. A constante de incorpo-

ração define a distribuição dos reagentes entre as pseudo-fases micelar e aquosa. Os valores de K_s aumentam com o aumento da hidrofobicidade do substrato¹⁵. Da mesma forma, o NPA apresenta um valor de $K_s = 54 \text{ M}^{-1}$ (64) e, logo, é um substrato bastante hidrofílico.

Os perfis das curvas (fig. 21 e 22) são característicos de reações bimoleculares onde os valores K_{obs} máximos são atribuídos às condições experimentais onde as concentrações do substrato e do nucleófilo na fase micelar são máximas.

A parte descendente da curva observada à medida que a concentração de DoTAB aumenta é atribuída à inibição causada pelos íons brometos provenientes da dissociação micelar ($\alpha \text{ Cd}$) que desloca hidróxidos da superfície micelar por troca iônica.

Os resultados cinéticos mais expressivos são aqueles quando comparados em presença e na ausência de 1mM de hialuronato (fig. 21 e 22). Observa-se que o complexo Hy-DoTAB afeta a constante de velocidade observada para as reações de oximólise do NPA com as oximas I e II, da mesma forma que as micelas normais de DoTAB afetam.

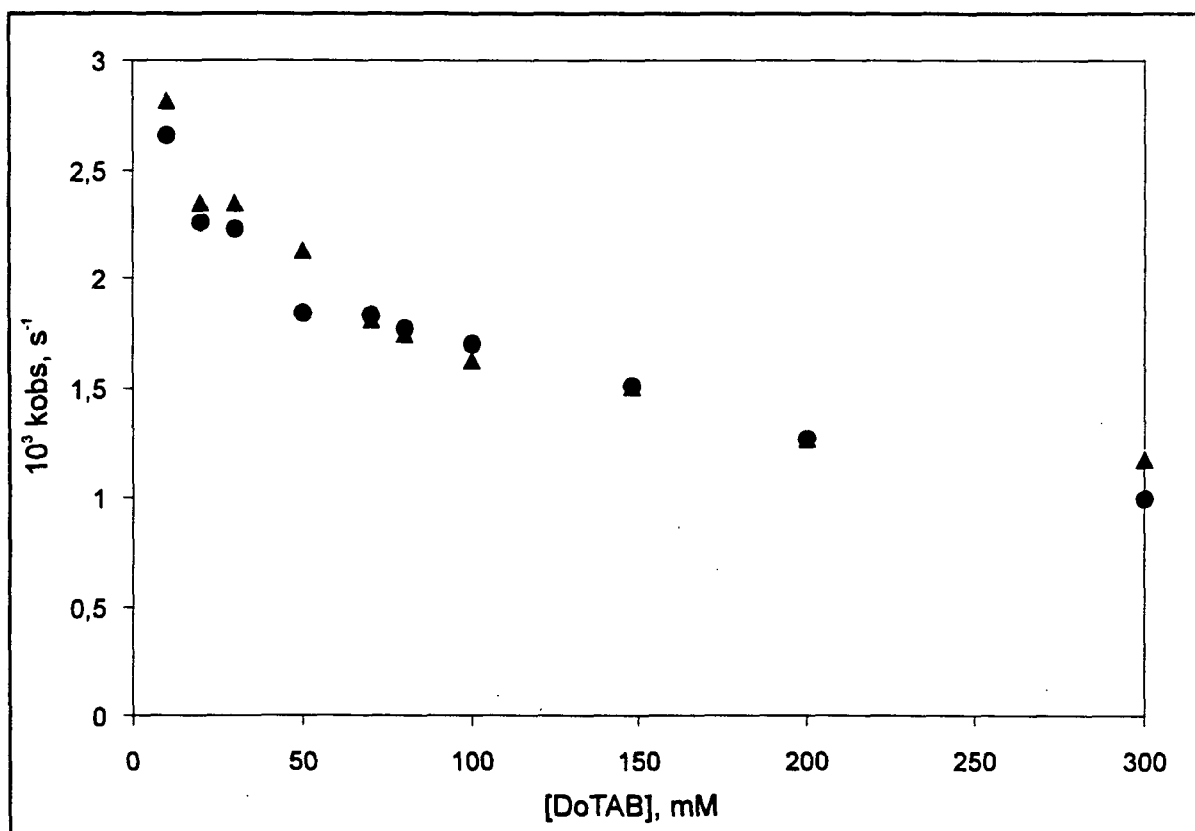


Fig. 21 - Efeito da concentração de DoTAB sobre a reação de oximólise do acetato de p-nitrofenila (NPA) com a oxima II, sem polímero (●) e com 1 mM de Hy (▲), em presença de tampão borato pH=9,80 e 175mM de NaBr.

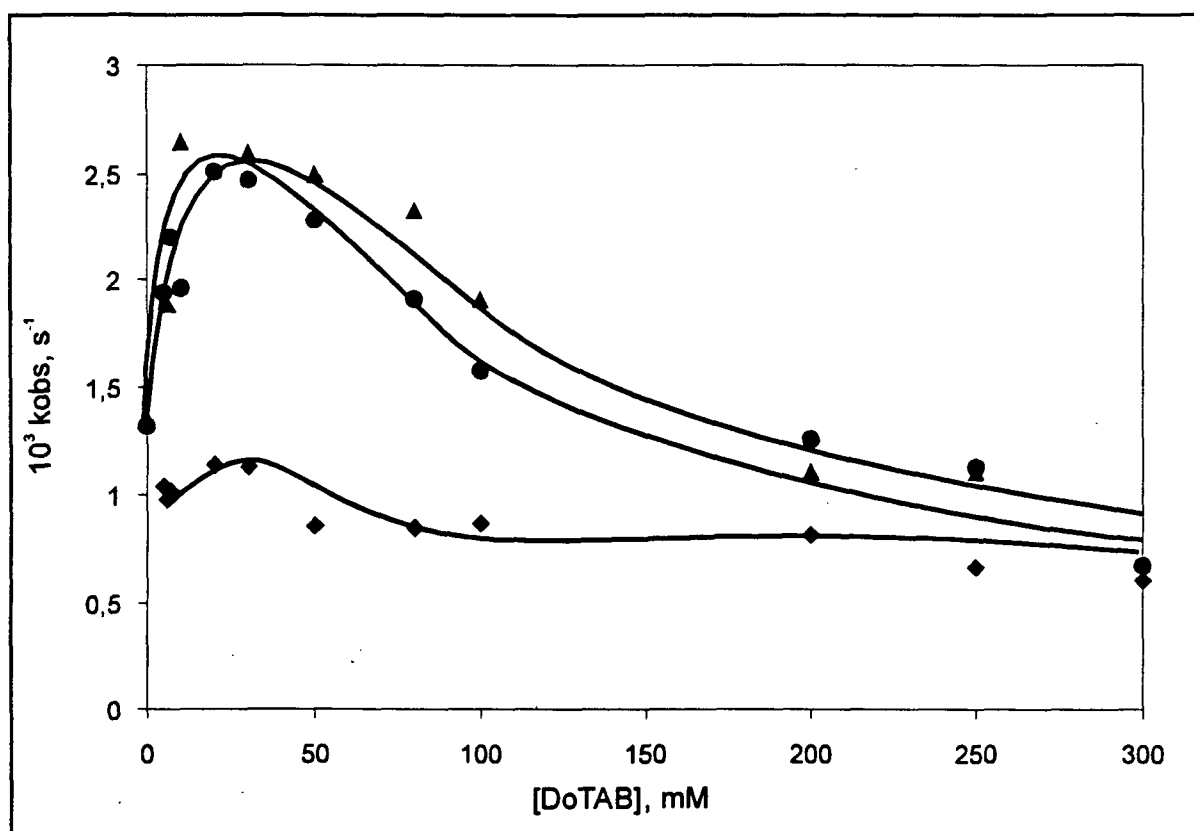


Fig. 22 - Efeito da concentração de DoTAB sobre a reação de oximólise do acetato de p-nitrofenila (NPA) com a oxima I, sem polímero (●) e com 1 mM de Hy (▲), em presença de tampão borato pH=9,80 e 175mM de NaBr. A curva abaixo representa a reação de hidrólise do NPA na ausência de polímero.

Nas mesmas condições experimentais, estudou-se o efeito da concentração do DoTAB sobre a reação de oximólise e hidrólise do octanoato de p-nitrofenila (NPO) na ausência e em presença de 1mM de Hy (Fig. 23 e 24). Todas as observações e considerações feitas para o substrato NPA são estendidas para o substrato NPO. No entanto, o NPO ($K_s=15000 \text{ M}^{-1}$)⁶⁵ é muito mais hidrofóbico do que o NPA ($K_s=54 \text{ M}^{-1}$)⁶⁴ que é a razão principal dos diferentes perfis das curvas observadas nas figuras 21, 22 e 23. Não obstante, a alta concentração de sal (175 mM de NaBr) na qual as reações são acompanhadas, é possível observar diferenças nos perfis que dependem das respectivas hidrofobicidades dos substratos, nucleófilos e da concentração de hidróxido na superfície micelar.

Da mesma forma, Romsted³¹ estudou a hidrólise dos ésteres hexanoato e acetato de p-nitrofenila e observou que o éster com longa cadeia paranífica tem maior preferência de formar "complexos" com as micelas de cloreto de tetradeciltrimetilamônio do que os ésteres de cadeia curta. Este fato estava estritamente relacionado com a hidrofobicidade dos substratos, isto é, o hexanoato estava mais incorporado na micela. Os valores das constantes de incorporação foram estimados como sendo 16.000 e 33 M^{-1} , respectivamente.

Inspecionando os perfis das curvas cinéticas das figuras 23 e 24, na ausência e em presença de 1mM de Hy, observa-se que o complexo Hy-DoTAB afeta também a reação de oximólise do NPO de forma idêntica daquela quando o polímero está ausente. Os valores de K_{obs} máximos estão bem deslocados para baixas concentrações de surfactante próximos do valor da CMC do DoTAB. O NPO e a oxima II ligam-se fortemente, tanto nas micelas normais de DoTAB quanto nos complexos Hy-DoTAB e que, portanto, é possível assumir que estejam localizados num mesmo microambiente químico, isto é, mesmo pH local, polaridade e potencial de superfície onde as reações processam-se.

Para a reação envolvendo a oxima I e NPO, o nucleófilo particiona em ambientes químicos diferentes, o que acarreta diferenças nos valores de K_{obs} . Para o NPA e a oxima I, cujos valores de constantes de incorporação são pequenos, tem-se a reação ocorrendo na pseudo-fase aquosa, por outro lado, a reação do NPA com a oxima II estaria em ambiente químico diferente, com a total incorporação da oxima nas micelas de DoTAB ou no agregado Hy-DoTAB.

Uma conclusão importante, sob o ponto de vista cinético, seria que o complexo Hy-DoTAB são agregados muito semelhantes às micelas normais de DoTAB, tendo em vista que nas mesmas condições experimentais estudadas, os agregados exercem semelhantes efeitos catalíticos. Espera-se então que propriedades micelares importantes como grau de dissociação, número de agregação, polaridade e potencial de superfície devem ser semelhantes em ambos os agregados nas condições experimentais estudadas. Entretanto, a figura 25 mostra exatamente o contrário da afirmação acima. Neste caso, estudou-se o efeito de inibição provocado pelo aumento da concentração do hialuronato sobre a reação de oximólise do NPA com a oxima II. Observa-se que em 5mM de Hy o valor da constante de velocidade praticamente reduz-se à metade quando comparado com o valor em 1mM de Hy. A figura 26 reforça o efeito causado pela concentração do polímero sobre a reação de oximólise do éster NPO com a oxima I. Os efeitos de inibição observados podem ser atribuídos à mudança do grau de dissociação do complexo, que aumentaria com o aumento da concentração de polímero e também devido ao aumento da pseudo-fase Hy-DoTAB que é análogo ao efeito de inibição observado quando aumenta-se [DoTAB] nos perfis, k_{obs} versus [DoTAB], observado nas figuras 21, 23 e 24, que é atribuído à diluição dos reagentes na pseudo-fase micelar.

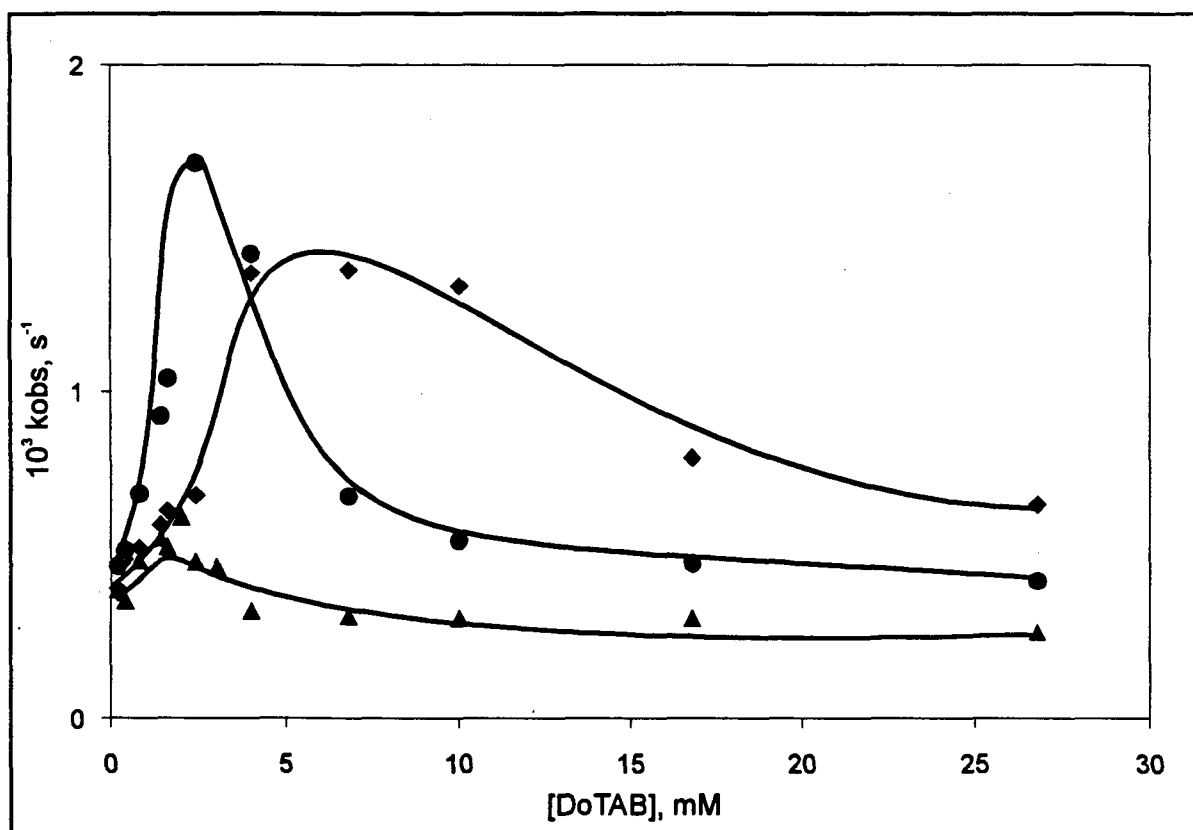


Fig. 23 - Efeito da concentração de DoTAB na velocidade de hidrólise (\blacktriangle) e oximólise do octanoato de *p*-nitrofenila (NPO) para a oxima I (\blacklozenge) e oxima II (\bullet) na ausência de polímero, em tampão borato pH=9,80 e 175mM de NaBr.

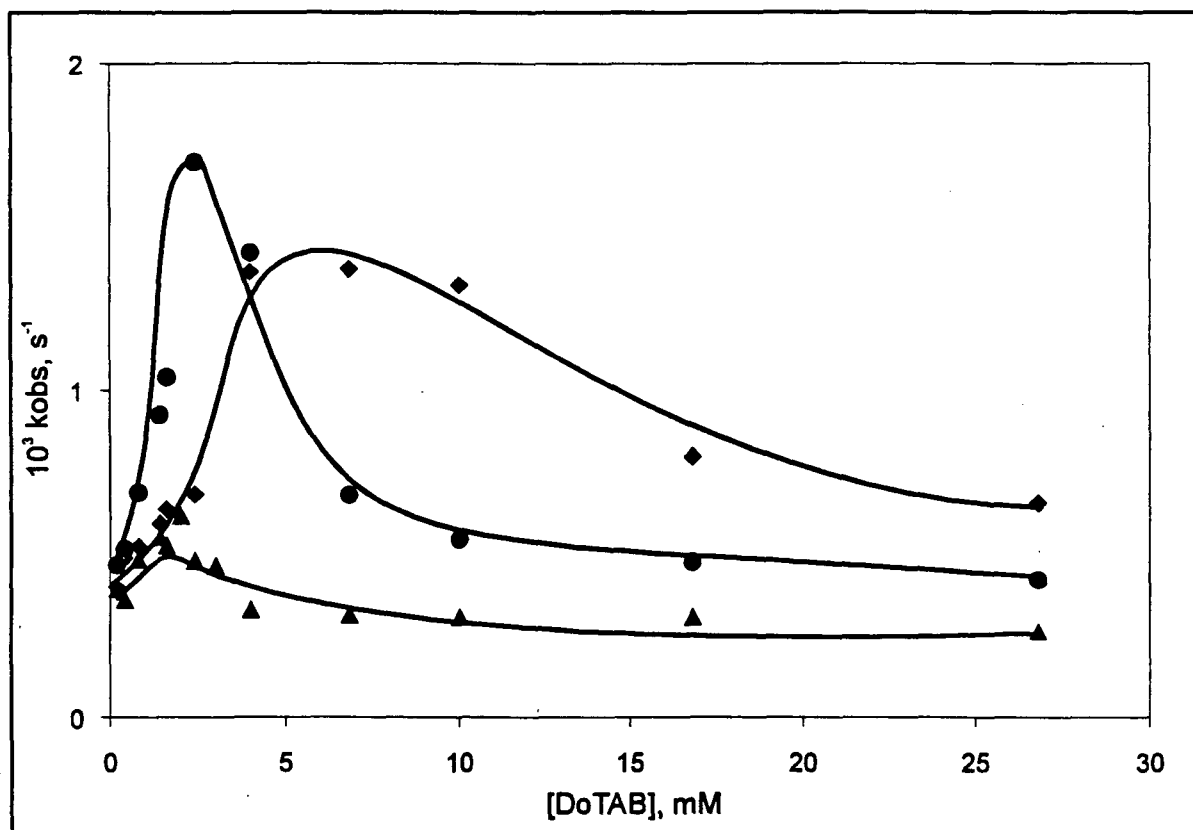


Fig. 23 - Efeito da concentração de DoTAB na velocidade de hidrólise (▲) e oximólise do octanoato de *p*-nitrofenila (NPO) para a oxima I (◆) e oxima II (●) na ausência de polímero, em tampão borato pH=9,80 e 175mM de NaBr.

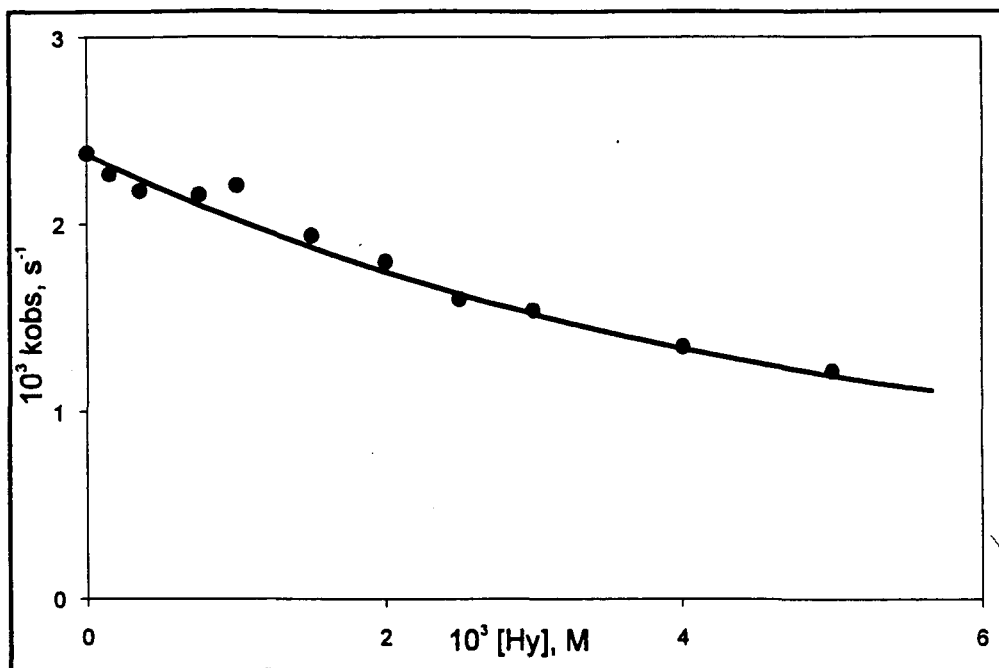


Fig. 25 - Efeito da concentração do hialuronato sobre a reação de oximólise do NPA com a oxima II, em presença de 25mM de DoTAB, tampão borato pH 9,80 e 175mM de NaBr.

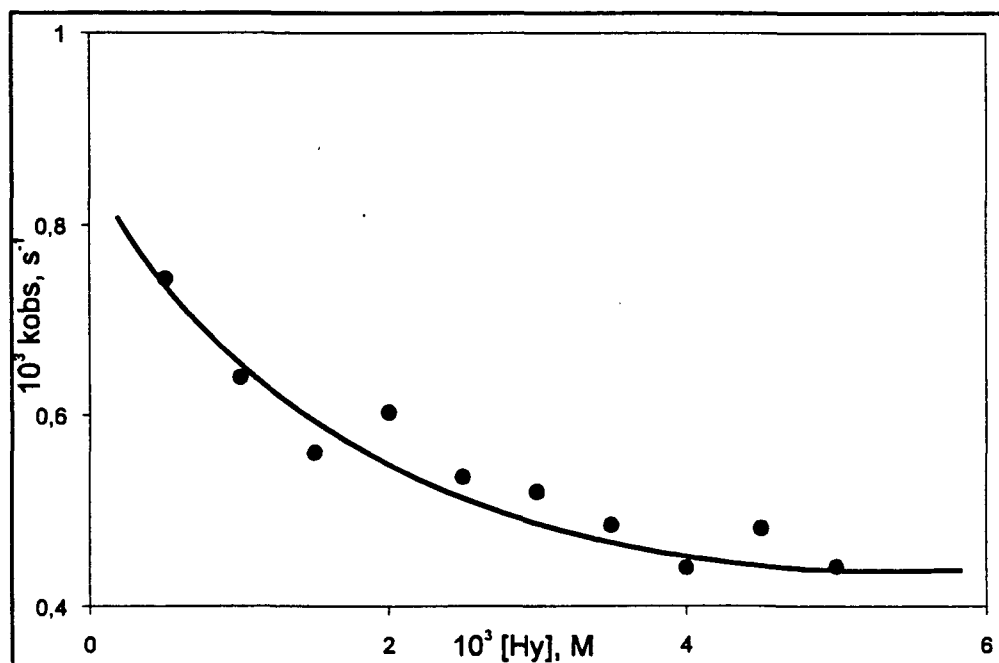


Fig. 26 - Efeito da concentração do hialuronato na reação de oximólise do NPO com a oxima I, em presença de 25mM de DoTAB, tampão borato pH 9,80 e 175mM de NaBr.

A figura 27 mostra o efeito da concentração do hialuronato sobre a reação de oximólise do NPA com a oxima I, em 25mM de DoTAB. Os dados mostrados não são surpreendentes e sim bastante claros, pois a constante da curva é devido ao substrato e nucleófilo serem bastante hidrofílicos e ainda, quando aumentamos a concentração de Hy, o polímero perderia sua flexibilidade e adquiriria um empacotamento muito rígido ("enroscado") o que impediria a penetração dos substrato e nucleófilo no complexo. Em concentrações de polímero maior que 5,0mM foi constatado um espalhamento de luz muito intenso, caracterizado pela formação de glóbulos na solução, consequentemente, uma mudança de estrutura estaria ocorrendo⁹.

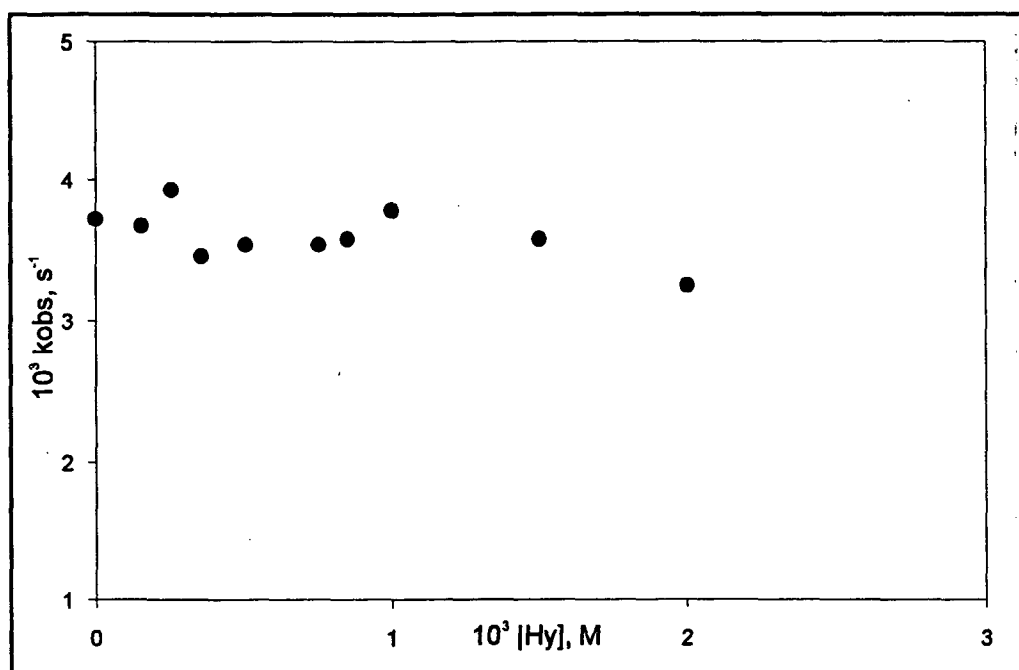
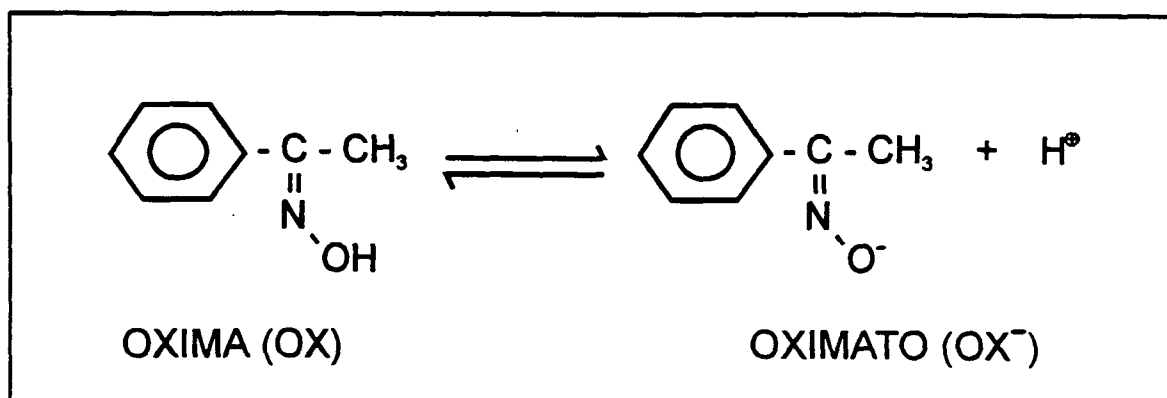


Fig. 27 - Efeito da concentração do hialuronato na reação de oximólise do NPA com a oxima I, em presença de 25mM de DoTAB, tampão borato pH 9,80 e 175mM de NaBr.

3- Medidas de pKa e pKap das Oximas

As reações bimoleculares catalisadas por micelas requerem que os reagentes incorporem-se nesses agregados e o conhecimento da natureza dos reagentes facilita a determinação das suas posições esperadas na micela⁶². As micelas causam mudanças acentuadas na constante de ionização aparente de ácidos orgânicos fracos quando ligados⁶⁶.

As oximas são ácidos orgânicos fracos derivados das cetonas e aldeídos cuja reatividade em água é bem conhecida⁶⁶, e cujo equilíbrio de dissociação ácido-base é definido pelo esquema 11 abaixo:



Esquema 11 - Equilíbrio ácido-básico da acetofenoxima.

A constante de ionização de ácidos fracos depende da basicidade do solvente e, portanto, do meio onde ocorre a reação. A estrutura molecular da forma protonada (ácida) e da forma desprotonada também influencia a constante de ionização das oximas. Para a acetofenoxima, o grupo fenila em ressonância com os elétrons π do grupo hidroxiiimino, exerce um efeito de retirar elétrons tornando os hidrogênios mais ionizáveis, pois a estabilidade da base conjugada

aumenta quando comparado com uma oxima alifática.

Em soluções micelares, o grau de ionização de oximas é altamente afetado pelas micelas. O pH interfacial é a principal variável a ser considerada quando a constante de velocidade depende da concentração do nucleófilo que inicialmente provém da ionização de um ácido fraco. A interpretação dos perfis de velocidade das reações de oximólise depende do conhecimento do valor de pK aparente (pK_{ap}) em função da concentração do surfactante. Então, para avaliar as reatividades das oximas em soluções micelares é necessário conhecer seus respectivos valores de pK_{ap}³³.

3.1- Medidas do pKa das Oximas em Água

Os valores do pKa para as oximas I e II na ausência de DoTAB foram determinados graficando diferentes valores de pH da solução versus a relação de absorção das espécies protonada (HOX) e desprotonada (OX⁻) dada pela equação 8.

$$\log \left(\frac{[\text{OX}^-]}{[\text{HOX}]} \right) = \log \left(\frac{(A_{\text{mis}} - A_{\text{HOX}})}{(A_{\text{OX}^-} - A_{\text{mis}})} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

onde A_{HOX} e A_{OX⁻} representam as absorbâncias das espécies em solução totalmente protonada e desprotonada, respectivamente. A_{mis} é a absorbância da mistura de espécies em solução, num determinado pH.

A figura 28 mostra a variação da relação logarítmica da razão [OX⁻]/[HOX] em função do pH na ausência de sal para a oxima II, determinado nos comprimentos de onda 270, 291 e 300 nm. O valor do pKa encontrado em água a partir da figura 28 é 12,36, quando log [OX⁻]/[HOX]=0.

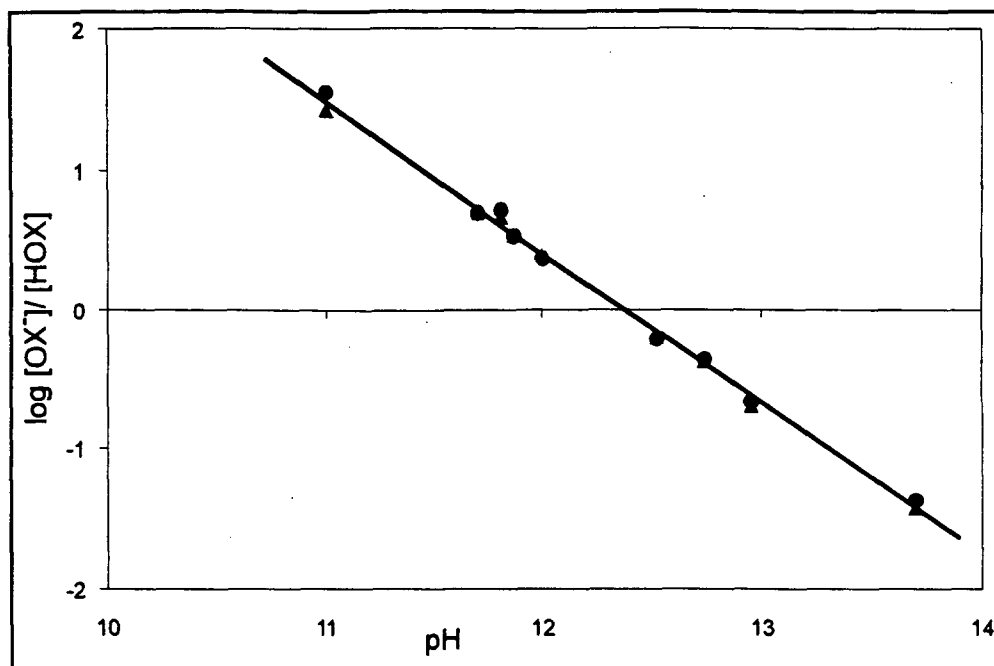


Fig. 28 - Efeito do pH sobre o Log da relação das concentrações das espécies protonada e desprotonada para a oxima II, determinado em 270 (●) e 291nm (▲), na ausência de sal.

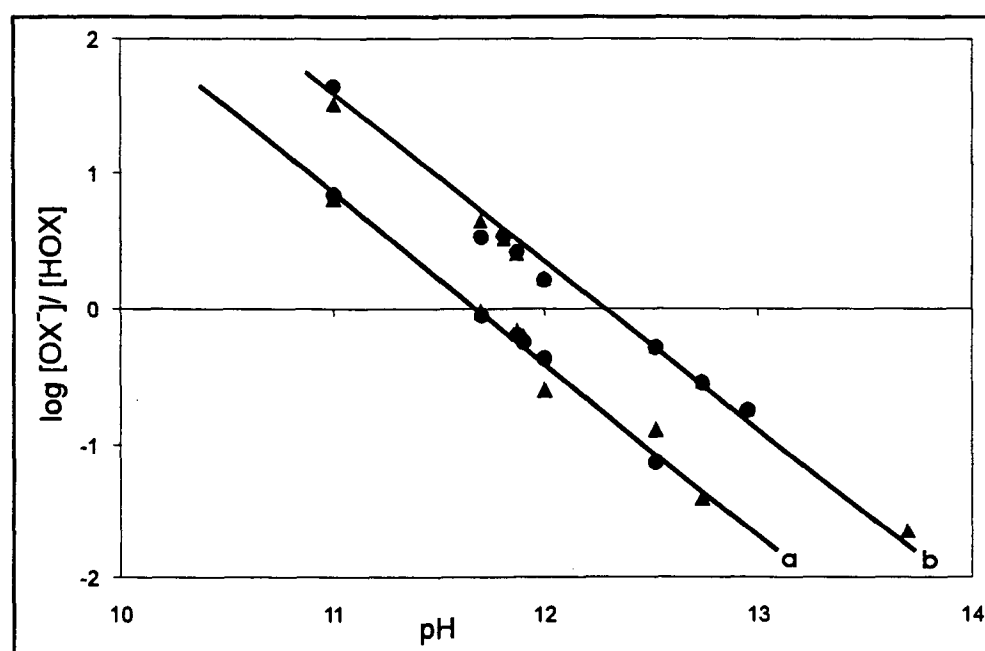
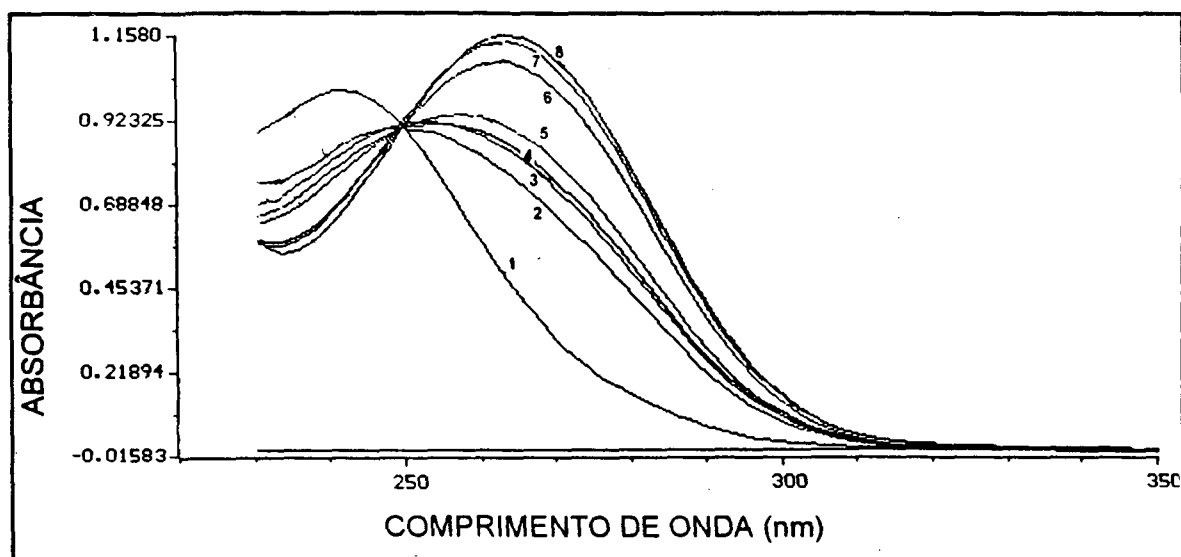


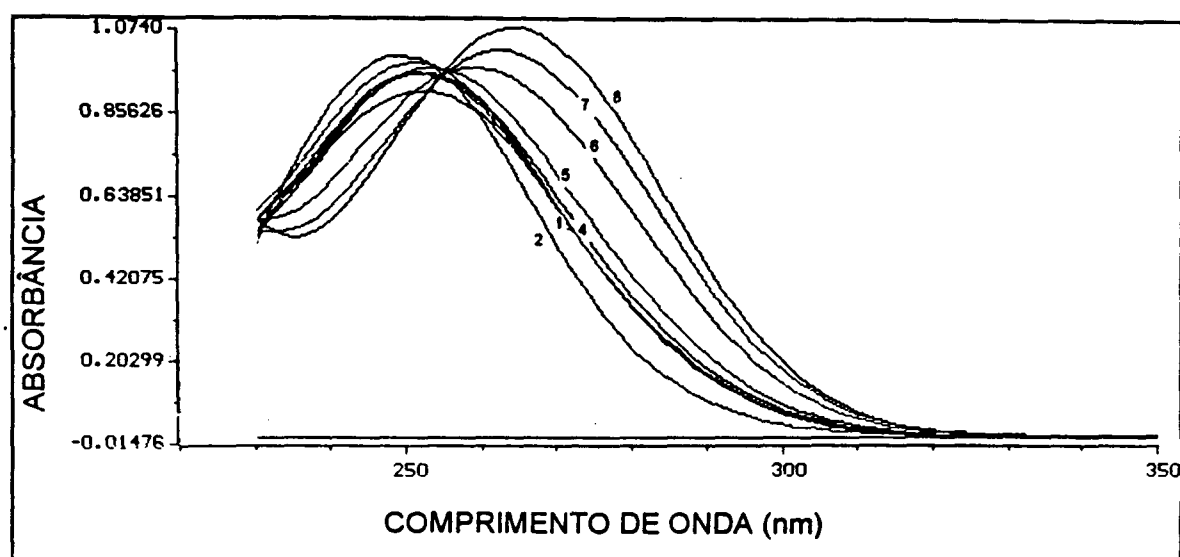
Fig. 29 - Efeito do pH sobre a relação $\log[OX^-]/[HOX]$ para a oxima I (a) e oxima II (b), medidos nos comprimentos de onda 270 (●) e 291nm (▲), na presença de 175mM de NaBr.

Os pKa das oximas também foram determinados em presença de sal, 175 mM de NaBr, a fim de avaliar o seu valor nas mesmas condições experimentais cinéticas. Os resultados encontrados foram 11,65 e 12,26 para as oximas I e II, respectivamente (Fig. 29). A figura 30 representa os espectros de absorção das oximas I (Fig. 32a) e II (Fig. 32b) em diferentes concentrações de base. Verifica-se que o ponto isobéstico para ambos nucleófilos estão próximos de 250 nm e a qualidade dos espectros de absorção são condizentes com um alto grau de pureza das amostras.

Os valores dos pKa para as oximas I e II em presença de sal são semelhantes aos valores quando na ausência de sal e são análogos aos valores da literatura. Os valores de pKa para a oxima II na ausência e presença de sal foram 12,36 e 12,26, respectivamente (literatura: $12,20 \pm 0,04$)⁶³. Para a oxima I em presença de sal foi 11,65 (literatura: $11,58 \pm 0,04$)⁶³. Isto significa que a força iônica não está influenciando significativamente no valor do pKa das oximas.



(a)



(b)

Fig. 30 - Espectro de absorção UV das oximas I (a) e II (b) em 175mM de NaBr e em diferentes concentrações de NaOH $1,0 \times 10^{-3}$ (1); $5,0 \times 10^{-3}$ (2); $7,5 \times 10^{-3}$ (3); $8,5 \times 10^{-3}$ (4); $3,5 \times 10^{-2}$ (5); $5,0 \times 10^{-2}$ (6); 0,1 (7) e 0,5M (8).

3.2- Medidas dos pKa Aparentes (pKap) das Oximas em Presença de Surfactantes

O efeito do DoTAB sobre o pKap da oxima II foi determinado com o uso da equação 9, proveniente da equação 8. O valor do pH na equação 9 refere-se ao pH do meio.

$$pK_{ap} = pH - \log \left(\frac{(A_{mis} - A_{HOX})}{(A_{OX} - A_{mis})} \right) \quad (Eq. 9)$$

A figura 31a mostra a variação do pKap da oxima II avaliado em 0,05M de NaOH e em presença de 175mM de NaBr em função da [DoTAB]. É interessante observar que o pKap da oxima II, altamente hidrofóbica, e portanto totalmente incorporada na micela, é constante em toda a faixa de concentração do surfactante estudada apresentando valores maiores do que em água. Nota-se ainda que o pKap aumenta repentinamente em 6,0mM de DoTAB. Este aumento do pKap, próximo do valor da CMC do DoTAB é atribuído à incorporação da oxima na fase micelar logo na CMC e também favorecido pela alta concentração de NaBr presente em solução que troca com os íons hidróxidos ligados na superfície micelar, deixando o pH local menos básico.

Portanto, as inibições da velocidade observada nas reações de oximólise ou hidrólise não podem ser atribuídas ao efeito do pKap da oxima II porque esses valores são sempre constantes em toda faixa de concentração de surfactante estudada. O pKap na presença de polímero não foi medido, porque o hialuronato em meio básico sofre quebra das ligações glicosídicas. A hidrólise do polímero começa com a desprotonação de um grupo OH (o pKa encontrado está próximo de 13)⁹.

Na fig. 31, a curva b, mostra o efeito do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) sobre o pKap da oxima II em presença de 0,0058M de brometo. Observa-se primeiramente um abaixamento do pKap para depois

aumentar e atingir valores próximos ao valor do pKa em água, quando em altas concentrações do surfactante. Este efeito é devido à presença de sal causado pelos α Cd brometos provenientes do surfactante micelizado. Comparando as formas das curvas das figuras 31a e 31b pode-se observar que o aumento do pKap é devido unicamente ao efeito salino provocado pela alta concentração de NaBr em solução e, por conseguinte, à troca iônica entre os brometos da fase aquosa (w) e os íons hidróxidos ligados (b).



Desta forma, em 175mM de NaBr, é suficiente para deixar a superfície da micela muito menos básica do que a pseudo-fase aquosa (NaOH=0,05M). Fundamentalmente, o pKap da oxima II é maior do que o pKa em água porque o pH local da camada de Stern, provavelmente, é menor do que o pH da pseudo-fase aquosa. Portanto, os diferentes perfis observados na fig. 31 estão relacionados com as diferentes concentrações de brometo em solução e que valores de concentração intermediários definiriam também perfis cujas funções seriam intermediárias entre os definidos pelas curvas a e b.

Estes tipos de mudanças nos valores de pKa tem sido arduamente estudados pelo modelo de pseudo-fase troca iônica.

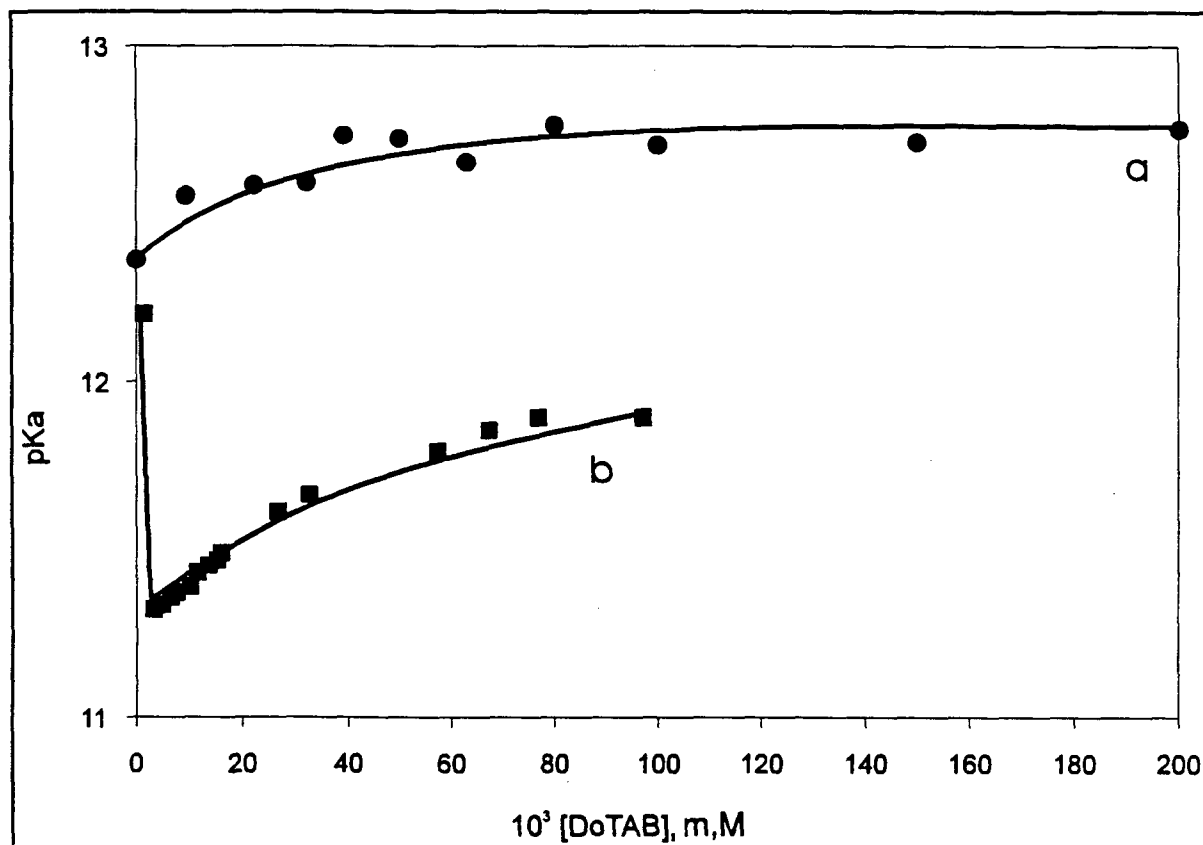
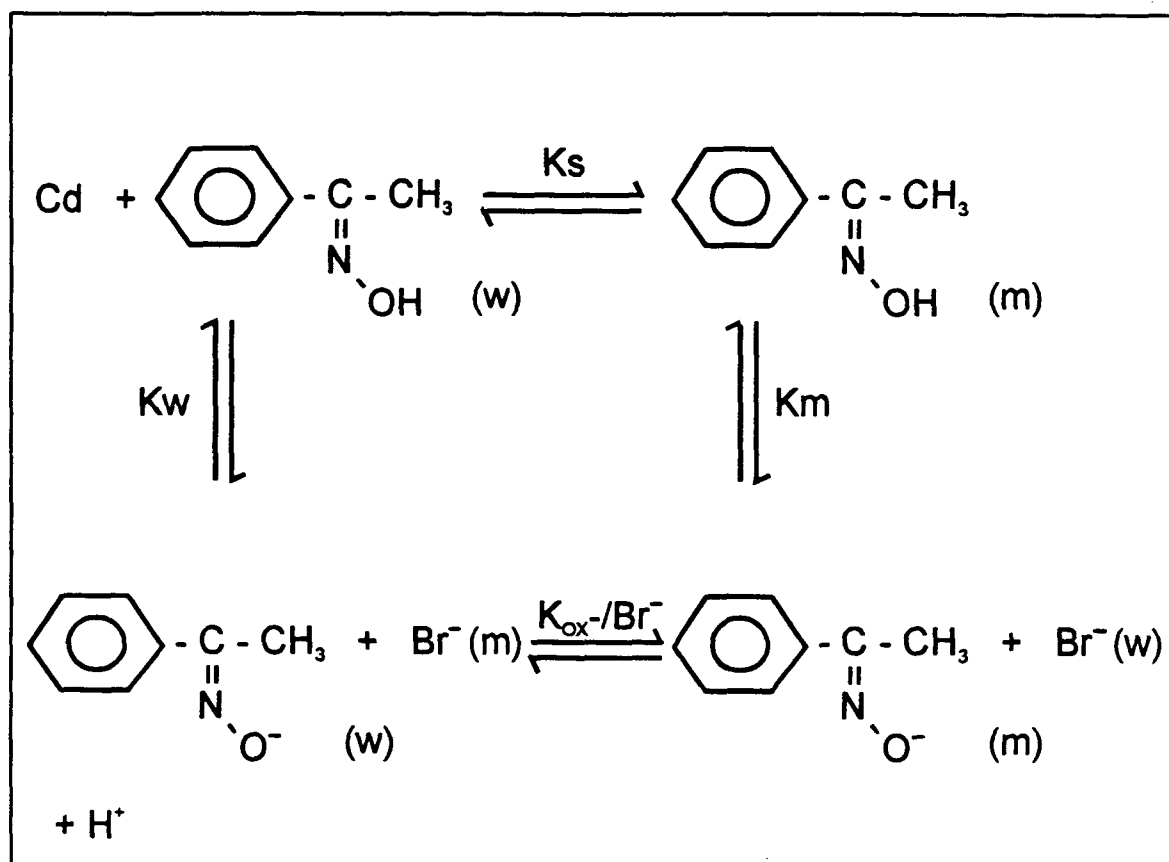


Fig. 31 - Efeito da [DoTAB] sobre o valor do pK_a da oxima II, determinado em 0,05M de NaOH(a) e efeito da [CTABr] sobre o pK_a da oxima II (b)⁶³.

Na determinação do pK_{ap} da oxima I, que é razoavelmente hidrofílica, verificou-se que o ponto isobéptico não era bem definido e estava deslocado para comprimentos de onda próximos de 280nm (Tabela 25). Esta dificuldade reside basicamente, no fato que a oxima I é hidrofílica e particiona entre as pseudo-fases micelares e aquosas. Um problema adicional é a troca iônica entre oximato ligado e o brometo livre (Eq. 15), onde K_{ox^-/Br^-} representa a constante de troca iônica OX^-/Br^- . A ionização do grupo hidroximiino ocorre tanto na pseudo-fase aquosa (w) como na micelar (m) cuja extensão depende da concentração do surfactante (Esquema 12).



Esquema 12 - Equilíbrios das espécies protonada e desprotonada para a oxima I na pseudo-fase micelar (m) e aquosa (w). K_s , K_w , K_m e K_{OX^-/Br^-} significam: constante de incorporação do substrato, constante de dissociação da oxima protonada (forma ácida) em água, constante de dissociação da oxima protonada na fase micelar e constante de troca iônica, respectivamente.

4 - Medidas de Intensidade de Fluorescência

A técnica de fluorescência permite a utilização de moléculas em concentrações micromoleculares capazes de fornecer informações sobre o microambiente no qual se encontram, no que se refere à viscosidade, vizinhança e polaridade. A técnica de fluorescência é geralmente associada com a emissão de energia radiante mediante o acompanhamento da emissão de um estado excitado singlete para o estado fundamental de baixa energia. Sondas fluorescentes são moléculas que funcionam como sensores do microambiente e os fótons emitidos por elas são verdadeiros "mapeadores" das vizinhanças da sonda num determinado tempo de emissão^{67,68}.

Em geral, o processo consiste da absorção de um fóton da própria frequência somente se a radiação incidente for polarizada, isto é, se o seu vetor elétrico for paralelo ao eixo do cromóforo. Se o vetor elétrico estiver orientado em todas as direções no espaço (Fig. 32), a radiação é dita não-polarizada⁶⁹.

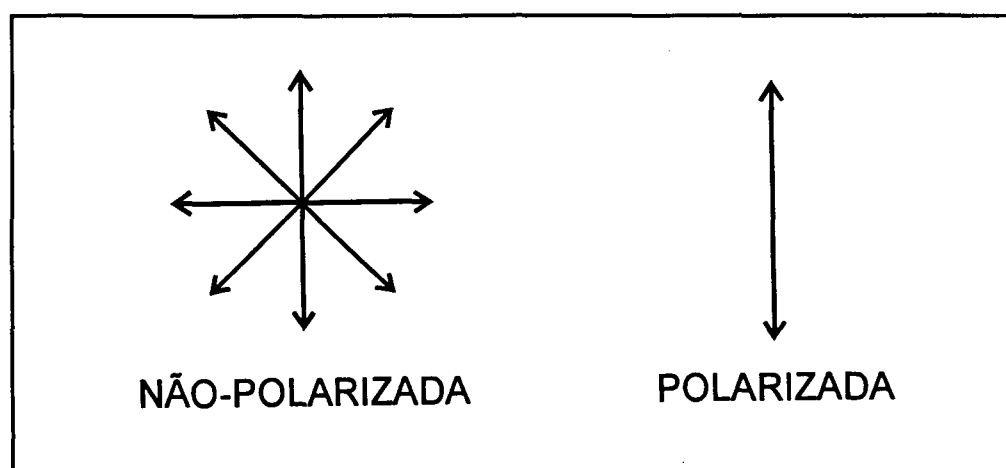


Fig. 32 - Representação do vetor elétrico da radiação não-polarizada e polarizada.

O grau de polarização de fluorescência (P) é definido por:

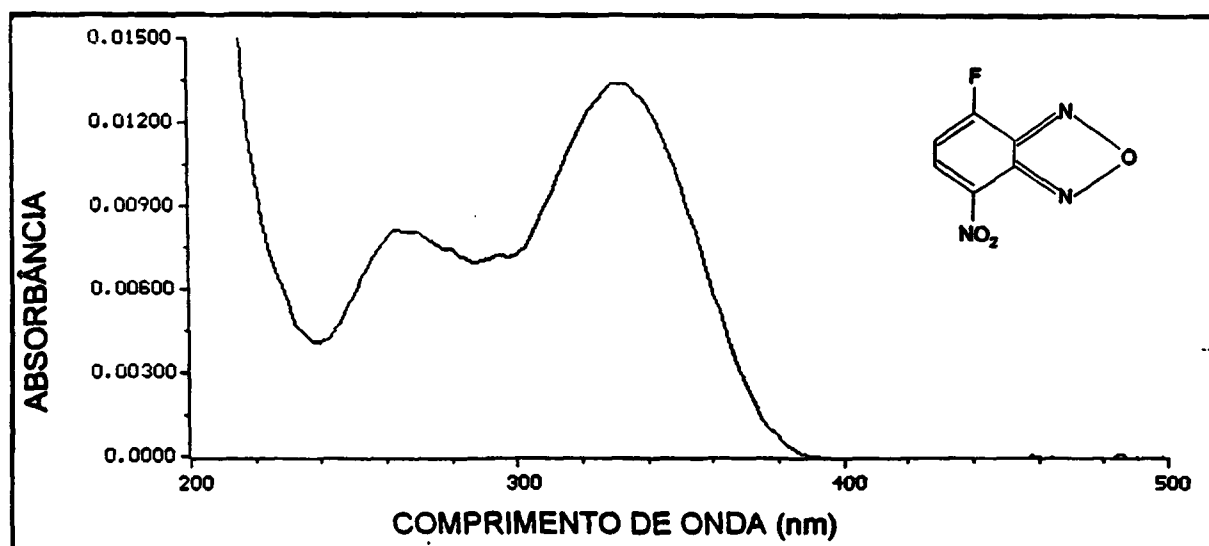
$$P = \frac{I_{HH} - I_{HV} (I_{VH} / I_{VV})}{I_{HH} + I_{HV} (I_{VH} / I_{VV})} \quad (Eq. 11)$$

onde I_{HH} e I_{VV} são as intensidades de fluorescência medidas com os polarizadores de excitação e emissão orientado nas posições horizontal-horizontal e vertical-vertical, respectivamente. As intensidades I_{HV} e I_{VH} foram medidas com o polarizador de excitação e emissão nas posições horizontal-vertical e vertical-horizontal.

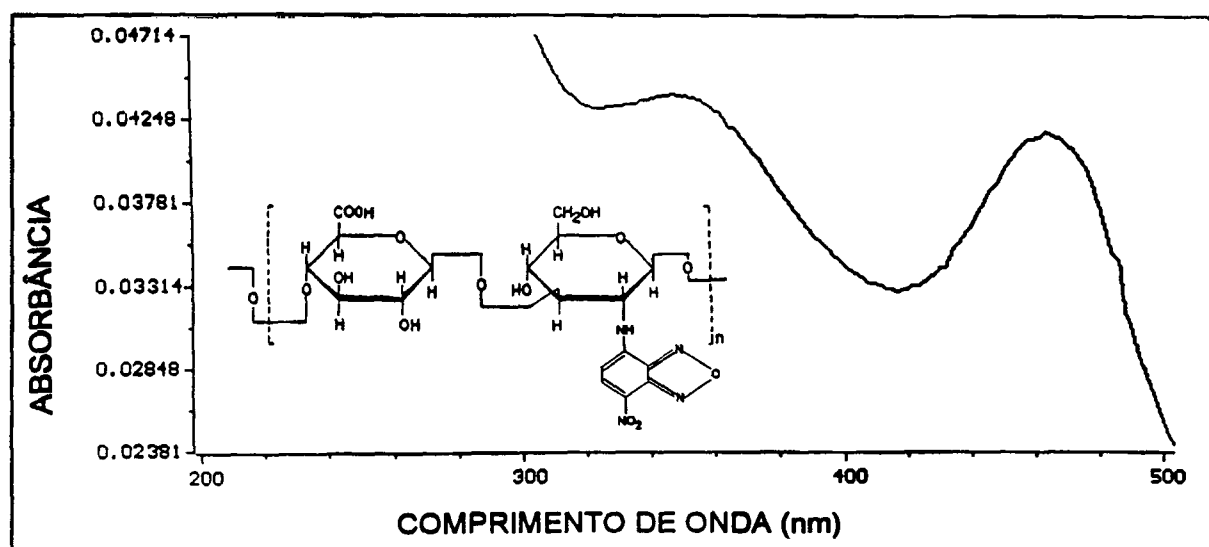
Com o objetivo de conhecer melhor as interações da formação do complexo Hy-DoTAB, utilizou-se a molécula-sonda 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F), ligada covalentemente no polímero cuja descrição está na referência 9. A figura 33 mostra o espectro de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) da sonda livre (NBD-F) e o da sonda ligada no polímero (Hy-NBD) em solução com 175mM de NaBr. Pode-se observar o acentuado deslocamento batocrômico da banda de absorção do Hy-NBD. Em solução aquosa, a sonda livre NBD-F e a ligada no polímero Hy-NBD apresentam suas bandas de absorção em 330 e 464 nm, respectivamente. O espectro de fluorescência do Hy-NBD em 20mM de tampão borato, pH=9,80 e 175mM de NaBr mostrou máximos de excitação e emissão em 470 e 548 nm, respectivamente. Essas propriedades espectrais demonstram que a sonda está ligada covalentemente no grupo amino do monômero glucosamina. A ligação da sonda no polímero é efetuada por uma reação de substituição nucleofílica com o ataque do grupo amino, da unidade D-glucosamina, sobre o carbono-7 do NBD-F que contém um bom grupo de saída (fluoreto). O produto da reação apresenta intensa absorção e propriedades fluorescentes no qual é extremamente sensível à polaridade do meio^{70,71}.

Mediu-se também a intensidade de fluorescência da solução de

Hy-NBD em presença e na ausência de 175mM de NaBr, nas mesmas condições experimentais, obtendo-se valores de polarização de 0,188 e 0,184, respectivamente, cujos valores demonstram que a polarização não é afetada pela adição de sal quando comparada com o valor na ausência.



(a)



(b)

Fig. 33 - Espectro de absorção UV-Visível para a sonda livre (a) e ligada no polímero (b) em 175mM de NaBr.

As figura 34 e 35 mostram o efeito da concentração de DoTAB sobre a intensidade de fluorescência (I) e polarização (P) do Hy-NBD, medido

em 548nm e em presença de 175mM de NaBr. Observa-se que em baixas concentrações de DoTAB (concentrações inferiores a 3,2mM) os valores de polarização permanecem constantes e são semelhantes àqueles medidos sem DoTAB em presença e na ausência de sal. A polarização de fluorescência começa a diminuir quando a concentração do surfactante atinge a CMC. Analogamente, a intensidade de fluorescência mostra um ímpeto aumento na mesma concentração de surfactante, indicando uma mudança no microambiente da sonda, isto é, do aquoso para o ambiente micelar, demonstrando que é sensível à diminuição da micropolaridade do meio. De fato, mediu-se a intensidade de fluorescência de 1mM de Hy-NBD em diferentes frações de água-tetrahidrofurano (Fig. 36) e observou-se que a intensidade de fluorescência aumenta com o aumento da percentagem de tetrahidrofurano. A figura 36 mostra que para 34,8% de tetrahidrofurano a intensidade de fluorescência é duas vezes maior ($I=4,430$) do que quando em água⁷² ($I=2,454$).

As mudanças significativas das curvas observadas de intensidade e polarização de fluorescência do Hy-NBD são patentes e estão intrinsecamente relacionadas com o aparecimento dos agregados micelares. Abaixo da CMC do surfactante não se observa qualquer mudança da intensidade e polarização de fluorescência, conseqüentemente, a sonda "sente" o mesmo microambiente em toda faixa de [DoTAB] estudada abaixo da CMC do surfactante.

Thalberg e Lindmam⁶ estudaram a interação do Hy com diferentes surfactantes catiônicos. Em seus estudos de condutividade na ausência de sal e em concentrações abaixo da CMC, eles demonstram que ocorrem duas mudanças abruptas na função linear dos valores de condutância versus a concentração de brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB). A primeira inflexão foi denominada C_1 e interpretada como sendo o início de uma ligação cooperativa do surfactante sobre o polímero. À medida que se aumenta a concentração do surfactante, observaram uma segunda inflexão próxima de 1mM de TTAB,

denominada C₂ e definida como o final da ligação do polímero no surfactante. Nesta região (entre C₁ e C₂), onde a ligação do surfactante é cooperativa, também ocorre separação de fase devido à neutralização parcial das cargas negativas do polímero por ligação eletrostática do monômero catiônico. Os autores demonstram ainda que a adição de um excesso de surfactante e/ou sal redissolve o complexo. Explicaram a redissolução do complexo polímero surfactante baseado no fato de que ocorre diminuição da ligação do surfactante no polímero, isto é, o complexo torna-se menos estável do que micelas normais de TTAB.

Nas condições experimentais deste trabalho, utilizou-se alta concentração de sal, o que corresponde a uma elevada densidade de carga que desfavorece por "blindagem", a ligação do surfactante catiônico monomérico no polímero aniônico. Já em baixas concentrações de sal, as interações eletrostáticas entre o monômero e o polímero causam precipitação⁶. A interação de polímeros com surfactantes de carga oposta descrita por outros autores^{6,41,58} foi observada em concentrações de surfactantes abaixo da CMC, no entanto, em nossas condições a sonda fluorescente não "observa" essas interações, consistente com a "blindagem" das cargas devido à adição de sal e por conseguinte diminuição da ligação do surfactante no polímero. Portanto, em alta concentração de sal, a associação é devido às interações do polímero na micela de DoTAB. Esta conclusão é pertinente aos dados da figura 34, isto é, o aumento da intensidade e a diminuição da polarização de fluorescência é devido ao fato que a sonda está sendo transferida da água para um microambiente menos polar do complexo polímero-micela. Embora nós assumimos que a "blindagem" provocada pelo sal evita a associação entre o polímero e o surfactante monomérico, isto não impediria a associação com as micelas por causa de sua alta densidade de carga.

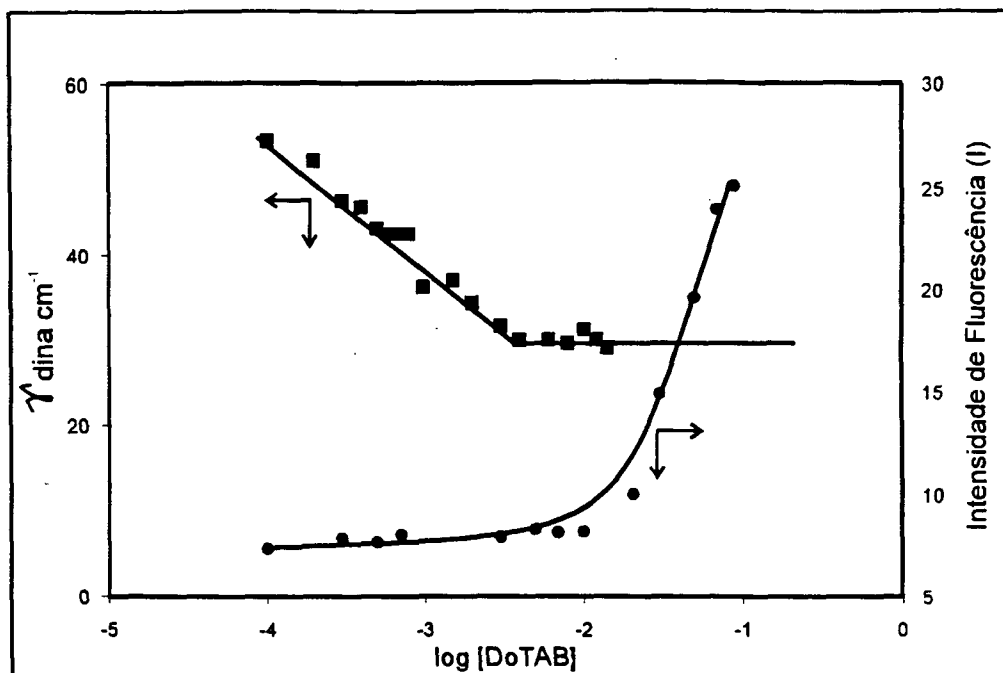


Fig. 34 - Intensity de fluorescência do Hy-NBD como função da concentração de DoTAB (●) e CMC do DoTAB na presença de 1mM de Hy (■), em 175mM de NaBr.

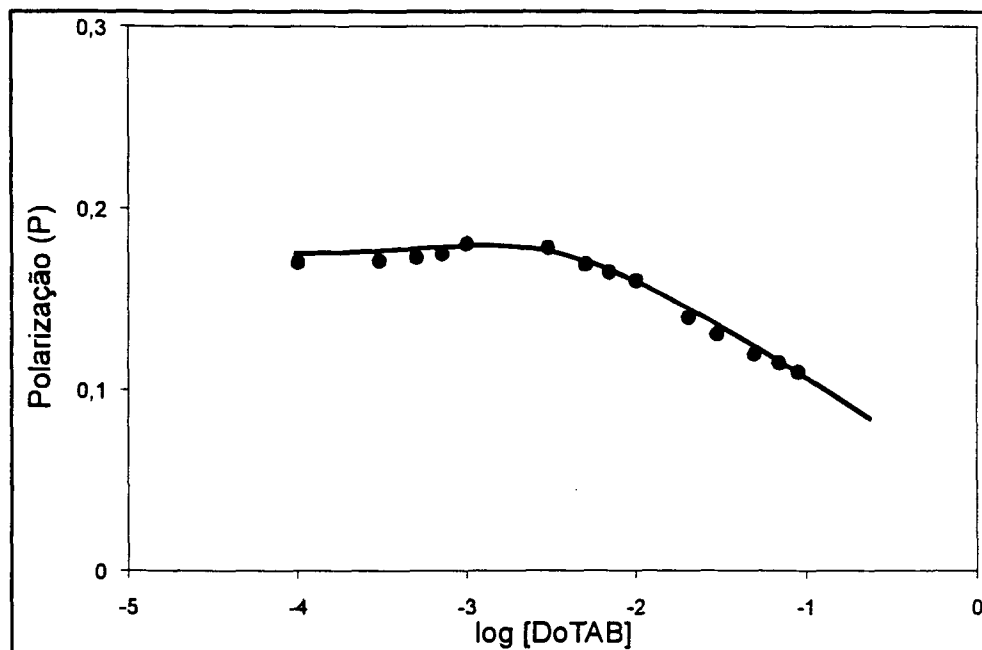


Fig 35 - Variação dos valores de polarização versus concentração de DoTAB em 175mM de NaBr.

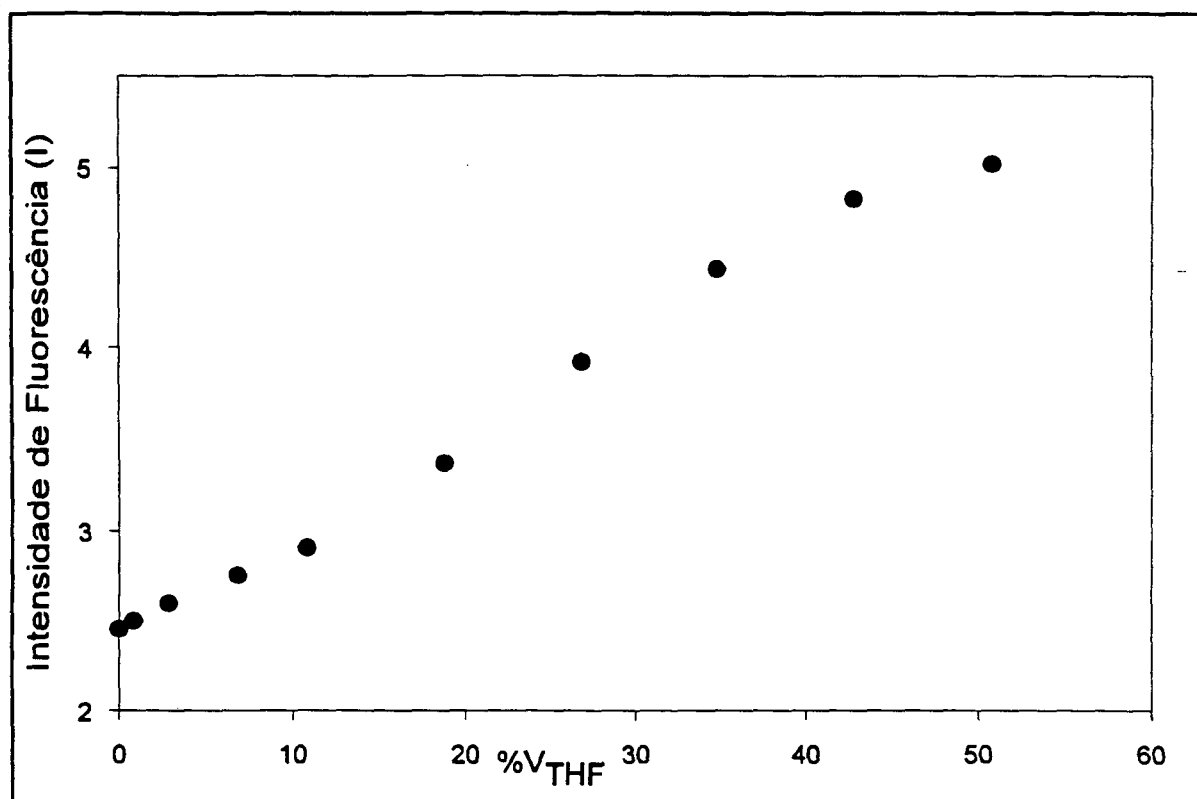


Fig. 36 - Variação dos valores de intensidade de fluorescência do Hy-NBD versus % de volume de tetrahidrofurano (THF) e água.

A ligeira diminuição da polarização em concentrações de DoTAB acima da CMC é provavelmente relacionada com o aumento do tempo de meia-vida da sonda no microambiente micelar, causado por um aumento da viscosidade do meio no qual a sonda está dispersa⁶⁷. Sendo assim, não é possível traçar algumas conclusões sobre conformações do hialuronato baseadas nessas mudanças de polarização, embora são frequentemente relacionadas com mudanças conformacionais. Além disso, tem sido estudado que a difusão translacional do Hy é independente da conformação em diferentes concentrações de sal⁷³, não se tem certeza de como a difusão rotacional seria afetada por mudanças conformacionais. Análogas explicações podem ser dadas para complexos formados por polímeros não-iônicos e surfactantes, onde os complexos envolvem a associação ou o "atracamento" das micelas do surfactante na cadeia polimérica (Fig.37). Isto significa que o ambiente dos grupos alquila do surfactante é parecido com as micelas iônicas e as interações que ocorrem na região hidrofílica ou próximo dos primeiros grupos metilênicos do surfactante em estudo^{51,74}.

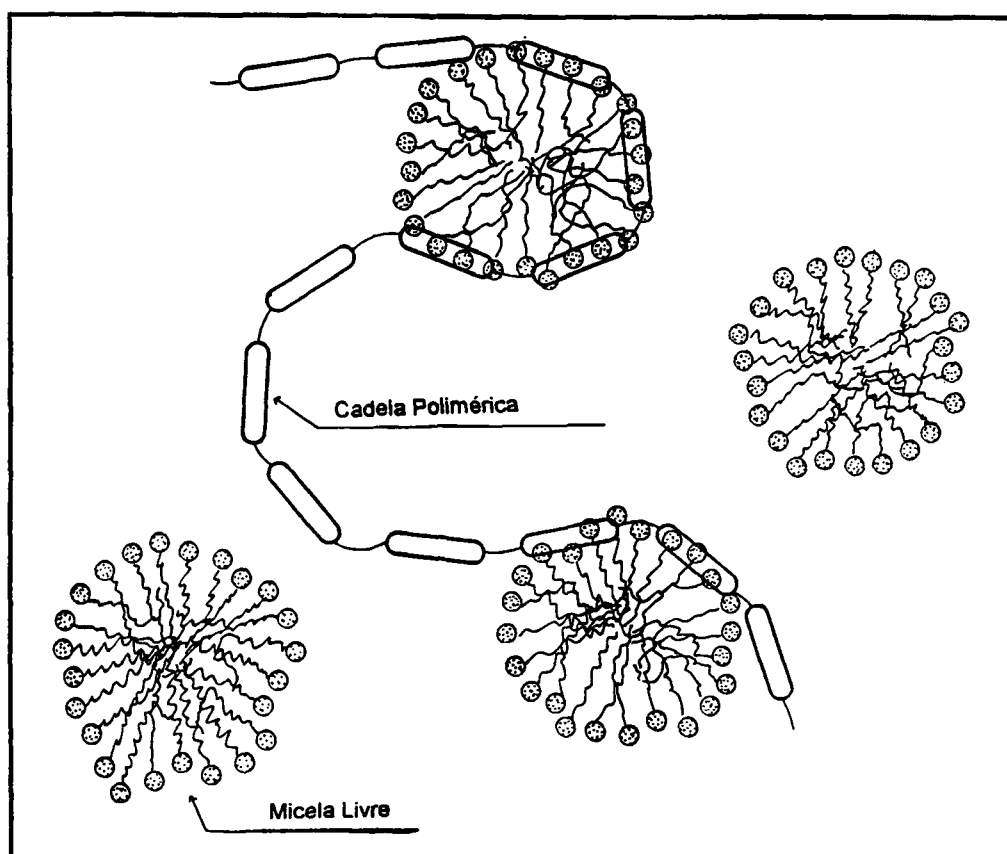


Fig. 37 - Representação esquemática do complexo Hy-DoTAB em solução.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO

As reações de oximólise e hidrólise dos ésteres NPO e NPA em presença e na ausência de 1mM de polímero e em 175mM de NaBr, mostram que, nas mesmas condições experimentais, o complexo Hy-DoTAB catalisa as reações analogamente às micelas normais de DoTAB. Sob o ponto de vista cinético, conclui-se que os complexos são agregados muito semelhante às micelas de DoTAB. Em concentrações acima de 1mM de hialuronato em 25mM DoTAB, observou-se que a reação de oximólise era ligeiramente inibida.

Os resultados que apresentam evidências interessantes sobre a interação do hialuronato com DoTAB são os de fluorescência. O ímpeto aumento da intensidade de fluorescência está estritamente relacionado com o aparecimento de micelas em solução e o início da ligação de DoTAB sobre a cadeia do hialuronato parcialmente modificado pela sonda NBD. Análogamente, os resultados de polarização de fluorescência são concordantes com as considerações feitas acima.

Finalmente, as interpretações dos resultados cinéticos à luz dos resultados de fluorescência, nos diz que o complexo Hy-DoTAB e micelas de DoTAB exercem semelhantes efeitos catalíticos porque o complexo nada mais seria do que o polímero associado à micela de DoTAB, observado acima da CMC, e em ambos os casos, a catálise é exercida por agregados micelares do brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB).

TABELAS

TABELA 02 - Valores de tensão superficial do DoTAB em água.

$-\ln [\text{DoTAB}], \text{ M}$	γ (dina. cm^{-1})
6,91	60,50
6,22	59,10
5,81	57,30
5,52	56,70
5,30	54,00
5,12	52,60
4,96	51,80
4,83	51,20
4,71	51,20
4,60	50,50
4,42	47,30
4,27	45,10
4,13	43,20
4,02	43,00
3,91	43,00
3,86	43,20
3,82	42,80
3,73	43,50
3,65	43,30
3,58	43,30
3,51	43,70
3,47	43,30
3,44	43,10
3,38	43,50
3,32	43,60
3,27	43,40
3,22	43,30
3,17	43,60
3,12	43,60

TABELA 03 - Valores de tensão superficial do DoTAB em presença de 175mM de NaBr.

-log [DoTAB], M	γ (dina. cm⁻¹)
4,00	42,87
3,70	42,99
3,52	45,60
3,40	44,81
3,22	40,02
3,07	41,96
3,00	41,01
2,82	38,64
2,70	35,33
2,60	34,96
2,52	34,00
2,40	31,65
2,10	30,28
2,00	29,44
1,82	28,66
1,52	29,31
1,35	28,92
1,22	30,09
1,00	28,68

TABELA 04 - Valores de tensão superficial do DoTAB em presença de 1mM de Hy em 175mM de NaBr.

-log [DoTAB]	γ (dina. cm⁻¹)
4,00	53,63
3,70	51,32
3,52	46,59
3,40	45,80
3,30	43,30
3,22	42,59
3,16	42,59
3,10	42,59
3,01	36,28
2,82	37,07
2,70	34,40
2,52	31,70
2,40	30,08
2,22	30,08
2,10	29,70
2,00	31,26
1,92	30,08
1,85	29,11

TABELA 05 - Valores de tensão superficial do DoTAB em presença de 2,5mM de Hy e 175mM de NaBr.

-log [DoTAB], M	γ (dina. cm⁻¹)
4,00	42,59
3,70	41,80
3,52	38,25
3,40	41,40
3,22	40,81
3,07	36,87
3,00	32,20
2,82	31,65
2,70	29,96
2,60	27,37
2,52	27,98
2,35	27,98
2,22	28,63
2,10	29,44
2,00	27,93
1,60	27,93
1,40	27,93
1,26	28,59
1,12	27,51

TABELA 06 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
10	2,66
20	2,26
30	2,23
50	1,84
70	1,83
80	1,77
100	1,70
148	1,51
200	1,27
300	1,00

TABELA 07 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na presença de 1mM de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
10	2,82
20	2,35
30	2,35
50	2,13
70	1,81
80	1,75
100	1,63
148	1,51
200	1,27
300	1,18

TABELA 08 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,00	1,32
5,00	1,94
7,00	2,20
10,00	1,96
20,00	2,51
30,00	2,47
50,00	2,28
80,00	1,91
100,00	1,58
200,00	1,26
250,00	1,13
300,00	0,68

TABELA 09 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na presença de 1mM de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,00	1,36
6,00	1,89
10,00	2,65
30,00	2,60
50,00	2,50
80,00	2,33
100,00	1,91
200,00	1,11
250,00	1,11

TABELA 10 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de hidrólise do NPA em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
5,00	1,04
6,00	0,98
7,00	1,02
10,00	-
20,00	1,14
30,00	1,13
50,00	0,86
80,00	0,85
100,00	0,87
200,00	0,82
250,00	0,67
300,00	0,61

TABELA 11 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,20	0,402
0,40	0,491
0,80	0,526
1,40	0,595
1,60	0,638
2,40	0,682
4,00	1,360
6,80	1,370
10,00	1,320
16,80	0,798
26,80	0,656

TABELA 12 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,20	0,470
0,40	0,520
0,80	0,698
1,40	0,924
1,60	1,040
2,40	1,700
4,00	1,420
6,80	0,681
10,00	0,548
16,80	0,480
26,80	0,427

TABELA 13 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de hidrólise do NPO em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e na ausência de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,20	0,4003
0,40	0,366
0,80	0,489
1,40	0,555
1,60	0,530
2,00	0,620
2,40	0,485
3,00	0,469
4,00	0,333
6,80	0,319
10,00	0,312
16,80	0,313
26,80	0,267

TABELA 14 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e 1mM de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,20	0,415
0,40	0,523
0,80	0,520
1,40	0,670
1,60	0,610
2,40	0,698
4,00	1,210
6,80	1,140
10,00	1,070
16,80	0,867
26,80	0,707

TABELA 15 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPO com a oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em 1mM de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,20	0,323
0,40	0,604
0,80	0,678
1,40	0,973
1,60	1,150
2,00	1,260
2,40	1,710
3,00	1,670
4,00	1,210
6,80	0,827
10,00	0,450
16,80	0,366
26,80	0,323

TABELA 16 - *Varição dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de hidrólise do NPO em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em 1mM de Hy ($T=30^{\circ}C$).*

[DoTAB], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,20	0,393
0,40	0,431
0,80	0,422
1,40	0,440
1,60	0,548
2,00	0,462
2,40	0,455
3,00	0,487
4,00	0,369

TABELA 17 - *Varição dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de oximólise do NPA com a oxima II em função da concentração de hialuronato, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e $2,5 \times 10^{-2}M$ de DoTAB ($T=30^{\circ}C$).*

[Hy], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,00	2,38
0,15	2,27
0,35	2,18
0,75	2,16
1,00	2,21
1,50	1,94
2,00	1,80
2,50	1,60
3,00	1,54
4,00	1,35
5,00	1,22

TABELA 18 - *Variação dos valores da constante de velocidade (k_{obs}) da reação de hidrólise do NPO com a oxima I em função da concentração de hialuronato, em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em $2,5 \times 10^{-2}M$ de DoTAB ($T=30^{\circ}C$).*

[Hy], mM	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,50	0,743
1,00	0,640
1,50	0,561
2,00	0,603
2,50	0,536
3,00	0,520
3,50	0,485
4,00	0,441
4,50	0,482
5,00	0,442

TABELA 19 - *Efeito da concentração de polímero sobre a reação de oximólise do NPA com a oxima I em presença de 175mM de NaBr, pH 9,80 e em $2,5 \times 10^{-2}M$ de DoTAB ($T=30^{\circ}C$).*

$10^3[Hy], M$	$10^3 k_{obs}, s^{-1}$
0,00	3,72
0,15	3,67
0,25	3,93
0,35	3,46
0,50	3,54
0,75	3,54
0,85	3,58
1,00	3,78
1,50	3,58
2,00	3,25

TABELA 20 - Determinação do pK_a da oxima II em água. Variação dos valores de pH em função da expressão $\log[OX^-]/[HOX]$ nos comprimentos de ondas: 270, 291 e 300 nm.

pH	$\log [OX^-] / [HOX]$		
	270 nm	291 nm	300 nm
11,00	1,55	1,43	-
11,70	0,70	0,71	0,71
11,81	0,72	0,68	0,68
11,87	0,54	0,55	0,55
12,00	0,38	0,40	0,40
12,52	-0,21	-0,20	-0,18
12,74	-0,36	-0,37	-0,37
12,95	-0,67	-0,69	-0,66
13,70	-1,37	-1,42	-

Para 270 nm: - $A_{HOX} = 0,4868$
 - $A_{OX^-} = 1,0342$

Para 291nm: - $A_{HOX} = 0,072715$
 - $A_{OX^-} = 0,43502$

Para 300nm: - $A_{HOX} = 0,02349$
 - $A_{OX^-} = 0,20933$

TABELA 21 - Determinação do pK_a da oxima II em presença de 175mM de NaBr. Variação dos valores de pH em função da expressão $\log[OX^-]/[HOX]$ nos comprimentos de ondas: 270, 291 e 300 nm ($T=30^\circ C$).

pH	$\log [OX^-] / [HOX]$		
	270 nm	291 nm	300 nm
11,00	1,65	1,52	1,54
11,70	0,53	0,65	0,56
11,81	0,54	0,52	0,52
11,87	0,42	0,41	0,41
12,00	0,21	0,23	0,24
12,52	-0,29	-0,28	-0,28
12,74	0,55	0,54	0,48
12,95	-0,75	-0,74	-0,73
13,70	-2,29	-1,65	-1,41

TABELA 22 - Determinação do pK_a da oxima I em presença de 175mM de NaBr. Variação dos valores de pH em função da expressão $\log[OX^-]/[HOX]$ nos comprimentos de ondas: 270, 291 e 300 nm ($T=30^\circ C$).

pH	$\log [OX^-] / [HOX]$		
	270 nm	291 nm	300 nm
11,00	0,84	0,81	0,87
11,70	-0,051	-0,021	0,013
11,87	-0,20	-0,17	-0,14
11,90	-0,25	-0,21	-0,18
12,00	-0,37	-0,60	-0,27
12,52	-1,13	-0,89	-0,75
12,74	-	-1,40	-1,36

TABELA 23 - Determinação do pK_a da oxima II em presença de 175mM de NaBr em diferentes concentrações de DoTAB ($T=30^{\circ}C$).

$10^3[\text{DoTAB}], \text{ M}$	pK_a		
	270 nm	291 nm	300 nm
2,38	12,89	12,95	12,97
4,72	12,61	12,69	12,71
7,03	12,57	12,66	12,68
9,30	12,55	12,65	12,66
11,60	12,59	12,66	12,68
22,22	12,58	12,66	12,68
32,14	12,59	12,67	12,68
39,08	12,73	12,70	12,72
50,00	12,72	12,70	12,71
63,00	12,65	12,69	12,70
80,00	12,76	12,73	12,75
100,00	12,70	12,72	12,73
150,00	12,71	12,74	12,75
200,00	12,75	12,78	12,78

TABELA 24 - *Variação dos valores de absorvância da oxima II em função da concentração de DoTAB, em presença de 0,05M de NaOH e 175mM de NaBr. Os valores de A_{HOX} e A_{OX-} foram medidos em Tris/HBr, pH 8,0 e 1,0 M de NaOH, respectivamente.*

[DoTAB], M	270 nm	291 nm	300 nm	λ MÁX.	ABS MÁX.
2,38	0,7809	0,4050	0,2449	258	0,9048
4,72	0,8301	0,5351	0,3380	262	0,8718
7,03	0,8317	0,5470	0,3471	262	0,8654
9,30	0,8292	0,5484	0,3496	262	0,8617
11,60	0,8140	0,5369	0,3410	262	0,8462
22,22	0,7868	0,5184	0,3300	262	0,8192
32,14	0,7559	0,4962	0,3162	262	0,7895
39,08	0,7239	0,4747	0,3012	262	0,7550
50,00	0,6842	0,4470	0,2849	262	0,7596
63,00	0,6583	0,4292	0,2744	262	0,6903
80,00	0,6785	0,4350	0,2743	262	0,7153
100,00	0,6873	0,4393	0,2804	262	0,7286
150,00	0,6850	0,4283	0,2728	262	0,7338
200,00	0,6791	0,4134	0,2624	262	0,7381
	0,8969	0,3479	0,3726	260	0,9993

	10^3 [DoTAB], M	270	291	300	λ MÁX.	ABS MÁX.
A_{HOX}	39,08	0,5745	0,0582	0,0110	254	0,9553
A_{OX-}	39,08	0,8840	0,8921	0,6021	282	1,0227

TABELA 25 - *Variação dos valores de absorvância da oxima I em função da concentração de DoTAB, em presença de 0,05M de NaOH e 175mM de NaBr. Os valores de A_{HOX} e A_{OX-} foram medidos em Tris/HBr, pH 8,0 e 1,0 M de NaOH, respectivamente.*

[DoTAB], M	270 nm	291 nm	300 nm	λ MÁX	ABS MÁX.
2,38	1,0606	0,3651	0,1469	264	1,1262
4,72	1,0491	0,3779	0,1580	264	1,1083
7,03	1,0372	0,3951	0,1720	264	1,0881
9,30	1,0319	0,4129	0,1870	264	1,0760
11,63	1,0203	0,4256	0,1974	264	1,0583
22,22	0,9731	0,4653	0,2324	266	0,9922
32,14	0,9297	0,4832	0,2508	268	0,9388
39,08	0,9188	0,4847	0,2537	268	0,9268
50,00	0,8746	0,4952	0,2666	268	0,8777
63,00	0,8191	0,4852	0,2658	268	0,8192
80,00	0,8586	0,5265	0,2922	270	0,8586
100,00	0,8530	0,5419	0,3051	270	0,8530
150,00	0,8349	0,5543	0,3176	272	0,8351
200,00	0,8282	0,5647	0,3264	272	0,8300
	1,0654	0,3718	0,1536	264	1,1311

	10^3 [DoTAB], M	270	291	300	λ MÁX.	ABS MÁX.
A_{HOX}	39,08	0,2645	0,0204	0,0038	244	0,9258
A_{OX-}	39,08	1,0171	0,7195	0,4148	274	1,0395

TABELA 26 - *Variação dos valores de intensidade de fluorescência em diferentes planos vibracionais: horizontal-horizontal (H-H), horizontal-vertical (H-V), vertical-vertical (V-V) e vertical-horizontal (V-H) em presença de diferentes concentrações de DoTAB, 175mM de NaBr (T=30°C).*

10 [DoTAB], M	EXC - EM			
	H-H	HV	V-V	V-H
0,01	7,407	6,136	2,884	2,471
0,03	7,903	6,482	2,996	2,586
0,05	7,713	6,294	2,898	2,503
0,07	8,084	6,618	3,498	2,680
0,10	7,841	6,378	2,954	2,561
0,30	7,949	6,477	3,000	2,570
0,50	8,333	6,825	3,135	2,718
0,70	8,180	6,740	3,105	2,702
1,13	8,243	6,799	3,201	2,741
2,05	1,002	0,816	0,364	0,322
3,05	1,489	1,222	0,524	0,490
5,00	1,958	1,561	0,650	0,690
7,00	2,396	1,853	0,775	0,743
9,00	2,512	2,014	0,842	0,790

CONDIÇÕES : HY 800, EXC 470(300-600), EM 490(490-700)
 Fenda EMIS 7,5, Fenda EXC 20, Filter 1 e Ganho 10.
Estes valores foram obtidos de uma média aritmética de 19 medidas.

TABELA 27 - *Variação dos valores de polarização (P) e intensidade de fluorescência (I) do Hy-NDB, em função da concentração de DoTAB, em presença de 175mM de NaBr (T=30°C).*

-log [DoTAB], M	P	I
4,00	0,170	7,41
3,52	0,171	7,90
3,30	0,173	7,71
3,15	0,229	8,08
3,00	0,180	6,38
2,52	0,178	7,95
2,30	0,169	8,33
2,16	0,165	8,18
2,00	0,172	8,24
1,69	0,163	10,02
1,52	0,131	14,89
1,30	0,145	19,58
1,16	0,148	23,96
1,05	0,141	25,12

TABELA 28 - *Variação dos valores de intensidade de fluorescência (I) do Hy-NBD, em função da concentração do tetrahidrofurano (THF), em presença de 175mM de NaBr (T=30°C).*

I	V% THF
2,454	0,00
2,500	0,80
2,598	2,80
2,755	6,80
2,908	10,80
3,368	18,80
3,920	26,80
4,430	34,80
4,828	42,80
5,023	50,80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- LEHNINGER, Albert L. Componentes Moleculares das Células. São Paulo: Edgar Blücher Ltda., v.1-3, p.457-461 e 176-186.
- 02- WHITE, Abraham, HANDEK, Philip, SMITH, Emil L. Principles of Biochemistry. 3ed. New York : Mcgraw-Hill, 1954, p.54-771.
- 03- VIDAL, Benedicto C.M; SILVEIRA, Maria Luiza . Biologia Celular. Rio de Janeiro : Atheneu, 1987, p.42-300.
- 04- WEISSAMANN, Bernard , MEYER, Karl . The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. Journal American Chemical Society. v.76, p.1753-1757, 1954.
- 05- MORRIS, Edwin R; RULS, David A; WELSH, E. Jane. Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions. Journal Molecular Biology. v.138, p.383-400, 1980.
- 06- THALBERG, Kyrre, LINDMANN, Björn. Interactions between hyaluronan and cationic surfactants. Journal Physical Chemistry. v.93, p.1478-1483, 1989.
- 07- CONN, Eric, STUMPF, P.K. Introdução à Bioquímica. 3 ed. São Paulo : Edgard, 1975, p.37-42.

- 08- SCOTT, J. E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acid polisacharides from tissues. Methods of Biochemical Analysis. London : Int. Publi, 1960, p.148-195.
- 09- GHOSH, Snehasisk, KOBAL, Ivan, ZANETTE, Dino, REED, Wayne. Conformational contraction and hydrolysis in sodium hydroxide solutions. Macromolecules. v.26, n.17, p.4685-4693, 1993.
- 10- DEEBLE, D.J; PHILLIPS, G.O; BOTHE, E; SCHUCHMANN, H.P; SONNTAG, C. Von . The radiation - induced degradation of hyaluronic acid. Radiat. Phys. Chem. v.37, n.01, p.115-118, 1991.
- 11- SATO, Clifford S. Diagnosing cancer by observing marker glycosaminoglycans extracted from patient. USA [19] 4, 468, 465. 28, aug, 1984.
- 12- BUNTON, C. A. Reactions kinetics in aqueous surfactant solutions. Catal. Rev. Sci. Eng. v.20, n.1, p.1-56, 1979.
- 13- FENDLER, J.H; FENDLER, E.J. Metabolic micellar and macromolecular systems. New York : Academic Press, 1975.
- 14- RABOCKAI, Tibor. Físico-Química de Superfície. Washington : Organização dos Estados Americanos, 1979.
- 15- FENDLER, J.H; FENDLER, E.J. Catalysis in micellar and macrocelular systems. New York : Academic Press, 1975.
- 16- JUNGERMANN, Eric. Cationic Surfactants. USA : Marcel-Dekka, v.4, p.1-11.
- 17- TADROS, T. F. Surfactants . London : Academic Press, 1974.

- 18- MUKERJEL, Pasupati. Size distribution of micells: Monomer-micells equilibrium . Treatment of experimental molecular weight data, the sphere-to-rod transmittion and a general association model. In : Mittal, K.L. MICELLIZATION, SOLUBILIZATIONS AND MICROEMULSIONS. New York : Plenum Press, 1977. v.1.
- 19- ANACKER, E.W. Micelle formation of cationic surfactant in aqueous media. In : Jungermann, Eric. CATIONIC SURFACTANT. USA : Marcel Dekker, 1970, p.203-288.
- 20- FENDLER, F.H. Membrana mimetic chemistry. New York : John Wiley, 1982.
- 21- THOMAS, J. K. Radiation - induced reactions in organized assemblies. Chemical Review. v.80, n.4, p.283-299, 1980.
- 22- CORDES, E.H; GITLER, C. Reactions kinetics in the presence of micelle-forming surfactants. Bioorganic Chemistry. v.2, p.2-53, 1973.
- 23- HELENIUS, Ari, McCASLIN, R; FRIES, E; TANFORD, C. Properties of detergents. In : METHODS ENZYMOLOGY. London : Academic Press, v.63, 1974, p.734-749.
- 24- MITTAL, K. L. Micellization, solubilization and macroemulsion, New York: Plenum Press, 1977, v.2.
- 25- LINDMAN, B. Structural aspects of surfactant micellar systems. Physical chemistry 1, Chemical Center-1984. In : Tadros, T.F. SURFACTANTS. London : Academic Press, 1974.
- 26- ADAMSON, Arthur. Physical Chemistry of Surfaces. New York : John Wiley and Sons, Inc, 1990, p.18-40.

- 27- NEVES, M. de Fátima. Propriedades Físico-Químicas de Detergentes Catiônicos. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1987.
- 28- EVANS, H.C. Alkyl sulphates Part I. Critical micelle concentrations of the sodium salts. Journal Chemical Society. p.576-582, 1956.
- 29- SHINODA, Kozo. The formation of micells. Colloidal Surfactants. New York : Academic Press, 1963.
- 30- ZANETTE, Dino, LEITE, Marcelo, REED, Wayne, NOME, Faruk. Intrinsic basicity constant of 10-phenil-10-(hydroxyimino)decanoate in aqueous solutions of hexadecyl-tri-methylammonium bromide. Effect of salts and deterget concentration. Journal Physical Chemistry. v.91, p.2100-2102, 1987.
- 31- ROMSTED, Larry. Rate Enhancements in micellar systems. Tese (Doutorado em Química) Bloomington, Indiana, 1975.
- 32- BUNTON, Clinford, NOME, Faruk, QUINA, Frank, ROMSTED, Laurence. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces. Journal American Chemical Society. v.24, n.12, p.357-364, 1991.
- 33- ZANETTE, Dino. Preparação de anfílicos funcionais e estudo de suas propriedades em micelas iônicas. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1981.
- 34- MENGER, Frederic. Multi-method characterization of micelles. In : SURFACTANTS IN SOLUTION. New York : Plenum Press, 1982, v.3.

- 35- BANSAL, V.K; SHAH, D.O. Micellar solutions for improved oil recovery. In : MICELLIZATION, SOLUBILIZATION AND MICROEMULSIONS. Mittal, New York : Plenum Press, v.1, 1977.
- 36- COUPER, A. Thermodynamics of surfactant solutions. In : Tadros, T.F. SURFACTANTS. London : Academic Press, 1974.
- 37- ROMSTED, L. A general kinetic theory of rate enhancements for reaction between organic substrates and hydrophilic ions in micellar systems. In: Mittal, K.L. MICELLIZATION, SOLUBILIZATION AND MICROEMULSIONS. New York : Plenum Press, 1977.
- 38- STIGTER, D. On the adsorption of counterions at the surface of detergent micells. Journal of the Physical Chemistry. vol.68, n.12, p.3603-3611, 1964.
- 39- QUINA, F.H; CHAIMOVICH, H. Ion exchange in micellar solutions. Conceptual framework for ion exchange in micellar solutions. Journal of the Physical Chemistry. v.83, n.14, p.1844-1850, 1979.
- 40- CORREA, Valdir R. - Mecanismo de reação em meio micelar. Tese (Doutorado em química), Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1989.
- 41- FLORY, P.J; DILL, K.A. Molecular organization in micelles and vesicles. Proc. Natl. Sci. USA. v.78, p.676-680, 1981.
- 42- GODDARD, E.D. Polymer - surfactant interaction Part I. Uncharged water-soluble polymers and charged surfactants. Colloids and Surfaces. v.19, p.255-300, 1986.

- 43- NAGARAJAN, R. Thermodynamics of nonionic polymer - micelle association. Colloids and Surfaces, v.13, p.1-17, 1985.
- 44- SCHWUGER, M.J. Colloid Interface. v.43, p.491, 1973.
- 45- WITTE, Frank, ENGBERTS, J.B.F.N. Perturbation of SDS and CTAB micelles by complexation with poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide). Journal Organic Chemistry. v.52, p.4767-4772, 1987.
- 46- NAGARAJAN, R; KALPAKCI, B. Polym. Prepr. Journal American Chemical Society. Div. Polym. chem, v.13, p.41, 1982.
- 47- ANANTHAPADMANABHAN, K.P; LEUNG, P.S; GODDARD, E.D. Fluorescence and solubilization studies of polymer-surfactants systems. Colloids and Surfaces, v.13, p.63-72, 1985.
- 48- XIA, J; DUBIN, P.L; KIM, Y. Complex formation between poly(oxyethylene) and sodium dodecyl sulfate micelles: Light scattering, electrophoresis and dialysis equilibrium studies. Journal Physical Chemistry. v.96, p.6805-6811, 1992.
- 49- LEUNG, P.S; GODDARD, E.D; HAN, C; GLINKA, C.J. A study of polycation - anionic surfactant systems . Colloids and Surfaces. v.13, p.47-62, 1985.
- 50- BRACKMAN, J.C; ENGBERTS, J.B. The effect of surfactant headgroup charge on polymer - Micelle Interaction. Journal of Colloid and Interface Science. v.132, n.1, p.250-255, 1989.

- 51- MALOVIKOWA, A; HAYAKAWA, K; KWAK, J. T. C. Surfactant - polyelectrolyte interactions.4. Surfactant chain length dependence of the binding of alkylpyridium cations to dextran sulfate. Journal Physical Chemistry. v.88, p.930-933, 1984.
- 52- CABANE, B.J. Structure of some polymer-detergent aggregates in water. Journal Physical Chemistry. v.81, p.1639-1645, 1977.
- 53 - GAO, Z; WASYLISHEN, R.E; KWAK, J.C.T. Distribution equilibrium of poly(ethylene oxide) in sodium dodecylsulfate micellar solutions: An NMR paramagnetic relaxation study. Journal Physical Chemistry. v.95, n.1, p.462-467, 1991.
- 54- GODDARD, E. D. Polymer - surfactant interaction. Part II. Polymer and surfactant of opposite charge. Colloids and Surfaces. v.19, p.301-329, 1986.
- 55- ALBUIN, E.B; SCAIANO, J.C. Exploratory study of the effect of polyelectrolyte surfactant aggregates on photochemical behavior. Journal American Chemistry Society. v.106, p.6274-6283, 1984.
- 56- THALBERT, Kyrre; LINDMAN, B; KARESTRÖM, G. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: Tetradecyltrimethylammonium bromide - Hyaluronan - Water. Journal Physical Chemistry. v.94, p.4289-4285, 1990.
- 57- ZANA, R; LANG, J; LIANOS, P. Polymers Prepr. Journal American Chemistry Society. Div. Polym. Chem, v.23, p.39, 1982.
- 58- GODDARD, E.D; HANNAN, R.B. Cationic polymer anionic surfactant interactions. Journal of Colloid and Interface Science. v.55, n.1, p.73-79, 1976.

- 59- SANTOS, Sônia F; ZANETTE, Dino; NOME, F; REED, Wayne. Fluorescence evidence for formation of a hyaluronato ion dodecyltrimethylammonium bromide complex. Journal Colloids Science, in press.
- 60- MUKERJEE, P; MYSELS, K. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. Washington : National Bureau of Standards, 1971.
- 61- DANIEL, F. Acetylation in aqueous alkaline solutions. Journal American Chemistry Society. v.134, p.2495 , 1931.
- 62- BUNTON, C.A; IHARA, Y. Micellar effects upon dephosphorylation and deacylation by oximate ions. Journal Organic Chemistry. v.42, n.17, p.2865-2869, 1977.
- 63- CHAIMOVICH, H; ZANETTE, D. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide micells on the rate of oximolysis of esters. Journal of Physical Organic Chemistry. v.5, p.341-348, 1992.
- 64- FUNASAKI, N. Micellar effects on the kinetics and equilibrium of chemical reactions in salt solutions. Journal of Physical Organic Chemistry. v.83, p.1998-2003, 1979.
- 65- QUINA, F.A; POLITI, M.J; CUCCOVIA, J.M; BAUMGARTEN, E; FRANCHETTI, S.M.M; CHAIMOVICH, H. Ion exchange in micellar solutions .4. "Buffered" systems. Journal of Physical Chemistry . v.84, p.361-365, 1980.
- 66- CHAIMOVICH, H; ZANETTE, D; BONILHA, J.B.S; COCCOVIA, I.M. Analysis of the effect of micells and vesicles on the reactivity of nucleophiles derived from the dissociation of weak acids. In : Surfactants in Solutions. Mitta, K.L; Lidaman, L. New York : Plenum Press, 1984, v.2, p.1121-1138.

- 67- CORREL Glenn D; CHESER, Raymond N; NOME, F; FENDLER, J. H. Fluorescence probes in reversed micelles. Journal of the American Chemical Society. v.100, p.1254-1262, 1978.
- 68- TURRO, Nicholas J; GEIGER, M.W; HAUTALA, Richard R; SCHORE, Neil, E. Fluorescent probes for micellar systems. In : Mittal, K.L. New York : Plenum Press, p.75-86.
- 69- ROHATGI-MUKEERJEE, K. Fundamentals of Photochemistry. New York: Heested press, p.113-120.
- 70- WARE, Bennie, KLEIN, James W; ZERO, Karl. Interaction of a fluorescent spermine derivative a nucleic acid polyion. Journal of American Chemistry Society. v.4, p.458-463, 1988.
- 71- ABODERIN, A.A; BOLDEFELD, E; LUISE, P.L. Reaction of chicken egg white lysosyme with 7-chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole. Biochimica et Biophysica. Acta, v.328, p.20-30, 1973.
- 72- TOYO'OKA, T; WATANABE, Y; IMAI, K. Reaction of amines of biological importance with 4-fluoro-7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3 diazole. Analytica Chiminal Acta. v.149, p.305-312, 1983.
- 73- GHOSH, S; REED, C.E; LI, X; REED, W.F. Biopolymers. v.30, p.1101-1112, 1991.
- 74- CHARI, K. Journal Colloid Interface Science. v.151, 294, 1977.

*"Há mais no céu
e na terra do que
se possa imaginar ..."*

A stylized, handwritten signature in black ink, appearing to be the name 'Shakespeare' written in a cursive, calligraphic style.

- Shakespeare -