

Alice Maria Santos Oliveira

INTERACÇÕES DO *CLORODIAZEPÓXIDO* EM MEIOS MICELARES

Avaliação das propriedades ácido/base e de solubilidade



Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Outubro/1999

Alice Maria Santos Oliveira

INTERACÇÕES DO *CLORODIAZEPÓXIDO* EM MEIOS MICELARES

Avaliação das propriedades ácido/base e de solubilidade



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para a obtenção do grau de Mestre em Química*

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Outubro / 1999

INTERACÇÕES DO *CLORODIAZEPÓXIDO* EM MEIOS MICELARES

Avaliação das propriedades ácido/base e de solubilidade

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por me ter aceite como aluna de Mestrado.

À Doutora Paula Gameiro, a orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Baltazar de Castro, o ter-me aceite no seu grupo de investigação.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, em particular ao Alex, à Ana e à Cris, a amizade e camaradagem.

Aos meus Pais, as oportunidades que me proporcionaram ao longo da minha vida.

À minha família, em particular aos meus irmãos, o incentivo e o apoio sempre demonstrados.

Aos amigos.

RESUMO

O trabalho descrito nesta dissertação teve como objectivo o estudo das propriedades ácido-base e de solubilidade de uma substância com acção terapêutica, a benzodiazepina *clorodiazepóxido* (CLDZ), em diferentes meios micelares sintéticos.

As soluções aquosas micelares são muitas vezes usadas como sistemas modelo simplificados de membranas biológicas, por serem constituídas por moléculas com propriedades anfipáticas que mimetizam certos aspectos das biomembranas. Desta forma, avaliar o efeito dos sistemas micelares nas propriedades físico-químicas do CLDZ torna-se importante para esclarecer alguns parâmetros farmacocinéticos deste fármaco.

Os estudos foram efectuados por espectrofotometria de ultravioleta-visível em solução aquosa e em soluções micelares do surfactante aniónico dodecilsulfato de sódio (SDS), do surfactante neutro polietilenoglicol p-t-octil-fenol (Triton X-100) e do surfactante catiónico brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB).

Foram determinadas as constantes de acidez aparente do CLDZ, em soluções aquosas dos três surfactantes mencionados, a 25°C e a uma força iónica de 0,1M em NaCl. O tratamento matemático dos valores das constantes de acidez, foi realizado pela aplicação de dois modelos, designadamente o modelo de Berezin e o PIE, que contemplam ou não a existência de permuta iónica entre as espécies iónicas em solução e o contra-íão do surfactante, para verificar qual deles melhor expressa a interacção do CLDZ em meio micelar.

Efectuaram-se estudos de solubilidade do CLDZ nos diferentes meios mencionados a 25°C e com ajuste de pH, dada a solubilidade desta substância ser dependente do pH do meio. Estes estudos permitiram obter as constantes de ligação da benzodiazepina às micelas.

Finalmente efectuou-se ainda o estudo por espectrofotometria de ultravioleta-visível de outra benzodiazepina utilizada como hipnótico, o *diazepam* (DZP), em soluções do surfactante aniónico SDS. Neste estudo utilizou-se concentrações de surfactante acima e abaixo da cmc, tendo-se determinado as constantes de acidez aparente do DZP em SDS.

ABSTRACT

The aim of this work was the study of the acid-base properties and solubility of the benzodiazepine *chlorodiazepoxide* (CLDZ) in different micellar solutions.

Aqueous micelle solutions are often used as models for the more complex biological membranes because they are composed of amphiphilic molecules that imitate certain aspects of biomembranes. In this way evaluating the effect of micellar systems in physical and chemical properties of CLDZ is important to clarify some pharmacokinetic parameters of this drug.

The studies were performed by UV-VIS spectrophotometry in aqueous solution and in micellar solutions of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS), of the nonionic surfactant polyethyleneglycol p-t-octylphenol (Triton X-100) and of the cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB).

The acidity constants of CLDZ in micellar solutions of the three surfactants mentioned above were determined at 25°C and with ionic strength equal to 0,1M in NaCl. The results were mathematically processed, and two models were used to quantify the micellar effects in equilibrium constants- Berezin and the PIE models. Their difference lies mainly in an assumption used by the PIE model that the counterions of the ionic surfactants exchange with other ionic species in solution.

The study of the solubility was performed in the different systems mentioned, at 25°C, at the same ionic strength and with pH fixed. This study gave the binding constants of CLDZ to the micelles.

Finally, one determined the acidity constants of another benzodiazepine, used as hypnotic, *diazepam* (DZP), in SDS solutions. In this study there were used concentrations in SDS under and above the cmc.

ÍNDICE

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Índice	5
Índice de figuras	8
Índice de tabelas	11
Lista de abreviaturas e símbolos	13
Prefácio	15
Capítulo 1- Introdução Teórica	17
1.1 Benzodiazepinas	18
<i>Aspectos gerais</i>	18
<i>Clordiazepóxido e Diazepam</i>	18
<i>Estrutura e nomenclatura</i>	19
<i>Propriedades físico-químicas</i>	20
<i>Espectrofotometria de ultravioleta/visível</i>	21
1.2 Substâncias tensioactivas	23
<i>Aspectos gerais</i>	23
<i>Formação de micelas</i>	24
<i>Estrutura de micelas</i>	27
<i>Aplicações das micelas</i>	30
1.3 Distribuição de fármacos entre as fases aquosa e micelar	31
<i>Considerações gerais</i>	31
<i>Determinação das constantes de ligação</i>	32
<i>Localização das moléculas solubilizadas numa micela</i>	34
<i>Factores que influenciam a solubilização</i>	35
1.4 Equilíbrio ácido/base em soluções micelares	38
<i>Considerações gerais</i>	38
<i>Tratamento teórico da acidez em meio micelar</i>	38
<i>Efeito dos sistemas micelares nas constantes de ionização</i>	42

	6
1.5 Métodos espectrofotométricos para determinação de constantes de equilíbrio	44
<i>Considerações gerais</i>	44
<i>Aquisição de dados</i>	45
Capítulo 2- Metodologia	48
2.1 Reagentes	49
2.2 Soluções	50
2.3 Instrumentação utilizada	51
<i>Medições de pH</i>	51
<i>Medições espectrais</i>	51
2.4 Sistema automático de titulação	52
<i>Titulação ácido forte/base forte</i>	52
<i>Constituição do sistema</i>	52
<i>Programa de controlo e aquisição de dados</i>	53
2.5 Calibração do sistema	55
<i>Condições experimentais</i>	55
<i>Método de Gran</i>	57
<i>Detecção de carbonato</i>	58
2.6 Métodos de cálculo utilizados	62
<i>Programa SQUAD</i>	62
<i>Erros</i>	67
Capítulo 3- Resultados e Discussão	68
3.1 Espectros do CLDZ em soluções aquosas de surfactantes nas formas monomérica e micelar	69
<i>Execução experimental</i>	69
<i>Zona espectral abrangida</i>	70
<i>Resultados obtidos e sua discussão</i>	70
A) CLDZ em SDS	72
B) CLDZ em Triton X-100	73
C) CLDZ em CTAB	75
<i>Conclusões</i>	77

	7
3.2 Constantes de acidez e absorvidades molares do clordiazepóxido em sistemas micelares	78
<i>Execução experimental</i>	78
<i>Resultados obtidos e sua discussão</i>	79
A) <i>Surfactante aniônico (SDS)</i>	79
B) <i>Surfactante neutro (Triton X-100)</i>	82
C) <i>Surfactante catiónico (CTAB)</i>	86
<i>Conclusões</i>	91
3.3 Tratamento matemático das constantes de acidez do CLDZ em meio micelar	93
<i>Resultados obtidos e sua discussão</i>	93
A) <i>Surfactante aniônico (SDS)</i>	93
B) <i>Surfactante neutro (Triton X-100)</i>	96
C) <i>Surfactante catiónico (CTAB)</i>	97
<i>Conclusões</i>	100
3.4 Solubilidade do CLDZ em soluções aquosas e soluções micelares	102
<i>Execução experimental</i>	102
<i>Resultados obtidos e sua discussão</i>	103
A) <i>CLDZ em água</i>	104
B) <i>CLDZ em SDS</i>	104
C) <i>CLDZ em Triton X-100</i>	105
D) <i>CLDZ em CTAB</i>	107
<i>Conclusões</i>	109
Capítulo 4- Considerações finais	110
Capítulo 5- Bibliografia	114
Apêndices	121
Apêndice1-Propriedades farmacocinéticas do CLDZ e do DZP	122
Apêndice2- Requisitos da IUPAC para a publicação de constantes de equilíbrio	124
Apêndice3- Estudo espectrofotométrico das propriedades ácido-base do <i>diazepam</i>	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática de 5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona.	19
Figura 1.2	Representação das estruturas químicas das duas benzodiazepinas utilizadas neste trabalho.	20
Figura 1.3	Estruturas dos surfactantes sintéticos SDS, Triton X-100 e CTAB.	23
Figura 1.4	Esquema da variação da tensão superficial (γ), da condutividade molar (κ) e da dispersão de luz (τ) em função da concentração de surfactante. A linha a tracejado representa a cmc.	24
Figura 1.5	Alguns tipos de estruturas micelares: (a) esférica, (b) "disc-like", (c) cilíndrica, (d) lamelar, (e) vesícula esférica. Os grupos hidrofílicos estão representados pelos círculos pretos.	29
Figura 1.6	Representação esquemática de uma micela iónica de SDS.	29
Figura 1.7	Esquema das possíveis localizações das moléculas solubilizadas.	34
Figura 1.8	Mecanismo de Winsor para aumentar a solubilidade de solutos apolares devido à adição de compostos polares.	37
Figura 2.1	Esquema do sistema automático de titulação.	53
Figura 2.2	Lista de opções de entrada do programa de controlo e aquisição de dados.	54
Figura 2.3	Representação gráfica de A) $E=f(V)$, B) $dE/dV=f(V)$ e C) $d^2E/dV^2=f(V)$ de uma titulação de 20 ml de HCl $1,0 \times 10^{-3}M$ com NaOH isento de carbonato.	60
Figura 2.4	Representação gráfica de A) $E=f(V)$, B) $dE/dV=f(V)$ e C) $d^2E/dV^2=f(V)$ de uma titulação de 20 ml de HCl $1,0 \times 10^{-3}M$ com NaOH contendo carbonato.	61
Figura 2.5	Esquema geral do ficheiro de entrada do SQUAD.	64
Figura 2.6	Exemplo de um ficheiro de entrada utilizado neste trabalho.	65
Figura 2.7	Diagrama simplificado do SQUAD.	66

Figura 3.1.1	Espectros dos surfactantes sintéticos SDS, Triton X-100 e CTAB 0,01M.	71
Figura 3.1.2	Espectro do CLDZ em água (preto), em SDS acima da cmc (vermelho) e em SDS abaixo da cmc (verde), a pH = 3.	72
Figura 3.1.3	Espectro do CLDZ em água (preto), em SDS acima da cmc (vermelho) e em SDS abaixo da cmc (verde), a pH = 9.	72
Figura 3.1.4	Espectro do CLDZ em água (verde), em Triton X-100 abaixo da cmc (vermelho) e em Triton X-100 acima da cmc (preto), a pH = 3.	74
Figura 3.1.5	Espectro do CLDZ em água (verde), em Triton x-100 abaixo da cmc (vermelho) e em Triton X-100 (preto) acima da cmc, a pH = 9.	74
Figura 3.1.6	Espectro de CLDZ em solução aquosa e em soluções de CTAB abaixo e acima da cmc, a pH=3.	75
Figura 3.1.7	Espectro de CLDZ em solução aquosa e em soluções de CTAB abaixo e acima da cmc, a pH=9.	76
Figura 3.2.1	Espectro de várias soluções de CLDZ em SDS 3×10^{-3} M a diferente pH.	79
Figura 3.2.2	Representação gráfica da variação de pK_{app} em função da concentração de SDS.	81
Figura 3.2.3	Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em Triton X-100 4×10^{-3} M a diferente pH.	83
Figura 3.2.4	Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em Triton X-100 7×10^{-3} M a diferente pH.	83
Figura 3.2.5	Representação gráfica da relação linear obtida entre as absorvâncias do CLDZ em Triton X-100 7×10^{-3} M, para os comprimentos de onda 310 e 355 nm.	84
Figura 3.2.6	Curvas de titulação obtidas a 310 nm (A) e a 355 nm (B) para a solução CLDZ em Triton X-100 1×10^{-3} M.	84
Figura 3.2.7	Representação gráfica da variação de pK_{app} em função da concentração de Triton X-100.	86
Figura 3.2.8	Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em CTAB 0,01 M a diferente pH.	87

Figura 3.2.9	Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em CTAB 0,04 M a diferente pH.	87
Figura 3.2.10	Representação gráfica da variação de pK_{app} em função da concentração de CTAB.	89
Figura 3.2.11	Representação gráfica da relação linear obtida entre as absorvâncias do CLDZ em CTAB 0,04 M, para os comprimentos de onda 245 e 310 nm.	89
Figura 3.2.12	Representação gráfica de $A_{\lambda}=f(-\log c_H^+)$ do <i>clorodiazepóxido</i> em CTAB 4×10^{-3} M, para vários comprimentos de onda, mostrando uma inflexão perto do valor obtido para o pK_{app} .	90
Figura 3.3.1	Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em SDS e o melhor ajuste obtido com o modelo de Berezin.	95
Figura 3.3.2	Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em SDS e o melhor ajuste obtido com o modelo de PIE.	95
Figura 3.3.3	Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em Triton X-100 e o melhor ajuste obtido pelo modelo de Berezin.	97
Figura 3.3.4	Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em CTAB e o melhor ajuste obtido pelo modelo de Berezin.	98
Figura 3.3.5	Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em CTAB e o melhor ajuste obtido pelo modelo de PIE.	100
Figura 3.4.1	Representação gráfica da variação da solubilidade do CLDZ em função da concentração de SDS a pH=9.	105
Figura 3.4.2	Representação gráfica da variação da solubilidade do CLDZ em função da concentração de Triton X-100 a pH=3 (quadrados) e a pH=9 (círculos).	106
Figura 3.4.3	Representação gráfica da variação da solubilidade do CLDZ em função da concentração de CTAB a pH=3 (quadrados) e a pH=9 (círculos).	108
Figura C.1	DZP em água (preto), em SDS abaixo da cmc (vermelho) e em SDS acima da cmc (verde), a pH=3.	127
Figura C.2	DZP em água (preto), em SDS abaixo da cmc (vermelho) e em SDS acima da cmc (verde), a pH=9.	127
Figura C.3	Representação gráfica da variação do pK_{app} de DZP com a concentração de SDS.	129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Benzodiazepinas: Nomes genérico, comercial e químico.	20
Tabela 1.2	Valores de pK_a em água para o CLDZ e DZP.	21
Tabela 1.3	Absortividades molares do CLDZ e DZP em água.	21
Tabela 1.4	Concentrações micelares críticas de SDS em soluções aquosas de NaCl, a 25°C.	26
Tabela 3.1.1	Valores das concentrações micelares críticas para os surfactantes sintéticos utilizados neste trabalho.	70
Tabela 3.1.2	Comprimentos de onda máximo (λ_{max}) e absortividades molares (ϵ) da espécie protonada do <i>clorodiazepóxido</i> (HCLDZ ⁺) em CTAB.	76
Tabela 3.1.3	Comprimento de onda máximo (λ_{max}) e absortividade molar (ϵ) da espécie neutra do <i>clorodiazepóxido</i> (CLDZ) em CTAB.	77
Tabela 3.2.1	Constantes de acidez aparente do CLDZ em SDS; (I= 0,1M; t= 25°C).	80
Tabela 3.2.2	Valores dos comprimento de onda máximo e das absortividades molares do CLDZ em SDS.	82
Tabela 3.2.3	Constantes de acidez aparente do CLDZ em Triton X-100; (I= 0,1M; t= 25°C).	85
Tabela 3.2.4	Constantes de acidez aparente do CLDZ em CTAB; (I= 0,1M; t = 25°C).	88
Tabela 3.2.5	Comprimentos de onda máximo (λ_{max}) e absortividades molares (ϵ) da espécie protonada do <i>clorodiazepóxido</i> (HCLDZ ⁺) em CTAB, determinados com o programa SQUAD.	91
Tabela 3.2.6	Comprimento de onda máximo (λ_{max}) e absortividade molar (ϵ) da espécie neutra do <i>clorodiazepóxido</i> (CLDZ) em CTAB, determinados com o programa SQUAD.	91

		12
Tabela 3.3.1	Constantes de ligação da forma protonada e neutra do CLDZ às micelas de SDS, Triton X-100 e CTAB, obtidos a partir das constantes de acidez aparente.	99
Tabela 3.4.1	Solubilidade do CLDZ em meio aquoso a pH = 3 e a pH = 9, a 25°C.	104
Tabela 3.4.2	Efeito do sistema micelar SDS na solubilidade do CLDZ a 25°C.	104
Tabela 3.4.3	Efeito do sistema micelar Triton X-100 na solubilidade do CLDZ a 25°C.	106
Tabela 3.4.4	Efeito do sistema micelar CTAB na solubilidade do CLDZ a 25°C.	107
Tabela 3.4.5	Constantes de ligação da forma protonada (K_{HB}^+) e desprotonada (K_B) do <i>clorodiazepóxido</i> às micelas determinadas a partir de estudos de solubilidade.	109
Tabela A. 1	Principais benzodiazepinas.	122
Tabela A. 2	Propriedades farmacocinéticas.	123
Tabela A. 3	Formas de administração e dosagens.	123
Tabela C.1	Valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{max}) de DZP em água e em SDS, a pH=3.	128
Tabela C.2	Constantes de acidez aparente do DZP em SDS; (I = 0,1 M; t = 25°C).	129
Tabela C.3	Valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{max}) e das absorvidades molares de DZP em SDS.	130
Tabela C.4	Valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{max}) e das absorvidades molares de DZP em meios mistos.	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	grau de ionização da micela
ϵ_B	absortividade molar da espécie neutra da benzodiazepina
ϵ_{BH^+}	absortividade molar da espécie protonada da benzodiazepina
ϵ_I	absortividade molar da espécie ionizada
ϵ_M	absortividade molar da espécie molecular
λ_{max}	comprimento de onda máximo
A_I	absorvância da espécie ionizada
A_M	absorvância da espécie molecular
B	forma neutra da benzodiazepina
C_D	concentração do surfactante acima da concentração micelar crítica
CLDZ	<i>clorodiazepóxido</i>
cmc	concentração micelar crítica
CTAB	brometo de hexadeciltrimetilamónio
DZP	<i>diazepam</i>
F_I	fracção da forma ionizada
F_M	fracção da forma molecular
HB^+	forma protonada da benzodiazepina
K_B	constante de ligação às micelas da forma neutra
K_{HB^+}	constante de ligação às micelas da forma protonada
$K_{x/y}$	coeficiente de selectividade
P	coeficiente de partiha
pK_a	constante de acidez
pK_{app}	constante de acidez aparente
RMN	ressonância magnética nuclear
RSE	ressonância de spin electrónico

SDS	dodecilsulfato de sódio
S_M	solubilidade na presença do surfactante
S_w	solubilidade em água
Triton X-100	polietilenoglicol p-t-octil-fenol
V	volume molar
$ x _b$	concentração da espécie X ligada às micelas
$ x _f$	concentração da espécie X livre na solução

PREFÁCIO

As 1,4- benzodiazepinas, grupo de substâncias farmacologicamente activas do qual fazem parte o *clorodiazepóxido* (CLDZ) e o *diazepam* (DZP), são as drogas psicoterapêuticas actualmente mais prescritas devido à sua elevada eficiência no tratamento da ansiedade. Não obstante, pouco se sabe sobre o comportamento destas drogas quando em contacto com as membranas biológicas.

Os sistemas micelares por serem constituídos por moléculas com propriedades anfipáticas, isto é, por conterem grupos hidrofílicos e grupos hidrofóbicos à semelhança dos sistemas biológicos, têm sido amplamente utilizados como modelos simplificados, uma vez que mimetizam certos aspectos das biomembranas.

Desta forma, avaliar os efeitos dos sistemas micelares nas propriedades físicas e químicas de substâncias com acção terapêutica, torna-se importante para compreender e esclarecer a influência de meios organizados em certos parâmetros farmacocinéticos destas substâncias.

Este trabalho consistiu, na sua grande parte, no estudo da influência de diferentes meios micelares nas propriedades físico-químicas do CLDZ, de modo a tentar correlacioná-las de uma maneira quantitativa com o tipo de interacções entre esta droga e as micelas.

O trabalho experimental efectuado para esta dissertação surge como seguimento do trabalho realizado durante o seminário de licenciatura, no qual foi efectuado o estudo espectral do CLDZ em SDS. Assim, iniciou-se a parte experimental deste trabalho por finalizar estudo das propriedades ácido-base do CLDZ em SDS e obter os valores de solubilidade da benzodiazepina neste meio, prosseguindo-se com estudos idênticos para outros dois surfactantes (Triton X-100 e CTAB). De realçar ainda que os 3 surfactantes usados pertencem a classes diferentes, de modo a permitir a verificação do efeito da carga das micelas.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos e três apêndices: No primeiro capítulo são definidos os conceitos básicos necessários para a compreensão e execução do trabalho experimental; o capítulo dois destina-se à descrição das condições experimentais em que o trabalho foi realizado, com especial ênfase no sistema de titulação utilizado e algumas observações experimentais relevantes para a determinação de constantes de ionização; no capítulo três apresentam-se os resultados obtidos no estudo espectrofotométrico das propriedades ácido-base e solubilidade do CLDZ em solução aquosa e em soluções micelares dos surfactantes SDS, Triton X-100 e CTAB; no capítulo quatro são apresentadas as considerações finais acerca dos resultados experimentais obtidos ao longo de todo o trabalho e conclusões alcançadas; no capítulo cinco apresentam-se as referências bibliográficas referidas ao longo da dissertação e termina-se com três apêndices: o primeiro apresenta as propriedades farmacocinéticas das duas benzodiazepinas utilizadas no trabalho, o segundo apresenta as recomendações da IUPAC para a publicação de constantes de equilíbrio e o terceiro apresenta os resultados obtidos no estudo do comportamento de outra benzodiazepina, o *diazepam* (DZP) em soluções de SDS.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo são definidos os conceitos necessários para a compreensão, interpretação e execução do trabalho experimental.

Inicia-se pela descrição geral das propriedades físico-químicas das substâncias em estudo: *clordiazepóxido*, *diazepam* e surfactantes (secções 1.1 e 1.2), prosseguindo-se com a descrição e análise dos estudos efectuados de solubilidade e de ácido-base em meios micelares (secções 1.3 e 1.4).

Uma vez que o trabalho experimental incidiu especialmente na determinação espectrofotométrica de constantes de acidez, a última secção (1.5) é destinada à descrição sumária do método utilizado.

1.1 BENZODIAZEPINAS

Aspectos gerais

As benzodiazepinas são um grupo de substâncias farmacologicamente activas, utilizadas como tranquilizantes. Actuam em diferentes áreas do cérebro e do sistema nervoso central, incluindo o sistema límbico que controla as emoções e o córtex cerebral que é responsável pela análise de informação.¹

Actualmente as 1,4-benzodiazepinas são as drogas psicoterapêuticas mais prescritas devido à sua elevada eficiência no tratamento da ansiedade, podendo ter outras indicações terapêuticas, funcionando como sedativos ou hipnóticos. Todas as benzodiazepinas têm propriedades farmacológicas similares diferindo no entanto na selectividade, o que pode conduzir a uma utilização clínica diferente.²

Clordiazepóxido e Diazepam

O potencial das 1,4-benzodiazepinas como substâncias farmacologicamente activas foi pela primeira vez explorado por Randal³ nos seus estudos com o *clordiazepóxido*, que foi a primeira benzodiazepina bem sucedida desenvolvida nos Laboratórios Roche nos fins dos anos 50. Mais tarde, nos anos setenta apareceu uma nova benzodiazepina, o *diazepam* que dada as suas propriedades ansiolíticas, relaxantes musculares e anticonvulsivantes, rapidamente destronou o *clordiazepóxido*, sendo o fármaco mais vendido no mundo (só nos Estados Unidos os médicos prescrevem 44 milhões de receitas deste ansiolítico).

Relativamente aos efeitos adversos mais comuns da utilização destas drogas, verifica-se que o *diazepam* e o *clordiazepóxido* podem provocar sonolência, dificuldades de coordenação, fadiga, tonturas e ataxia. De salientar ainda que apesar de inicialmente se ter pensado que estas substâncias não fossem viciantes, está hoje demonstrado que as benzodiazepinas provocam dependência. A dependência é detectada pelo aparecimento dos seguintes sintomas aquando da sua não utilização: insónia, ansiedade, perda de apetite, tremores, suores e distúrbios de percepção.² Alguns destes sintomas são precisamente os responsáveis pela prescrição das benzodiazepinas, o que resulta num ciclo vicioso de dependência. De facto são drogas cuja habituação ocorre tão facilmente que a dependência delas pode ocorrer ao fim de apenas algumas semanas apesar de tomadas em doses normais, daí a sua prescrição ser restringida a quatro semanas no máximo.¹

As propriedades farmacocinéticas, as formas de administração e as dosagens utilizadas do *clordiazepóxido* e do *diazepam* encontram-se resumidas no apêndice A.

Estrutura e nomenclatura

As 1,4-benzodiazepinas têm a estrutura geral representada no esquema da figura 1.1 (5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona).

As drogas com esta estrutura geral, fazem parte dos chamados agentes ansiolíticos e devem a sua actividade biológica à presença do anel de sete lados e à presença de substituintes nas posições 1, 2, 3 e 7. A existência de substituintes electronegativos tal como o cloro nas posições 2 e 7 e a existência de um grupo metilo ligado ao átomo de azoto na posição 1, aumentam fortemente esta actividade⁴.

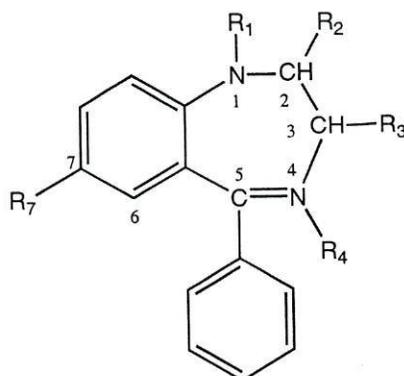


Figura 1.1- Representação esquemática de 5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona.

Existem três tipos diferentes de 1,4-benzodiazepinas, sendo esta classificação baseada na natureza do átomo de carbono da posição 2. No primeiro tipo (*diazepam*) o carbono 2 é um grupo carbonilo, o segundo tipo (*clordiazepóxido*) tem um grupo metilamino ligado ao carbono da posição 2 e o terceiro tipo possui um grupo metileno nesse mesmo carbono.⁵

Existem excepções que apresentam algumas variações relativamente à estrutura geral e uma delas é o *clordiazepóxido* que tem a estrutura mais diversa, por conter um substituinte no átomo de azoto da posição 4, como é demonstrado na figura 1.2.⁶

Na tabela 1.1 encontram-se representadas as duas benzodiazepinas utilizadas e os seus respectivos nomes genérico, comercial e químico.

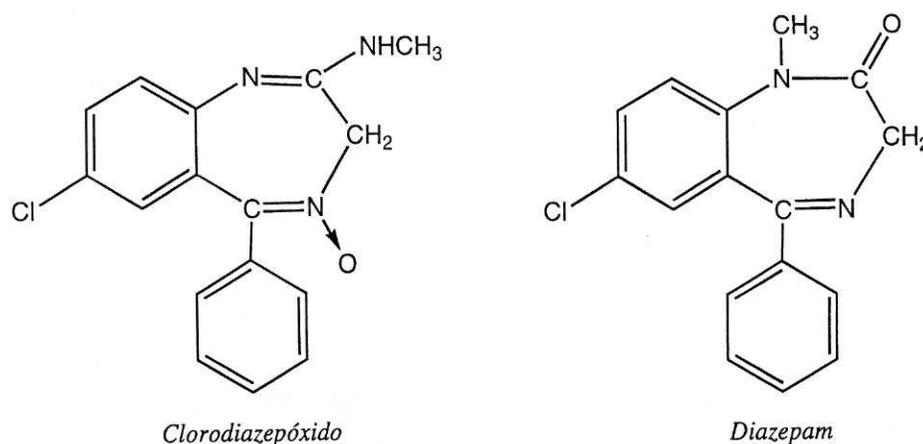


Figura 1.2- Representação das estruturas químicas das duas benzodiazepinas utilizadas neste trabalho.

Tabela 1.1- Benzodiazepinas: Nomes genérico, comercial e químico

Nome genérico	Nomes comerciais	Nome químico
<i>Clorodiazepóxido</i>	Librium, Disarim, Paxium, outros...	7-cloro-2-metilamino-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina-4-óxido
<i>Diazepam</i>	Valium, Bialzepam, Metamidol, outros...	7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona

Propriedades físico-químicas

As soluções de 1,4-benzodiazepinas (com a exceção do medazepam) em meios não aquosos permanecem estáveis por várias semanas. Em solução aquosa têm tendência para hidrolisar, especialmente em meios fortemente ácidos ou alcalinos, dando origem às correspondentes benzofenonas.⁶

Na generalidade as benzodiazepinas são bases monopróticas muito pouco solúveis em água mas solúveis em metanol, etanol e clorofórmio.

A eficácia de qualquer substância com acção terapêutica, depende não só da sua via de administração mas também do seu grau de ionização e este depende como é óbvio da(s) constante(s) de acidez dessa substância. Estudos efectuados por espectrofotometria de ultravioleta/visível,⁷ indicam a existência de apenas uma constante de acidez para estas duas benzodiazepinas, em que a protonação do diazepam ocorre no azoto imínico N-4 do anel

benzodiazepínico e a protonação do clordiazepóxido no átomo de oxigénio ligado também ao azoto imínico N-4, ou seja ao grupo N-óxido.

Tabela 1.2- Valores de pK_a em água para o CLDZ e DZP⁸

Benzodiazepina	pK _a
<i>Clordiazepóxido</i>	4,79
<i>Diazepam</i>	3,58

Espectrofotometria de ultravioleta/visível

De acordo com a literatura⁶, estas substâncias têm absorvidades molares da ordem de grandeza de $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, o que implica que as soluções utilizadas tenham concentrações da ordem dos 5×10^{-5} a 1×10^{-4} M, de maneira a que o espectro se mantenha inalterável.

Na tabela 1.3 apresentam-se os valores dos comprimentos de onda de absorvância máxima (λ_{max}) e das absorvidades molares, ϵ_{BH^+} a absorvidade molar da espécie protonada e ϵ_{B} a absorvidade molar da espécie neutra, retirados da literatura.⁹

Tabela 1.3- Absorvidades molares do CLDZ e DZP em água

Benzodiazepina	BH ⁺		B	
	λ_{max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
CLDZ	245	3,1	262	3,2
	310	0,9	355	0,3
DZP	241	2,3	229	3,4
	285	1,1	250s	1,6
	360	0,3	315	0,2

s = shoulder

Como já foi referido, tanto o *clordiazepóxido* como o *diazepam* têm tendência a sofrer hidrólise. O mecanismo de hidrólise destas benzodiazepinas não é, ainda, totalmente conhecido mas há vários estudos efectuados por espectrofotometria de ultravioleta/visível⁶ que referem que as benzofenonas associadas à hidrólise do *clordiazepóxido* e do *diazepam*

absorvem em soluções ácidas com absorvidades molares 20% superiores às dos compostos que lhe dão origem. Assim, a possibilidade de ocorrência de hidrólise pode ser facilmente verificada pelo controlo da absorvância das soluções.

Lafargue *et al.*¹⁰ verificaram que em soluções 0,2M de HCl a benzofenona associada ao *diazepam* (2-metilamino-5-clorobenzofenona) absorve a 237 nm e que a benzofenona associada ao *clorodiazepóxido* (2-amino-5-clorobenzofenona) absorve a 236 e 213 nm. Clifford *et al.*,⁶ referem que estudos efectuados em soluções 4M de HCl, apontam valores de comprimento de onda de absorvância máxima de 214 e 255 nm para o produto de hidrólise do *clorodiazepóxido* e de 214 e 248 nm para o *diazepam*.

Relativamente a meios micelares, não se encontram na literatura muitas referências relativamente a soluções de benzodiazepinas. Uma dessas referências descreve um estudo efectuado por espectrofotometria de ultravioleta-vísivel da interacção de uma das benzodiazepinas (DZP) com surfactantes, que revelou uma maior solubilidade desta em meio micelar do que em água.¹¹ As soluções de *diazepam* na presença de surfactante exibiam uma maior absorvância devido ao facto de haver mais produto dissolvido, e quando se estudava a interacção do surfactante em soluções onde o DZP se encontrava numa concentração suficientemente pequena, de modo a já se encontrar totalmente dissolvido antes da adição de surfactante, não se registava nenhum aumento de absorvância em relação ao meio aquoso.

1.2 SUBSTÂNCIAS TENSIOACTIVAS

Aspectos gerais

As substâncias tensioactivas também denominadas por surfactantes são constituídas por moléculas com propriedades anfipáticas bem definidas, isto é, contêm grupos hidrofóbicos e grupos hidrofílicos. A combinação destas propriedades opostas numa única molécula confere a estas substâncias características únicas quando contactam com a água, tais como a formação de agregados acima de uma certa concentração e a capacidade de solubilizar substâncias pouco solúveis em água – propriedades que estão interligadas.

Normalmente têm a estrutura RX , onde R é uma cadeia de hidrocarboneto contendo 8 a 18 átomos de carbono (grupos alquilos, acilos ou aromáticos) e X é um grupo polar e/ou ionizante com carácter hidrofílico. Dependendo da natureza de X as substâncias tensioactivas podem ser divididas em quatro classes: aniónicas (grupo hidrofílico carregado negativamente), catiónicas (grupo hidrofílico carregado positivamente), não iónicas (grupo hidrofílico não possui carga, mas é polar) e iónicas dipolares (grupo com carga positiva e carga negativa). Os surfactantes iónicos dipolares apesar de terem carga permanente, têm a particularidade de se comportarem como catiónios ou aniónicos dependendo do pH da solução. No caso dos surfactantes catiónicos o grupo hidrofílico é geralmente um grupo fosfónio, piridinico ou amónio quaternário; se for aniónico é constituído por sulfato, sulfonato, fosfato ou carboxilato e se se tratar de um surfactante não iónico, X representa um resíduo polioxietileno¹².

Na figura 1.3 encontram-se representados o nome e a fórmula de estrutura dos três surfactantes sintéticos utilizados neste trabalho.

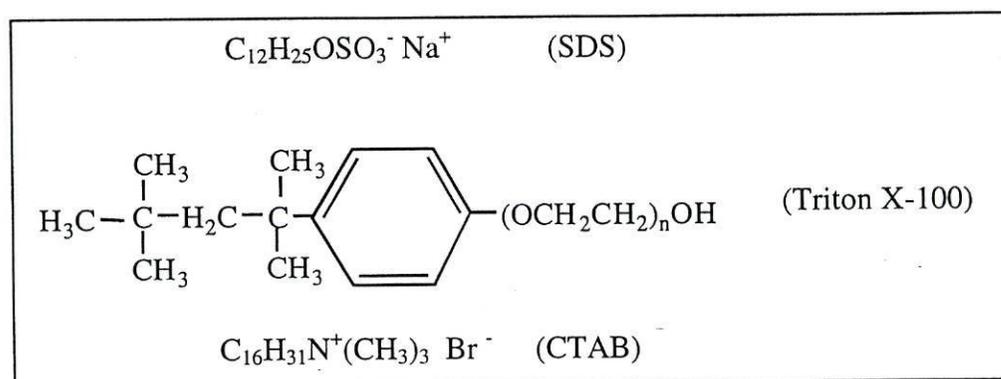


Figura 1.3- Estruturas dos surfactantes sintéticos SDS, Triton X-100 e CTAB

Formação de micelas

As substâncias tensioactivas tendem a agrupar-se em contacto com a água para minimizar a energia do sistema, dando origem a micelas – agregados coloidais formados espontaneamente em água por compostos anfipáticos.

O termo “micela” é portanto utilizado para denominar a entidade de dimensão coloidal, que está em equilíbrio dinâmico com os monómeros que lhe deu origem¹³.

A formação de micelas ocorre devido à natureza dualista das moléculas de surfactante, em que a parte hidrofóbica tende a afastar-se da água e a parte hidrofílica a interagir fortemente com ela. A água tem uma estrutura aberta que quando contacta com uma molécula anfipática sofre uma distorção para permitir acomodar as moléculas do soluto, provocando um aumento da energia livre do sistema. Como resultado desse aumento de energia, surge uma tendência do soluto ser adsorvido na interface da solução ou então a formação de agregados moleculares em que as regiões hidrofóbicas estão direccionadas para o interior da micela¹³. Por outras palavras, a formação de micelas é um mecanismo alternativo à adsorção para reduzir a energia livre devido à minimização da distorção da estrutura da água.

A formação de micelas só acontece acima de uma certa concentração, a que se chama concentração micelar crítica (cmc) e é acompanhada pela variação pronunciada de várias propriedades físicas da solução, entre as quais a tensão superficial, a condutividade molar e a dispersão da luz, que são as mais utilizadas experimentalmente para a determinação da cmc (figura 1.4)¹⁴.

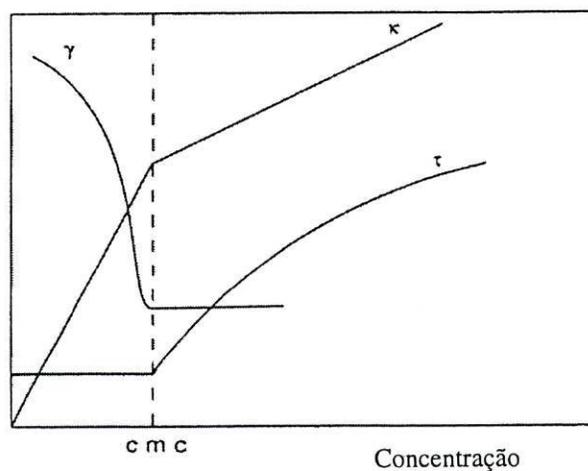


Figura 1.4- Esquema da variação da tensão superficial (γ), da condutividade molar (κ) e da dispersão de luz (τ) em função da concentração de surfactante. A linha a tracejado representa a cmc.

A variação pronunciada da propriedade física medida é indicativo da alteração significativa da natureza da espécie responsável pela propriedade. No caso da medição da condutividade molar, a alteração poderá estar associada ao aumento da massa por unidade de carga da espécie condutora. A variação da dispersão da luz indica o aparecimento de espécies significativamente maiores do que os monómeros do soluto. Estas evidências experimentais sustentam a formação de agregados ou micelas em concentrações de surfactante bem definidas¹⁵.

O valor da cmc é tanto mais acentuado quanto maior for o número de monómeros por micela¹⁴ (nº de agregação) e pode sofrer algumas variações dependendo da técnica física utilizada para a determinar. Essas pequenas variações são devidas ao facto das diferentes técnicas responderem diferentemente às espécies em solução na forma monomérica e micelar¹².

À medida que a concentração de surfactante aumenta acima da cmc, a adição de novos monómeros resulta na formação de novas micelas, daí que a concentração de monómeros permaneça aproximadamente constante e igual à cmc¹³.

Outro parâmetro é o ponto de Kraft- a temperatura acima da qual a formação de micelas é possível – que pode ser determinado pela variação da solubilidade, uma vez que o surfactante na forma não associada, a que vulgarmente se designa por monómeros, tem uma solubilidade limitada enquanto que as micelas possuem uma grande solubilidade.

O valor da temperatura de Kraft depende da natureza do grupo hidrofóbico e do carácter das interações iónicas entre o surfactante e os contra-íões. Uma vez que o mecanismo de solubilização dos surfactantes neutros é diferente, estes não exibem o ponto de Kraft, no entanto têm uma relação temperatura/solubilidade em meio aquoso característica, tornando-se mais solúveis com o aumento de temperatura¹⁵.

Se considerarmos a concentração micelar crítica igual à solubilidade limite dos monómeros de surfactante, então é o processo de formação de micelas que impede a precipitação do surfactante¹⁶. A concentração micelar crítica é o parâmetro mais importante de uma substância tensioactiva, uma vez que determina a concentração máxima de monómeros que se pode obter (em algumas interações o que é relevante é a actividade do surfactante como monómero e não em forma de micela)¹⁴.

A formação de micelas resulta do balanço de três forças: a força de repulsão hidrofóbica entre as cadeias de hidrocarbonetos e a água, a força de repulsão entre as cargas dos grupos hidrofílicos e a força de Van der Waals entre os grupos alquilo,¹⁷ e pode-se considerar que a principal causa da associação das moléculas de surfactante é a interacção

hidrofóbica das cadeias de hidrocarbonetos. Sendo assim, o valor da cmc é determinado pelo balanço do carácter hidrofóbico/hidrofílico da molécula uma vez que a tendência de formação da micela aumenta com o aumento do carácter hidrofóbico e diminui com o aumento do carácter hidrofílico, isto é moléculas que sejam constituídas maioritariamente por um grupo hidrofóbico têm uma concentração micelar crítica menor¹⁴. A importância dada à interacção hidrofóbica é consistente com a observação de que a adição de etanol num meio aquoso impede gradualmente a formação de micelas¹⁶.

Relativamente ao valor da concentração micelar crítica as seguintes generalizações podem ser aplicadas¹⁴:

- Quanto menor for a cadeia de hidrocarboneto, menor é a diminuição da energia livre do sistema resultante da agregação e, assim, maior é a concentração para a qual a superfície das moléculas de surfactante tem o mesmo potencial químico em solução e na micela e conseqüentemente maior é a cmc.

Matematicamente a relação entre o tamanho da cadeia de hidrocarboneto e a cmc foi expresso por Klevens¹⁸ como sendo

$$\log \text{cmc} = A - Bn$$

Em que A e B são constantes específicas para uma série homóloga e n é o número de átomos de carbono da cadeia.

- Todos os factores que diminuem a repulsão electrostática entre os grupos hidrofílicos favorecem a formação de micelas.

Um exemplo é a adição de electrólitos inertes (aumentando assim a força iónica) porque a repulsão entre os grupos hidrofílicos da micela é atenuada pela presença de outros iões (tabela 1.4).

Tabela 1.4- Concentrações micelares críticas de SDS em soluções aquosas de NaCl, a 25°C

C(NaCl) /M	0	0,1	0,2	0,4
Cmc (mM)	8,1	1,4	0,83	0,52

- Um aumento de temperatura diminui a hidratação dos grupos hidrofílicos, favorecendo a formação micelar dos compostos não iónicos.

- A presença de álcoois, com baixa solubilidade em água, diminui a densidade de carga da superfície de uma micela iônica, diminuindo assim a correspondente concentração micelar crítica.
- A presença de metanol e de outros compostos similares, como o dioxano por exemplo, com uma significativa miscibilidade com a água, como não “penetram” na micela na mesma extensão têm um efeito fraco no valor da cmc, aumentando-a para grandes concentrações devido à diminuição da energia da interação hidrofóbica entre as cadeias de hidrocarbonetos e as moléculas de surfactante.

A formação de micelas assemelha-se à criação de uma nova fase, no entanto, as micelas resultantes não se unem numa fase contínua, distribuindo-se apenas uniformemente em meio aquoso, dando origem a uma «pseudo-fase» com propriedades características da separação de fases tais como: aumento da solubilidade de certas substâncias em soluções de surfactante acima da cmc, que é similar à dissolução dessas substâncias numa fase separada; no ponto de Kraft, a primeira derivada da solubilidade do surfactante em função da temperatura exibe uma descontinuidade que também é característica da transição de fases¹².

Estrutura das micelas

As micelas são estruturas dinâmicas com tempos de formação e destruição da ordem dos milisegundos¹².

O número de monómeros de surfactante por micela (número de agregação), para surfactantes não iônicos atinge o valor de 1000 ou superior, enquanto que se for iônico esse número variará entre 10 a 100, devendo-se esta diminuição às repulsões electrostáticas entre os grupos hidrofílicos¹⁹.

O formato de uma micela foi sempre uma questão controversa: Hartley propôs uma micela esférica com dimensões coloidais em que os grupos hidrofílicos estão situados na superfície e as cadeias hidrofóbicas no interior. McBain sugeriu a existência de micelas lamelares que consistem em duplas camadas de moléculas de surfactante colocadas lado a lado²⁰.

Exceptuando os casos de concentrações elevadas de surfactante, a maioria das evidências experimentais favorece o modelo de Hartley. Algumas dessas evidências encontram-se sumariadas de seguida²⁰:

- O valor da concentração micelar crítica depende mais do comprimento da cadeia de hidrocarboneto do que dos grupos iônicos. Numa micela lamelar seria de esperar uma maior sensibilidade para os grupos hidrofílicos que se encontram próximos apesar de terem a mesma carga.
- As micelas lamelares expõem mais as cadeias hidrofóbicas à água.
- As micelas têm números de agregação constantes. Micelas lamelares provavelmente não teriam um tamanho definido, pois estariam sempre dispostas a aceitar mais moléculas.

O modelo de McBain foi apoiado por resultados de raios X²¹. Quando um feixe monocromático de raios X atravessa uma fina camada de solução de surfactante observa-se uma figura de difracção cuja interpretação segundo a equação de Bragg é consistente com o esperado de uma micela lamelar. Os resultados de raios X obtidos quando se adiciona benzeno a um surfactante também são coerentes com a solubilidade numa micela lamelar.

No entanto, este modelo não é satisfatório para explicar o tamanho limitado das micelas. Termodinamicamente seria de esperar que as micelas lamelares tivessem tendência a aumentar para minimizarem a energia do sistema. Além disso verifica-se que alguns resultados de raios X são ambíguos, uma vez que podem ser atribuídos a um certo ordenamento das micelas esféricas imposto por forças electrostáticas repulsivas.

Actualmente é aceite que o formato de uma micela varia com a concentração do surfactante. Embora geralmente sejam esféricas, algumas micelas para concentrações bem acima da concentração micelar crítica e segundo condições apropriadas, podem adoptar outros formatos, como é demonstrado na figura 1.5²².

As micelas lamelares por apresentarem semelhanças com as membranas biológicas são muitas vezes utilizadas como modelos de investigação de estruturas biológicas¹⁹.

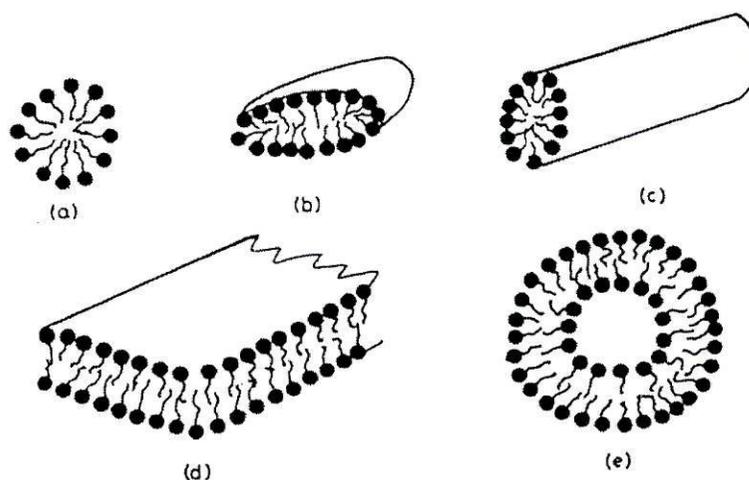


Figura 1.5- Alguns tipos de estruturas micelares: (a) esférica, (b) “disc-like”, (c) cilíndrica, (d) lamelar, (e) vesícula esférica. Os grupos hidrofílicos estão representados pelos círculos pretos.

Na figura 1.6 está representada esquematicamente com mais pormenor uma micela esférica. Considera-se que a micela tem um núcleo líquido formado por n cadeias carbonadas com os grupos ionizados direccionados para a água. A camada que envolve o núcleo designa-se por camada de Stern que contém não só os grupos iónicos, mas também $(1 - \alpha)n$ contra-íões, cujo grau de ionização α varia entre 0,6 e 0,9. Existe ainda uma camada mais difusa, a camada Gouy-Chapman, contendo αn contra-íões^{23,24}.

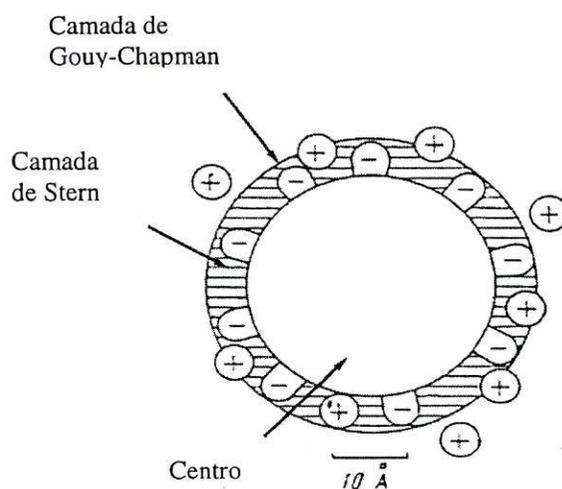


Figura 1.6- Representação esquemática de uma micela iónica de SDS (adaptação da referência 12).

A superfície duma micela não é uniforme. Resultados de RMN²⁵ (ressonância magnética nuclear) indicam que algumas cadeias de hidrocarbonetos estão expostas ao solvente, ou pelo menos contactam com ele periodicamente. De facto as micelas contêm uma considerável quantidade de água (por exemplo: 33-46% no SDS). A água está provavelmente localizada não só na superfície mas também no interior da micela, diminuindo a sua quantidade com a distância aos grupos hidrofílicos¹². Recentes estudos de fluorescência das ligações hidrogénio nos agregados micelares indicam ainda que uma micela é uma estrutura porosa na qual a água e a região hidrofóbica estão em permanente contacto¹³.

A superfície de uma micela pode ser considerada como um “ambiente” polar com características diferentes da água. O interior de carácter hidrofóbico tem propriedades semelhantes às cadeias de hidrocarbonetos líquidas embora mais ordenadas. Em geral a micela apesar de possuir alguma características de sólidos é semelhante ao estado líquido. Esta última hipótese é consistente com os seguintes factos: a) a possibilidade de se formarem micelas mistas com vários aditivos e b) a ocorrência de solubilização em sistema micelares. O processo b) assemelha-se em muitos aspectos à extracção de substâncias orgânicas da fase aquosa, com as micelas a “actuarem” como uma segunda fase¹³.

Aplicações das micelas

Os sistemas micelares têm tido ampla aplicação nos últimos anos em diferentes áreas da química analítica, sendo utilizados numa variedade de técnicas como a espectrofotometria de ultravioleta/Visível (especialmente na detecção de metais),^{26,27} fluorimetria,¹³ espectrometria de quimiluminescência,²⁸⁻³¹ espectrometria de absorção atómica³² e cromatografia^{33,34}.

As micelas são as responsáveis pela maior parte das aplicações práticas dos detergentes como: (i) o aumento da solubilidade de compostos orgânicos em água devido à sua incorporação na micela; (ii) catálise de muitas reacções e (iii) alteração do equilíbrio e da velocidade de reacções.

Adicionalmente, os sistemas micelares têm a vantagem de serem práticos devido à sua estabilidade, serem opticamente transparentes e relativamente não tóxicos¹³.

1.3 DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS ENTRE AS FASES AQUOSA E MICELAR

Considerações gerais

De todas as aplicações das micelas, a de maior interesse analítico advém do papel importante que desempenham em processos de solubilização. Substâncias pouco solúveis ou mesmo insolúveis em água podem ser transportadas por esta depois de terem sido dissolvidas nas micelas. Por esta razão os sistemas micelares são utilizados por exemplo como detergentes ou como transportadores de fármacos¹⁹. Este facto é comprovado pelo aumento pronunciado da solubilidade quando a concentração micelar crítica é atingida. Este aumento é proporcional à concentração de surfactante, principalmente devido ao acréscimo do número total de micelas por unidade de volume¹².

Os métodos de determinação da solubilidade em sistemas micelares são idênticos aos da determinação da concentração de qualquer composto num dado solvente. Como a solubilidade depende da temperatura é importante que estes métodos estejam sujeitos a um adequado controlo de temperatura.

A solubilização é um processo dinâmico, em que as moléculas solubilizadas estão em equilíbrio permanente entre as fases aquosa e micelar (tempos de residência na micela $\approx 10^{-3}$ a 10^{-5} segundos), quanto mais hidrofóbica é a molécula maior é o seu tempo de residência na micela³⁵.

A tendência de uma molécula interactuar com micelas é expressa pela sua constante de ligação, K. Para a reacção



em que S e C correspondem respectivamente ao substrato e ao agregado micelar, a constante de ligação pode ser expressa por

$$K = \frac{[SC]}{[S][C]} \quad (1.2)$$

C é expresso pela concentração do surfactante em forma de micela, isto é, igual à diferença entre a concentração analítica do surfactante e a concentração micelar crítica.

Determinação das constantes de ligação

O processo de solubilização é afectado por vários factores, que por sua vez influenciam as propriedades das micelas (temperatura, concentração do contra-íão, presença de electrólitos inertes), e é dificultado pelo efeito das próprias substâncias solubilizadas nas micelas¹².

No entanto, os valores das solubilidades podem ser interpretados, com as devidas precauções, com base num modelo simples, no qual as micelas são consideradas uma fase distinta do resto da solução¹².

Considera-se que a substância A é distribuída entre as fases micelar e aquosa de acordo com a lei de distribuição simples:

$$|A|_M / |A|_W = P_A \quad (1.3)$$

em que $|A|_M$ e $|A|_W$, correspondem às concentrações locais do soluto A em mol/dm³ nos volumes das fases micelar e aquosa respectivamente.

Se $|C_{AM}|$ e $|C_{AW}|$ se referem, respectivamente, às concentrações analíticas do soluto na fase micelar e na fase aquosa (relativamente ao volume total da solução), $|A|_M$ e $|A|_W$ são dadas como:

$$|A|_M = |C_{AM}| / CV \quad (1.4)$$

$$|A|_W = |C_{AW}| / (1 - CV) \quad (1.5)$$

em que C é igual à diferença entre a concentração do surfactante (em mol/dm³) e a cmc, e V é o volume molar do surfactante.

A concentração total de A em relação ao volume de todo o sistema, é dado por:

$$|A|_0 = |A|_M CV + |A|_W (1-CV) \quad (1.6)$$

Combinando (1.3) com (1.6), obtém-se

$$|A|_0 / |A|_W = 1 + (P_A - 1) CV \quad (1.7)$$

em que P_A é o coeficiente de partilha e os factores CV e $1 - CV$ são as fracções por volume das fases micelar e aquosa respectivamente.

Atendendo a que a distribuição (1.3) é satisfeita para concentrações acima de S_W (solubilidade de A em água), então a solubilidade S_M na presença do surfactante está relacionada com S_W pela equação (1.7), que pode ser escrita da seguinte forma:

$$S_M / S_W = 1 + K_A C \quad (1.8)$$

Em que a constante K_A corresponde a

$$K_A = (P_A - 1)V \quad (1.9)$$

e tem, a dimensão de uma constante de ligação comum (M^{-1}).

Para considerações gerais, a equação (1.3) será aplicada apenas para soluções diluídas, pelo que a equação (1.8) é aplicada unicamente para substâncias pouco solúveis, cujas soluções saturadas possam ser consideradas ainda "diluídas".

A equação (1.8) pode ser rescrita como:

$$S_M / S_W - 1 = K_A C \quad (1.10)$$

A representação gráfica de $S_M / S_W - 1$ em função de C dá origem a uma recta cuja intersecção na origem é igual a zero e o declive é igual a K_A .

As constantes do tipo K_A são indicadoras da eficiência da solubilização. Exemplos da utilização de valores de solubilidade de várias substâncias para a determinação das constantes de ligação com as micelas podem ser encontradas nas referências 36-40.

A constante de ligação de uma substância a uma micela pode ser facilmente obtida quando existe variação numa propriedade molecular que possa ser detectada ao passar de um meio aquoso para um meio micelar¹².

Neste trabalho a propriedade utilizada é a absorvância, obtida por espectroscopia de ultravioleta-visível, mas também se poderia ter recorrido à espectroscopia de RMN (ressonância magnética nuclear) ou à espectroscopia de RSE (ressonância de spin electrónico). Uma vez que a alteração das absorvâncias ou absortividades molares está relacionada com a mudança do microambiente da molécula, estes resultados poderão ser utilizados para interpretar a localização das moléculas solubilizadas na micela.

Localização das moléculas solubilizadas numa micela

A localização e a orientação das moléculas solubilizadas numa micela estão dependentes da natureza da espécie solubilizada e do surfactante.

Como já foi referido, as micelas são estruturas dinâmicas não permitindo assim determinar com exactidão a localização do soluto, podendo-se no entanto determinar a sua localização preferencial. De salientar, no entanto, que apesar de uma dada região da micela poder ser um local preferencial de solubilização, não há nenhuma garantia de que todos os fenómenos relacionados com o sistema estejam associados a essa região¹⁵.

Os diferentes locais possíveis de solubilização numa micela encontram-se esquematizados na figura 1.7, onde se torna evidente que as moléculas solubilizadas podem estar localizadas em vários microambientes, desde a superfície da micela até ao interior mais profundo do agregado³⁵.

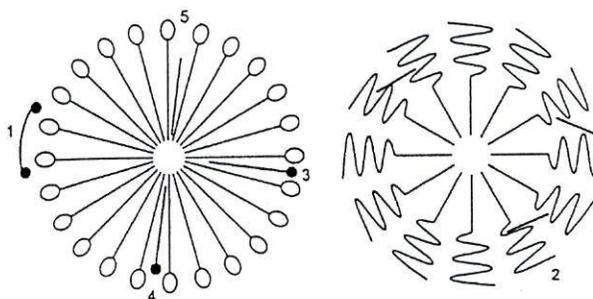


Figura 1.7- Esquema das possíveis localizações das moléculas solubilizadas

Assim, as moléculas solubilizadas na micela podem ser encontradas nos seguintes locais³³:

- 1- Adsorvidas na superfície da micela, isto é, na interface água/micela, que é a suposição mais provável para moléculas contendo grupos polares;
- 2- Entre os grupos hidrofílicos, no caso de surfactantes não iónicos;
- 3- Entre os grupos hidrofílicos, próximo da superfície micelar, orientados radialmente na micela de forma a que a parte polar da molécula esteja situada na superfície e a parte apolar no interior da micela;
- 4- Situadas mais profundamente entre os grupos hidrofóbicos;
- 5- No interior da micela de carácter hidrofóbico;

Para verificar a forma como as moléculas são solubilizadas numa micela é usual comparar espectros de ultravioleta-visível, RMN e RSE, traçados na presença e na ausência de surfactante. No entanto a interpretação dos espectros é dificultada pelo facto de os efeitos observados dependerem de vários factores. Por essa razão os estudos publicados, utilizando diferentes métodos e dando resultados consistentes acerca do rearranjo das moléculas solubilizadas numa micela, são especialmente valiosos.

Em geral verifica-se que¹²:

- as moléculas alifáticas estão imersas no interior hidrofóbico das micelas ;
- as moléculas aromáticas ou as partes aromáticas das moléculas estão provavelmente na superfície das micelas catiónicas e no interior das micelas neutras e aniónicas;
- as moléculas com substituintes polares (álcoois, fenóis, ácidos, aminas etc) estão orientadas com os grupos polares para a superfície e as partes não polares imersas no interior da micela;
- os iões são adsorvidos na superfície das micelas.

A eficiência de uma interacção química entre as moléculas solubilizadas está obviamente dependente da respectiva orientação. O rearranjo das moléculas solubilizadas na micela é, por conseguinte, uma questão que importa ser examinada em mais detalhe.

Factores que influenciam a solubilização

O principal factor a influenciar a capacidade de um surfactante solubilizar uma substância é a sua estrutura molecular, uma vez que é ela que determina as suas características (cmc, número de agregação, forma da micela, etc). Consequentemente todos os factores que afectam a estrutura molecular do surfactante também inferem no valor da solubilidade, nomeadamente a adição de um terceiro componente na solução de surfactante¹⁵.

A concentração micelar crítica e o número de agregação podem ser relacionados com o tamanho e a natureza do grupo hidrofóbico da micela. Verifica-se que o aumento do tamanho do grupo hidrofóbico para um dado grupo hidrofílico provoca a diminuição da cmc e o aumento do número de agregação.

Como os hidrocarbonetos e os compostos orgânicos pouco solúveis em água usualmente se solubilizam no interior e entre os grupos da micela, a quantidade de material

solubilizado será tanto maior quanto maior for o tamanho da micela. Então, qualquer factor que provoque o aumento do tamanho da micela também contribui para um aumento da sua capacidade de solubilização. O aumento do tamanho da cadeia de hidrocarboneto, por exemplo, origina uma diminuição da cmc e um aumento do número de agregação de modo a permitir que um maior número de substâncias se incorpore na micela.

Considerando o poder solubilizante dos diferentes tipos de surfactante para uma dada cadeia hidrofóbica, geralmente verifica-se que os surfactantes neutros têm um poder solubilizante superior ao dos surfactantes catiónicos, e o destes, por sua vez, é maior que dos aniónicos.

A estrutura do composto a dissolver é também um dos factores que afecta a solubilização. Harkin *et al.*⁴¹ investigaram a solubilização de hidrocarbonetos e de compostos aromáticos e concluíram existir uma relação inversa entre o volume molecular do soluto e a sua quantidade solubilizada. Um factor ainda a ter em conta é a polaridade do composto a solubilizar. No caso de surfactantes neutros, verifica-se que quanto mais polar é a molécula a solubilizar, maior é a capacidade da micela para incorporá-la. Tal facto é, aliás, indicativo que a solubilização ocorre entre os grupos hidrofílicos da micela.

Como a temperatura influencia as características de uma micela, conseqüentemente também afectará a solubilidade dos solutos, devido à alteração da estrutura da micela. Além disso uma variação da temperatura afecta as interacções intermoleculares entre soluto e solvente (por exemplo as ligações de hidrogénio), o que pode significar uma alteração das propriedades do surfactante e do soluto. Geralmente observa-se que um aumento de temperatura é responsável pelo aumento da solubilização dos compostos polares e apolares em micelas de surfactantes iónicos, enquanto que para os surfactantes neutros o efeito da temperatura depende da natureza do soluto. Compostos apolares localizados no centro da micela sofrem um aumento da solubilidade devido ao aumento do número de agregação.¹⁵

A adição de substâncias que não fazem parte do sistema inicial (solvente-surfactante-soluto) pode provocar alterações significativas no poder solubilizante de um surfactante devido ao seu efeito na concentração micelar crítica e no número de agregação. Verifica-se que a adição de compostos polares aumenta a solubilidade do soluto apolar nas micelas iónicas. Winsor⁴² sugeriu um mecanismo para tal acção baseado em interacções intra e intermoleculares. Na essência, o mecanismo, como se pode observar na figura 1.8, envolve a incorporação do composto polar entre os monómeros de surfactante. Como resultado, surge uma diminuição das repulsões entre os grupos hidrofílicos, e um aumento do volume do interior da micela, originando assim um maior espaço para incorporar o soluto.

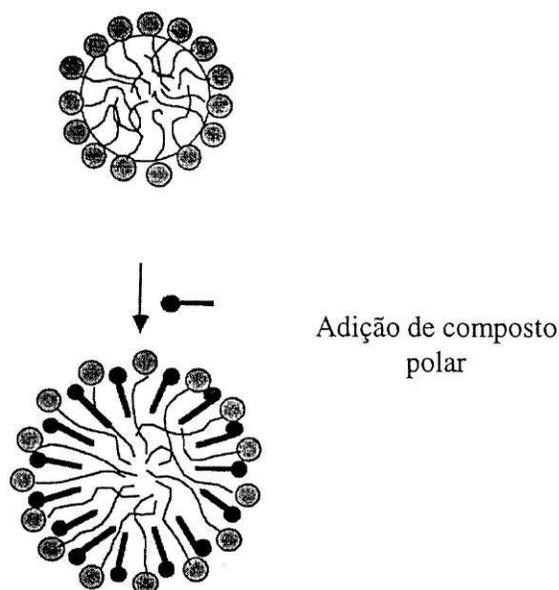


Figura1.8- Mecanismo de Winsor para aumentar a solubilidade de solutos apolares devido à adição de compostos polares (adaptação da referência 15).

A adição de electrólitos a surfactantes iónicos diminui a concentração micelar crítica e aumenta o número de agregação, ou seja o tamanho da micela. Para concentrações de surfactante perto da cmc, verifica-se geralmente um aumento da solubilidade como resultado de um aumento do número de micelas, no entanto, para concentrações bem acima da cmc, é difícil prever o efeito do electrólito. Esta dificuldade dever-se-á ao facto do efeito na solubilidade resultante da adição de electrólitos, estar relacionada também com a natureza do soluto e a sua potencial localização na micela. Os solutos apolares como os hidrocarbonetos sofrerão um aumento de solubilidade devido ao aumento do volume do centro da micela. Para solutos polares, como alguns álcoois, que se localizam entre os grupos hidrofílicos, observa-se uma diminuição de solubilidade, uma vez que a diminuição das repulsões dos grupos hidrofílicos provoca a sua aproximação não permitindo assim a incorporação do soluto¹⁵.

Outro factor que pode afectar a capacidade solubilizante de um surfactante é o pH. Apesar deste efeito ainda não estar extensivamente documentado, como os factores anteriores, é de se esperar que os surfactantes mais sensíveis ao pH, como os carboxilatos, sofram variações significativas de solubilidade com a alteração do pH do meio. Além disso, uma alteração de pH pode afectar a natureza do próprio soluto originando diferentes interacções com as micela, incluindo o próprio local de solubilização¹⁵.

1.4 EQUILÍBRIO ÁCIDO/BASE EM SOLUÇÕES MICELARES

Considerações gerais

O aumento da utilização de soluções micelares como solventes em química analítica,⁴³ bem como noutras áreas como por exemplo na catálise micelar,⁴³⁻⁴⁵ tem contribuído para o crescente interesse do conhecimento da influência das micelas nas propriedades ácido/base de substâncias. Esta influência pode ser significativa e reflecte-se na variação das constantes de ionização.

A amplitude da variação da constante de acidez depende de duas propriedades do microambiente da substância na micela: a constante dieléctrica e o potencial de superfície.⁴⁵⁻⁴⁷ A contribuição destas duas propriedades na variação das constantes de acidez tem sido quantificada com base em modelos electrostáticos e de troca iónica, que permitem prever os efeitos da concentração do surfactante e da adição de contra-íões na variação das constantes de acidez⁴³. De seguida serão descritos os dois modelos utilizados neste trabalho, o modelo de Berezin e o modelo PIE.

Tratamento teórico da acidez em meio micelar

A dissociação de um ácido catiónico, como os utilizados no presente trabalho, em solução aquosa, pode ser representada pela seguinte equação química



Para a qual se pode definir a *constante de acidez* pela equação

$$K_a = \frac{| \text{H}^+ || \text{B} |}{| \text{HB}^+ |} \quad (1.12)$$

Em soluções micelares, a *constante de acidez aparente* deste mesmo ácido é definida pela expressão

$$K_{app} = \frac{| \text{B} || \text{H}^+ |_f}{| \text{HB}^+ |} \quad (1.13)$$

No entanto, em soluções de surfactantes com concentração superior à concentração micelar crítica, as espécies B e HB⁺ podem encontrarem-se ligadas às micelas, admitindo-se a sua distribuição entre a fase aquosa e micelar, obtendo-se assim,

$$K_{app} = \frac{(|B|_b + |B|_f)|H^+|_f}{(|HB|_b + |HB|_f)} \quad (1.14)$$

em que os índices *f* e *b* se referem, respectivamente, às espécies livres e ligadas às micelas. Quando

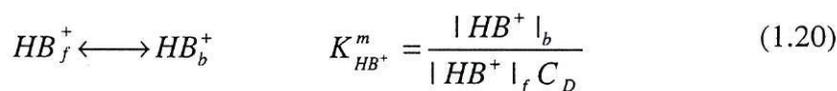
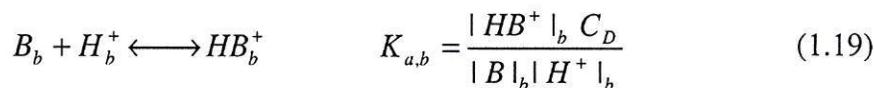
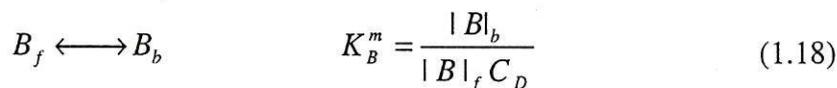
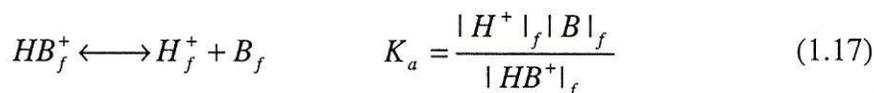
$$|B|_b + |B|_f = |HB^+|_b + |HB^+|_f \quad (1.15)$$

O valor de pK_{app} é definido como o valor de *pH intermicelar*.

$$pK_{app} = pH = -\log|H^+| \quad (1.16)$$

Nestas e nas expressões seguintes, H⁺ representa o protão, HB⁺ e B representam, respectivamente a forma protonada e a forma neutra da benzodiazepina.

Berezin propôs um dos modelos mais simples para a dissociação de espécies protonadas (HB⁺), considerando a distribuição das espécies entre as micelas e o meio aquoso.⁴⁵ Esta distribuição é descrita pelo seguinte conjunto de equilíbrio:



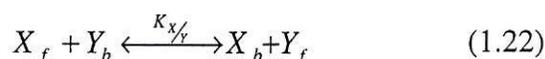
Utilizando as constantes de equilíbrio acima representadas e substituindo na equação (1.15), é possível derivar a seguinte expressão para a constante de acidez,

$$K_{app} = [H^+]_f = K_a \frac{(1 + K_B^m C_D)}{(1 + K_{HB^+}^m C_D)} \quad (1.21)$$

onde C_D é a concentração de surfactante acima da cmc (diferença entre a concentração total de surfactante, C_T , e a concentração micelar crítica, cmc, isto é, $C_D = C_T - \text{cmc}$), $K_{HB^+}^m$ e K_B^m são respectivamente as constantes de ligação às micelas das espécies protonadas e das espécies neutras e K_a é a constante de acidez da espécie protonada em meio aquoso.

O modelo **PIE** (Pseudophase Ion Exchange), considera a existência de duas fases, a fase aquosa e a pseudofase micelar, e a troca iónica entre as espécies protonadas e o contra-íon do surfactante.⁴⁸

Considerando a pseudofase micelar iónica como uma fase distinta da fase aquosa, é possível descrever a permuta iónica entre as duas fases por um equilíbrio do tipo:



O coeficiente de selectividade correspondente, é dado pela seguinte expressão:

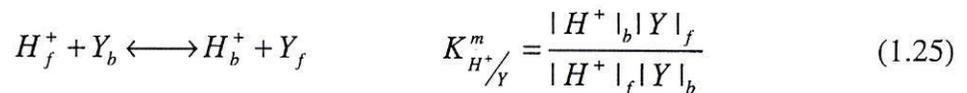
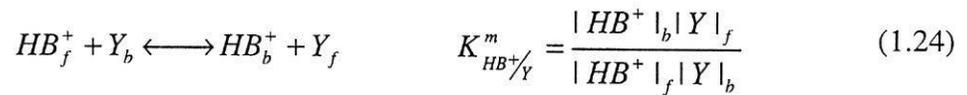
$$K_{X/Y} = \frac{X_b Y_f}{X_f Y_b} \quad (1.23)$$

O facto de as micelas não constituírem uma fase macroscópica contínua pode levar a que se questione a aplicabilidade da equação (1.23) para meios micelares. No entanto, verifica-se que o processo de troca iónica em soluções micelares pode efectivamente ser tratado como se ocorresse entre as pseudofases aquosa e micelar⁴⁸.

Neste modelo pressupõe-se que $K_{X/Y}$, o grau de ionização da micela (α) e o valor da cmc não são afectados pela variação da concentração total de surfactante.

A aplicação do modelo PIE assume ainda que a ligação de uma espécie às micelas pode ser descrita por uma constante, K_a^m , cujo valor reflecte as propriedades das micelas no meio, propriedades essas que são consideradas independentes da composição da solução.

Na aplicação do modelo PIE a um ácido fraco do tipo HB^+ em solução micelar de um surfactante aniónico, D^-Y^+ , pode-se considerar que os seguintes equilíbrios, juntamente com os mencionados para o modelo de Berezin, caracterizam a dissociação e a distribuição das espécies neutras e protonadas entre as micelas e a solução aquosa,



Utilizando as constantes de equilíbrio acima mencionadas e substituindo na equação (1.15), obtém-se a expressão

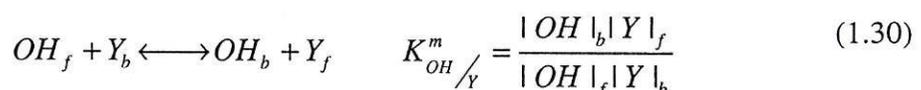
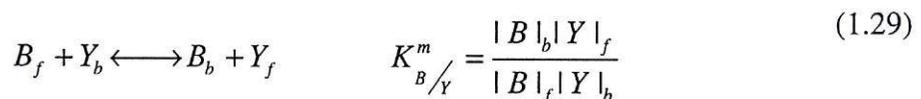
$$K_{app} = |H^+|_f = K_a \frac{(1 + K_B^m C_D)}{\left[1 + K_{HB^+/Y}^m \left(\frac{Y_b}{Y_f} \right) \right]} \quad (1.26)$$

em que

$$Y_b = (1 - \alpha)C_D - (|H^+|_b + |HB^+|_b) \quad (1.27)$$

$$Y_f = C_D \alpha + cmc + (|H^+|_b + |HB^+|_b) + |BY|_T \quad (1.28)$$

Na aplicação do modelo PIE a um ácido fraco do tipo HB^+ em solução micelar de um surfactante catiónico, D^+Y^- , pode-se considerar que os seguintes equilíbrios, juntamente com os mencionados para o modelo de Berezin, caracterizam a dissociação e a distribuição das espécies neutras e protonadas entre as micelas e a solução aquosa,



Utilizando as constantes de equilíbrio acima mencionadas e substituindo na equação (1.15), obtém-se a expressão

$$K_{app} = |H^+|_f = K_a \frac{\left[1 + K_{B/Y}^m \left(\frac{Y_b}{Y_f} \right) \right]}{\left(1 + K_{HB^+}^m C_D \right)} \quad (1.31)$$

em que

$$Y_b = (1 - \alpha)C_D - (|OH|_b + |B|_b) \quad (1.32)$$

$$Y_f = C_D \alpha + cmc + (|OH|_b + |B|_b) + |BY|_T \quad (1.33)$$

Efeito dos sistemas micelares nas constantes de ionização

Apesar de existirem vários estudos publicados sobre a influência de sistemas micelares nas propriedades ácido/base de diversas substâncias, estes referem-se a ácidos neutros e não a ácidos catiónicos como os analisados neste trabalho. Contudo, estes estudos permitem comparar a variação das constantes de ionização dos ácidos neutros nos diferentes surfactantes e prever o comportamento esperado para os ácidos catiónicos.

Para ácidos neutros verifica-se que o facto do surfactante utilizado como solvente ter carga negativa, positiva ou não ter carga, provoca alterações diferentes nos valores das constantes de acidez. Considerando $\Delta pK_a = pK_{app} - pK_a$, e o equilíbrio $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$, as seguintes observações são feitas⁴³:

- Os sistemas micelares aniónicos em alguns ácidos não provocam uma variação significativa e noutros provoca uma diminuição da ionização ($\Delta pK_a > 0$), devido à repulsão electrostática entre a base conjugada (A^-) e as micelas, deslocando o equilíbrio para a esquerda.
- Os sistemas micelares neutros diminuem a ionização devido ao facto de ser a espécie ácida não dissociada a ligar-se à micela, logo ΔpK_a é positivo.
- Os sistemas micelares catiónicos provocam resultados opostos aos dos sistemas aniónicos, apresentando um aumento da ionização, provavelmente devido à forte

atracção electrostática entre a carga negativa da base conjugada e o grupo catiónico da micela, que desloca o equilíbrio para a direita. Portanto a ionização aumenta quando $K_A > K_{HA}$.

Estas observações permitem extrapolar o comportamento dos ácidos catiónicos em meio micelar:

- Em sistemas micelares aniónicos, devido à atracção electrostática entre o ácido e o grupo aniónico das micelas, é de esperar que o equilíbrio (1.11) seja deslocado para a esquerda, provocando uma diminuição da ionização, ou seja o aumento dos valores de pK_{app} .
- Nos sistemas micelares neutros, se considerarmos que é a espécie sem carga (B) a responsável pela associação às micelas, tal como sucedia com os ácido neutros, então o equilíbrio (1.11) será deslocado para a direita, aumentando a ionização ($\Delta pK_a < 0$).
- Os sistemas micelares catiónicos por norma provocam resultados opostos aos dos sistemas micelares aniónicos, apresentando então neste caso um aumento da ionização, provavelmente devido à repulsão entre o ácido catiónico e as micelas catiónicas.

1.5 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE EQUILÍBRIO

Considerações gerais

A determinação de constantes de equilíbrio em solução é uma área da química que tem sido largamente estudada dado o seu interesse não só sob um ponto de vista meramente químico, isto é, do conhecimento da possível interacção de substâncias em solução e do seu comportamento como ácidos, bases ou complexos moleculares, mas também pelo interesse que estas constantes podem ter na resolução de problemas de outras áreas da Ciência como por exemplo a biologia e a farmacologia.

A determinação experimental de constantes de equilíbrio só pode ser efectuada a partir de uma determinada propriedade mensurável que possa ser relacionada com as concentrações em solução de alguma ou de algumas espécies do sistema em estudo.

Os métodos experimentais utilizados para obter constantes de equilíbrio podem ser divididos em dois grandes grupos:

- i) métodos em que a propriedade medida é proporcional à concentração de uma determinada espécie (todos os métodos espectroscópicos);
- ii) métodos em que a propriedade medida é proporcional à actividade das moléculas de uma determinada espécie (maioria dos métodos electroquímicos e de distribuição).

De salientar, no entanto, que quando as determinações experimentais são efectuadas mantendo a composição do meio constante (na prática, mantendo a força iónica constante com o recurso à utilização de um electrólito inerte), esta divisão deixa de ter significado e as constantes de equilíbrio passam a ser constantes estequiométricas, embora neste caso seja necessário definir de forma explícita as condições experimentais utilizadas.

De seguida aborda-se a espectrofotometria de ultravioleta/visível, o método utilizado neste trabalho, que é aliás, uma das técnicas mais utilizadas na determinação de constantes de equilíbrio devido ao facto da instrumentação utilizada ser corrente na maioria dos laboratórios e também por fornecer valores que geralmente são muito precisos, conjuntamente com alguma informação estrutural sobre as espécies em solução.

Aquisição de dados

A determinação de constantes de equilíbrio a partir de resultados espectrofotométricos é realizada com base na lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bc$), que mostra que, para uma dada substância e a um dado comprimento de onda, a absorvância (A) é directamente proporcional à concentração (c) da espécie absorvente, para a mesma espessura (b). Trata-se duma lei fundamental para todos os tipos de absorção electromagnética, aplicando-se não só a soluções mas também a gases e a sólidos⁴⁹.

O termo ϵ chama-se absortividade molar, quando a concentração se exprime em moles por litro, ou somente absortividade, dando-se o símbolo a quando se usam outras unidades para a concentração. Note-se que a absortividade é directamente proporcional à área de captura associada a uma dada partícula, pelo que depende assim, do tipo de substância e da energia do feixe incidente, ou seja, do seu comprimento de onda.

A lei de Beer é aditiva, isto é, pode aplicar-se a uma solução contendo mais do que uma espécie absorvente, desde que não haja interacção entre elas. Assim, para um sistema de vários componentes temos

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 b C_1 + \epsilon_2 b C_2 + \dots + \epsilon_n b C_n \quad (1.34)$$

onde os índices se referem às espécies absorventes 1,2, ...,n.

A qualidade dos dados espectrofotométricos obtidos está directamente relacionada com o cuidado com que se fazem as determinações experimentais. É importante ter presente as características fundamentais do espectrofotómetro utilizado e garantir que as medições de absorvância sejam efectuadas na zona de máxima precisão do instrumento⁹. Um parâmetro a ter em consideração é a temperatura, devendo usar-se células termostatzadas na determinação de constantes de equilíbrio, pois estas variam com a temperatura ($\Delta G = -RT \ln K$).

A base para a obtenção de constantes de acidez por espectrofotometria de ultravioleta/visível é a determinação directa da razão entre moléculas não dissociadas e moléculas dissociadas numa série de soluções com solvente não absorvente a pH ajustado⁵⁰.

Na prática mede-se a absorvância de uma série de soluções a vários comprimentos de onda, contra uma solução de referência (branco). Deve ser então obtido o espectro das espécies não dissociadas, numa solução a pH fixo, de modo que toda a substância a analisar se encontre nessa forma. O espectro é depois comparado com outro obtido só com moléculas

dissociadas, a um outro valor fixo de pH^{50} . Deve ser escolhido o comprimento de onda ou a zona de comprimentos de onda para qual a diferença existente entre as absorvidades molares nestas espécies seja maior. Quando não há uma variação significativa, deve usar-se vários comprimentos de onda interpolados em intervalos iguais⁵¹.

Utilizando várias soluções com valores de pH intermédios, pode-se calcular a razão entre as duas espécies, uma vez que ela depende unicamente do pH da solução que é medida espectrofotometricamente. Se for assumido que ambas as espécies se encontram dentro dos requisitos da lei de Lambert-Beer, a absorvância (A) no comprimento de onda analítico será devida à soma das absorvâncias das espécies moleculares (A_M) e das espécies ionizadas (A_I), isto é⁵⁰

$$A_{\text{obs.}} = A_M + A_I \quad (1.35)$$

Embora possa ser apenas necessário usar determinadas zonas espectrais para a obtenção de constantes de equilíbrio de um determinado sistema em estudo, a obtenção do seu espectro total pode muitas vezes permitir obter informação sobre o número de componentes desse mesmo sistema⁹.

Como observado na equação 1.34 a absorvância de cada componente está relacionada com a sua concentração molar. A concentração das espécies ionizadas na mistura é $F_I C$ e das espécies moleculares é $F_M C$. Assim, a equação 1.35 toma a forma

$$A_{\text{obs}} = \epsilon_M F_M C b + \epsilon_I F_I C b \quad (1.36)$$

Em que ϵ_M e ϵ_I são as absorvidades molares das espécies ionizadas e moleculares, respectivamente, F_I é a fracção ionizada e F_M é a fracção da forma molecular.

As fracções ionizada e molecular da espécie absorvente, são dadas pelas expressões matemáticas seguintes no caso de se tratarem de ácidos

$$F_I = \frac{K_a}{|H^+| + K_a} \quad (1.37)$$

$$F_M = \frac{|H^+|}{|H^+| + K_a} \quad (1.38)$$

Como as células utilizadas nas determinações experimentais têm o mesmo percurso óptico e $\varepsilon = A/C$, a equação 1.36 toma a forma

$$\varepsilon = \varepsilon_I \frac{K_a}{|H^+| + K_a} + \varepsilon_M \frac{|H^+|}{|H^+| + K_a} \quad (1.39)$$

Desde que a concentração total seja igual em todas as determinações, é possível substituir o valor das absorptividades molares pelo das absorvâncias. A equação pode ser rearranjada em duas formas de modo a poder ser aplicada em diferentes situações:

Se A_I é maior que A_M

$$pK_a = pH + \log \frac{A_I - A}{A - A_M} \quad (1.40)$$

Se A_M é maior que A_I

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A_I}{A_M - A} \quad (1.41)$$

Após a definição do modelo que poderá descrever o sistema em estudo, os resultados experimentais serão tratados de modo a permitirem a obtenção de constantes de equilíbrio. Para o método espectrofotometria de UV/VIS os métodos matemáticos simplificados são frequentemente usados, no entanto, dada a existência de alguns programas de regressão não linear para o cálculo de constantes de equilíbrio por espectrofotometria de UV/VIS, estes resultados experimentais são por vezes apenas utilizados para a obtenção de estimativas das constantes de equilíbrio e informação sobre o número de componentes do sistema⁹.

A obtenção de valores de constantes de equilíbrio utilizando resultados espectrofotométricos depende do conhecimento das absorptividades molares das espécies do sistema em estudo e se não for possível a sua determinação experimental, serão mais um parâmetro a determinar conjuntamente com as constantes de equilíbrio, o que pode fornecer valores menos fiáveis para ambos os parâmetros, dada a intercorrelação entre eles^{51,52}. No entanto, a possibilidade de os obter permite considerar a espectrofotometria como um método que fornece mais informação sobre a plausibilidade do modelo proposto para o sistema em estudo.^{53,54}

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA

Neste capítulo descrevem-se as condições experimentais utilizadas neste trabalho, que consistiu em grande parte na determinação de constantes de acidez. Por esta razão e pelo facto de uma análise de resultados publicados sobre constantes de equilíbrio realizada pela IUPAC mostrar que em muitos casos a falta de especificação das condições experimentais utilizadas na obtenção das constantes não permite tirar conclusões sobre a sua fiabilidade nem tão pouco reproduzi-las, houve uma especial atenção na descrição das condições experimentais tendo-se revelado todas as informações específicas exigidas pela IUPAC⁵⁵ para a publicação de constantes de equilíbrio (ver apêndice B).

Assim sendo, encontra-se descrito neste capítulo a instrumentação utilizada, os reagentes, a composição das soluções (indicando claramente a força iónica), a indicação da temperatura a que as determinações foram realizadas, o método de calibração e ainda os métodos de cálculo utilizados.

2.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados eram de qualidade pro analysi ou semelhante e não foram submetidos a qualquer purificação adicional. As soluções foram todas preparadas com água desionizada (condutividade inferior a $0,1 \text{ mScm}^{-1}$).

As benzodiazepinas estudadas foram o *clorodiazepóxido* (CLDZ) e o *diazepam* (DZP). O CLDZ foi gentilmente cedido pelos laboratórios da indústria farmacêutica Hoffman La Roche (Basle, Switzerland) e o DZP pelos laboratórios Bial.

Os surfactantes utilizados foram o dodecilsulfato de sódio (SDS), o polietilenoglicol p-t-octil-fenol (Triton X-100), ambos da marca Sigma e o brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) da marca Aldrich.

O pirogalhol era da marca Merck; o cloreto de sódio da marca Merck; o hidróxido de sódio da marca Riedel-de Haën e as soluções padrão de ácido clorídrico da marca Merck (Titrisol, ref. 9973).

2.2 SOLUÇÕES

As soluções utilizadas nos ensaios, todas com força iónica ajustada a 0,1 M em NaCl, foram obtidas por diluição rigorosa de soluções mais concentradas de CLDZ, SDS, Triton X-100, CTAB e NaCl em água, preparadas por pesagem numa balança analítica (10^{-5} g) da marca Metler, modelo AT201.

As soluções de *clorodiazepóxido* e de *diazepam* foram sempre que possível, mantidas ao abrigo da luz para minimizar a sua decomposição.

As soluções de cada um dos surfactantes em água (0,05M-0,10M) permaneceram estáveis durante várias semanas.

Devido à formação de cristais nas soluções de CTAB a temperaturas inferiores a 20°C, foi necessário submetê-las a um aquecimento até à temperatura de 25°C para posterior utilização.

As soluções de hidróxido de sódio usadas nas titulações foram sempre preparadas de modo a serem isentas de carbonato para manter a concentração de iões hidróxido. Para esse efeito foram sempre preparadas a partir de uma solução saturada de hidróxido de sódio (50 % m/m), usando água desionizada previamente fervida e arrefecida em atmosfera de argón. A solução saturada de hidróxido de sódio foi filtrada antes de adicionada à solução, removendo assim o precipitado de carbonato de sódio. Para evitar o contacto da solução com o dióxido de carbono (e a conseqüente formação de carbonato) fez-se passar continuamente pela solução uma corrente de argón. A força iónica foi mantida com NaCl a 0,1 M.

O argón usado, de qualidade P48, foi conduzido em canalização de aço inoxidável, directamente da garrafa e purificado antes de ser introduzido na solução de hidróxido de sódio. A purificação prévia do argón foi feita pela sua passagem por dois frascos lavadores, o primeiro contendo uma solução alcalina de pirogalhol (350 g/dm^3 de hidróxido de sódio e 30 g/dm^3 de pirogalhol) para remover o dióxido de carbono, e o segundo contendo água para humidificar o argón e evitar o arrastamento do pirogalhol.

2.3 INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA

Medições de pH

Todas as medições foram efectuadas sob atmosfera inerte de árgon num vaso de vidro termostaticado de parede dupla, tendo a temperatura sido mantida constante a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por recirculação de água com um circulador Clifton. A homogeneização das soluções foi realizada com um agitador magnético da marca Crison, modelo 2038.

Utilizou-se um eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio da marca Russel modelo SWL ref 49935/24 e um eléctrodo de referência de prata /cloreto de prata de dupla junção da marca Russel modelo 900200, ref. 51898/5 (solução interna: solução Orion saturada com Ag; solução externa: NaCl 0,1 M)

Os parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro foram obtidos por titulação de soluções ácido forte com base forte, utilizando um sistema de titulação automático cuja descrição pormenorizada encontra-se na secção seguinte devido à sua importância para os valores determinados das constantes de acidez.

O ajuste de $-\log C_{\text{H}^+}$ das várias soluções foi efectuado por adição de quantidades vestigiais de ácido forte ou base forte às soluções amostra de modo a que a quantidade de volume adicionado fosse desprezável. As medições de $-\log C_{\text{H}^+}$ e a calibração do sistema foram sempre realizadas como se descreve na secção seguinte.

Medições espectrais

Todas as determinações espectrofotométricas de ultravioleta-visível foram efectuadas a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ utilizando um espectrofotómetro de duplo feixe da marca Unicam, modelo UV2-100452, equipado com um acessório de controlo de temperatura por circulação de água termostaticada. A largura da fenda utilizada foi de 2 nm e usaram-se cubas de quartzo com um percurso óptico de 1 cm .

2.4 SISTEMA AUTOMÁTICO DE TITULAÇÃO

Titulação ácido forte/base forte

Para a calibração do eléctrodo de vidro, o método mais vulgar é o uso de soluções tampão com valores de pH fixados em função da actividade das espécies. Todavia, a eficácia deste método não é satisfatória para a determinação de constantes de equilíbrio, na medida em que mesmo que se assuma uma expressão matemática que permita relacionar o pH definido e a actividade do catião hidrogénio num tampão, será sempre difícil relacioná-los correctamente com a concentração de catião hidrogénio de uma solução amostra, como a que é utilizada na determinação de constantes de acidez. A utilização de soluções tampão de concentração com força iónica ajustada,⁵⁶ pode ser uma alternativa mas tem o inconveniente de necessitar de valores de coeficientes de actividade do catião hidrogénio, o que obrigaria à sua determinação em cada caso específico.

Assim, neste trabalho optou-se por utilizar uma titulação ácido forte/base forte que permite a obtenção dos parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro na mesma matriz que as soluções em estudo, evitando os erros provenientes da diferença da composição iónica das soluções.

Constituição do sistema

O sistema automático de titulação utilizado foi constituído por uma bureta automática de pistão da marca Crison 2031 e por um decimilivoltímetro Crison 2002, ambos controlados por um micro-computador ao qual estão ligados através de interfaces RS-232. A seringa de vidro aplicada à bureta foi da marca Hamilton (êmbolo de 2,5 ml). Todas as medições realizadas no sistema foram efectuadas sob atmosfera inerte e a temperatura constante como descrito anteriormente.

O programa de controlo e aquisição de dados deste sistema (elaborado no Laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia do Porto) permite o domínio de 14 variáveis tornando assim possível a utilização do sistema não só em tarefas de rotina mas também na obtenção de constantes de equilíbrio, podendo o sistema ser utilizado em qualquer titulação potenciométrica, desde que se utilizem titulantes e eléctrodos adequados.

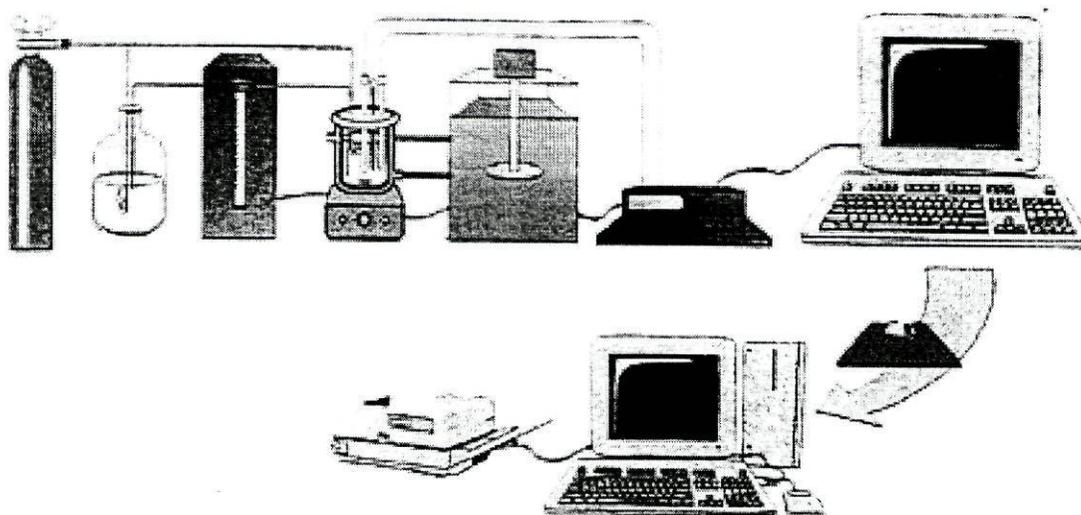


Figura 2.1- Esquema do sistema automático de titulação⁵⁷

Programa de controlo e aquisição de dados

O programa de controlo e aquisição de dados permite a escolha de dois tipos de titulação (dinâmica ou monotónica) e de outros parâmetros como se ilustra na figura 2.2.

Numa titulação dinâmica a adição de volumes é controlada automaticamente (após a adição inicial ter sido fixada), sendo essa adição inversamente proporcional ao declive da curva de titulação. Numa titulação monotónica a primeira adição também é fixada, no entanto as restantes são sempre constantes (iguais à primeira).

Em todas as titulações é introduzido um tempo de espera constante após a adição de titulante e antes da leitura do potencial. Cada leitura do potencial só é aceite se a diferença entre as várias leituras de um dado ponto experimental for inferior ao critério de estabilidade do eléctrodo (outro parâmetro previamente fixo) e só depois de uma medição ter sido aceite é que é adicionado uma nova quantidade de titulante.

À medida que ocorre o ensaio experimental, visualiza-se no monitor os parâmetros previamente fixados e a curva de titulação, o que permite a detecção imediata de qualquer anomalia (como por exemplo, a presença de carbonato).

O fim da titulação pode ser controlado quer fixando o volume máximo de titulante quer fixando um determinado valor máximo ou mínimo de potencial admitido.

Quando a titulação termina, os resultados obtidos são automaticamente armazenados e o tratamento dos resultados experimentais é efectuado com um programa de regressão linear, escrito em linguagem BASIC, que permite a obtenção dos parâmetros de calibração do

sistema pelo método de Gran e pela equação de Nernst. O volume equivalente é determinado pelo método de Gran e pelo método da segunda derivada.

A qualidade das leituras da diferença de potencial é condicionada pelo tempo de espera entre uma adição de volume e a leitura da diferença de potencial, e ainda pelo número de leituras feitas com um critério de estabilidade fixado previamente (foi admitida uma diferença de 0,1 mV entre as duas leituras). Estes parâmetros minimizam os problemas relacionados com a estabilidade do eléctrodo e com a homogeneização do meio e permitem também ajustar as condições ao tipo de eléctrodos utilizados e soluções em estudo.

Neste trabalho tornou-se necessário ajustar os referidos parâmetros, uma vez que se verificou que eram diferentes em meio micelar relativamente ao meio aquoso. Para permitir a estabilização do eléctrodo de vidro, nas soluções aquosas a espera após adição foi de 5 segundos e nas soluções de surfactante foi de 15 segundos.

Para o ajuste de pH das várias soluções em estudo utilizaram-se sempre os parâmetros de calibração do eléctrodo obtidos pelo ramo ácido do método de Gran.

Lista de opções de entrada

- 1-Volume de amostra (cm³)**
- 2-Conc. de titulante (M)**
- 3-Volume da bureta (cm³)**
- 4-Comutador (S/N)**
- 5-Número de ESI**
- 6-Adições fixas ou variáveis (F/V)**
- 7-Incremento de adições**
- 8-Volume total de titulante**
- 9-Potencial final**
- 10-Número de leituras**
- 11-Critério de estabilidade (mV)**
- 12-Espera após adição (s)**
- 13-Adição inicial (cm³)**
- 14-Filtro (%)**

Figura 2.2- Lista de opções de entrada do programa de controlo e aquisição de dados

2.5 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

Condições experimentais

A calibração do sistema foi sempre efectuada em função da concentração de catião hidrogénio, por titulação de soluções de ácido forte ($\text{HCl} = 0,001 \text{ M}$) com base forte ($0,01 \text{ M} \leq \text{NaOH} \leq 0,03 \text{ M}$), tendo sido sempre realizadas duas titulações, uma em água para detectar possíveis impurezas como a de carbonato e a outra em solução aquosa de surfactante com a concentração em estudo e a uma força iónica de $0,1 \text{ M}$ em NaCl , para obter os parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro.

Todas as titulações foram realizadas à temperatura de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e em atmosfera inerte de árgon, numa célula do tipo



Para a qual o potencial é dado pela expressão

$$E = K_1 + K_2 \log c_{\text{H}^+} + K_2 \log \gamma_{\text{H}^+}$$

Em que K_1 inclui o potencial normal e o potencial da junção líquida e $K_2 = 2,303RT/F$. R é a constante dos gases reais, T a temperatura e F a constante de Faraday. Uma vez que a força iónica é mantida constante, $K_2 \log \gamma_{\text{H}^+}$ também é constante pelo que

$$E = K_1 + K_2 \log c_{\text{H}^+}$$

Os parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro (K_1 e K_2) foram obtidos pelo método de Gran e pela linearização da equação de Nernst.

Para a obtenção de resultados mais precisos teve-se em consideração alguns aspectos:

- A capacidade de um eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio detectar variações de concentração deste ião depende da hidratação da membrana de vidro, que permite a ocorrência do processo de troca iónica.

Para soluções não aquosas, o equilíbrio de troca iónica entre os iões em solução e os iões da membrana de vidro pode estabelecer-se lentamente provocando uma resposta lenta do eléctrodo.

Assim, todas as medições efectuadas em meio micelar foram intercaladas com lavagens do eléctrodo com água desionizada, para evitar “secar” o eléctrodo por desidratação e permitir a continuação da detecção por parte deste da variação da concentração de catião hidrogénio⁵⁸.

- O eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio tem a particularidade de não poder ser utilizado para valores de pH muito ácidos ou muito alcalinos devido ao aparecimento de interferências, como por exemplo a surgida numa solução de NaOH a pH 13 em que a concentração de catião hidrogénio é tão pequena que o eléctrodo também responde ao catião sódio apesar do coeficiente de selectividade para este ser pequeno⁴⁹.
- Para evitar um valor elevado de potencial de junção, cujo aparecimento é normal quando soluções aquosas de referência são colocadas em meios não aquosos, o que iria originar leituras instáveis e obrigaria a um maior tempo de estabilização, utilizou-se uma dupla junção contendo NaCl 0,1M, ou seja uma matriz idêntica à da amostra para minimizar a difusão da solução⁵⁹.
- Todas as soluções utilizadas tinham uma força iónica ajustada a 0,1M em NaCl, uma vez que a *Interunion Commission on Biothermodynamics*⁶⁰ sugere que as determinações de constantes de equilíbrio sejam efectuadas a uma força iónica constante, porque a maior parte das reacções de equilíbrio com interesse prático, seja na área de saúde ou noutra, ocorrem sempre na presença de uma determinada quantidade de electrólito(s) inerte(s).

Método de Gran

O método de Gran⁶¹ é muito utilizado na determinação do ponto de equivalência nos vários tipos de titulações potenciométricas, especialmente no caso de ácidos e bases.

Este método lineariza a curva de titulação e consiste na representação gráfica de duas funções (2.1) e (2.2), que dependem do potencial medido, em função do volume de titulante adicionado.

Da representação gráfica resultam duas semi-rectas que se intersectam no eixo das abcissas no ponto $V = V_e$, em que V_e significa o volume de titulante no ponto de equivalência.

Numa titulação ácido forte/base forte, para qualquer valor de volume adicionado antes do ponto de equivalência, isto é, para a zona ácida, se o potencial for medido directamente pode ser definida a função,

$$F_{ac} = (V_0 + V) 10^{EF/2,303RT} = C_b (V_e - V) 10^{KF/2,303RT} \quad (2.1)$$

em que,

V_0 - representa o volume inicial de solução

V - representa o volume adicionado em cada ponto de titulação

V_e - representa o volume equivalente

E - representa a f.e.m em cada ponto

F - representa a constante de Faraday

R - representa a constante do gases perfeitos

T - representa a temperatura

K - representa o potencial normal

A representação gráfica de $F_{ac} = f(V)$ permite determinar o declive da recta $B = C_b 10^{KF/2,303RT}$ e a ordenada na origem $A = -V_e 10^{KF/2,303RT}$. O volume equivalente pode ser calculado através da expressão $V_e = -A/B$ e a concentração da base por $C_b = C_a V_0/V_e$, independentemente do valor do declive de Nernst e do potencial normal K , sendo C_a a concentração de ácido forte (titulado).

Depois do ponto de equivalência, na zona alcalina ou básica, a função definida é a seguinte,

$$F_{ba} = (V_o + V) 10^{\frac{EF}{2,303RT}} = (C_b/K_{ag}) (V - V_e) 10^{\frac{KF}{2,303RT}} \quad (2.2)$$

em que $V_e = -A/B$, sendo A a ordenada de origem e B o declive na zona alcalina.

Como $B = C_b/K_{ag} 10^{(-K_1/QF)}$, então pode-se calcular o valor operacional do produto iónico da água ($K_{ag} = C_b 10^{(K_1/QF)}/B$) assumindo que o valor de K_1 na zona alcalina é igual ao da zona ácida.

Este método tem muitas vantagens. É mais preciso que o método da segunda derivada, especialmente quando a curva de titulação não é simétrica. As medições efectuadas são mais rápidas e simples uma vez que não requer volumes de titulante (V) perto do ponto de equivalência, não existindo tão pouco a necessidade de alcançar esse ponto de forma a ser obtida uma boa estimativa para o valor de volume equivalente. Assim, pode-se minimizar o tempo de execução experimental, por utilização de titulações monotónicas em detrimento das dinâmicas muito morosas. Permite avaliar o comportamento do eléctrodo de vidro utilizado através dos parâmetros de calibração e da diferença de volumes equivalentes calculados para a zona ácida e para zona alcalina, controlando-se deste modo a sua «degradação» ao longo do tempo. Tem ainda a vantagem de permitir detectar a presença de várias impurezas como a de carbonato nas soluções alcalinas.^{8,62}

Detecção de CO_3^{2-}

A verificação da ausência de carbonato nas soluções de hidróxido de sódio usadas foi sempre efectuada pela utilização conjunta do método de Gran, método tradicionalmente usado, e pela representação gráfica da primeira derivada obtida com o programa de controlo do sistema de titulação.

O recurso aos dois métodos deve-se ao facto de se verificar que o controlo da percentagem de carbonato nas soluções a analisar usando apenas o método de Gran não permite verificar a ausência ou presença de carbonato, uma vez que as diferenças de volume equivalente obtidas pelo método de Gran para a zona ácida e para a zona alcalina podem não ser provocadas pela presença de carbonato mas sim devidas aos eléctrodos usados.

Gameiro *et al.*⁶² verificaram que o método da primeira derivada e o método de Gran conduziam aos mesmos resultados quando a concentração de ácido forte estava compreendida entre $5,0 \times 10^{-3}$ M e $1,0 \times 10^{-2}$ M em HCl; no entanto, quando a concentração de ácido

clorídrico era $1,0 \times 10^{-3}$ M, como a utilizada neste trabalho, os dois métodos nem sempre eram concordantes. Observaram ainda que mesmo para soluções de hidróxido preparadas recentemente, e para as quais o método da primeira derivada mostrava a inexistência de carbonato, os volumes equivalentes obtidos pelo ramo básico do método de Gran variavam com o eléctrodo usado.

Assim, quando se pretende detectar a presença de carbonato numa solução alcalina deve-se recorrer aos dois métodos, uma vez que permite de uma forma mais conclusiva detectar ou não a sua presença, desde que os ensaios sejam realizados em condições experimentais adequadas. Para esse efeito é necessário obter experimentalmente muitos valores de potencial junto ao ponto de equivalência, o que é facilmente alcançado se for realizada uma titulação com adição de volumes de titulante variáveis. Testar a presença de carbonato numa solução alcalina a partir de uma titulação com incrementos constantes de volume de titulante pode não permitir detectar a existência dos dois pontos de inflexão, característico das soluções carbonatadas, como se irá verificar mais adiante.

O recurso à 1ª derivada e não à curva de titulação deve-se ao facto de nesta a identificação directa do ponto final ser susceptível de grande erro, já que, na zona do ponto de equivalência a curva é quase rectilínea, e o volume identificado pode, por isso, afastar-se muito do volume equivalente.⁶³

Na 1ª derivada da curva de titulação, o ponto de equivalência é o mínimo da curva (devido ao potencial decrescer com o volume de titulante). A curva apresenta praticamente uma assíntota vertical passando pelo ponto de equivalência (fig. 2.3.b).

Por seu lado, a 2ª derivada da curva de titulação passa no ponto de equivalência de um valor negativo muito baixo a um valor positivo muito elevado (fig. 2.3.c).

A presença de carbonato traduz-se por dois pontos de inflexão (máximos ou mínimos) quando se usa o método da 1ª e 2ª derivadas no cálculo de volume equivalente.

Na figura 2.3 encontra-se representada a curva de titulação (A) e as respectivas 1ª derivada (B) e 2ª derivada (C) para uma titulação de 20 ml de HCl $1,0 \times 10^{-3}$ M com NaOH isento de carbonato.

Na figura 2.4 são apresentadas, respectivamente as representações gráficas da função $E=f(V)$ (A), de $dE/dV=f(V)$ (B) e de $d^2E/dV^2=f(V)$ (C) de uma titulação de 20 ml de HCl $1,0 \times 10^{-3}$ M com NaOH contendo carbonato.

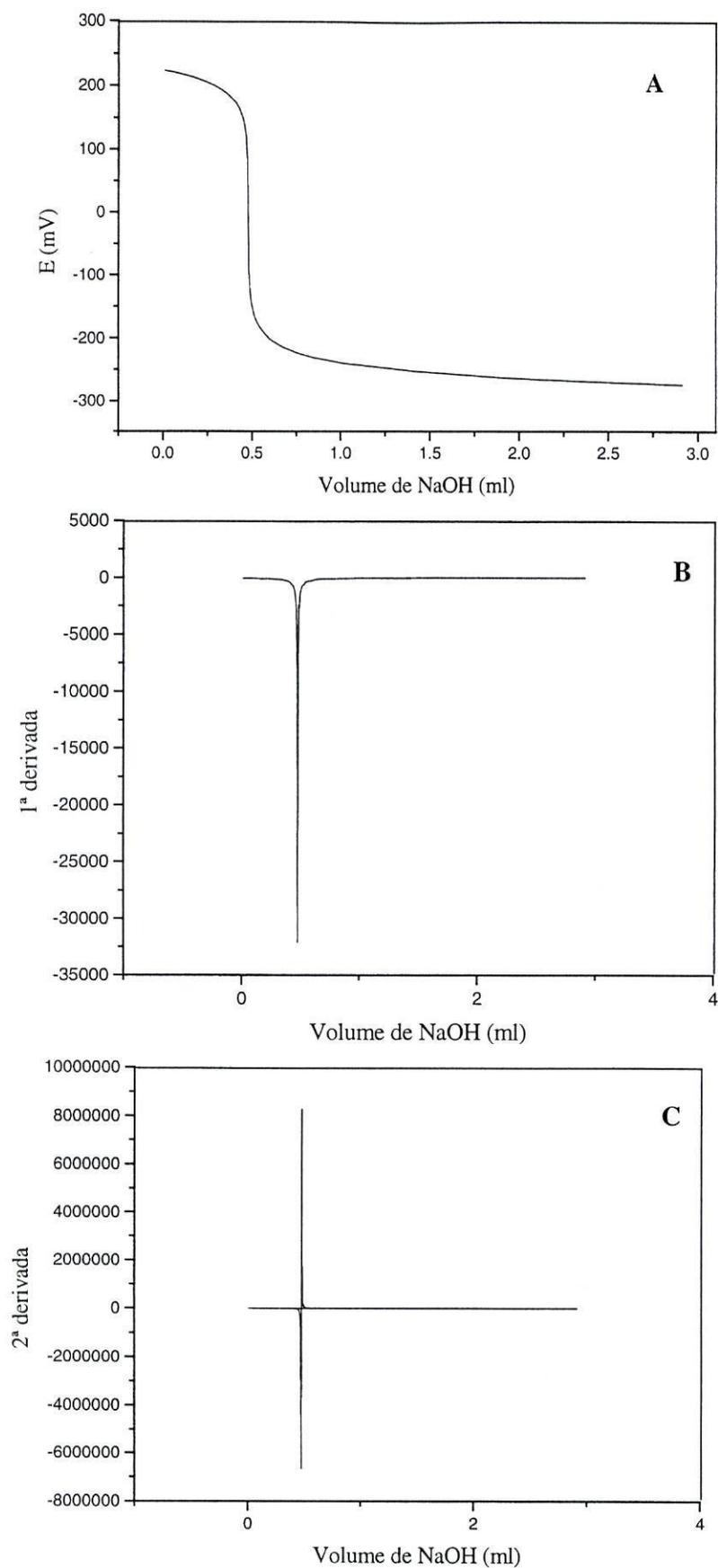


Figura 2.3- Representação gráfica de A) $E=f(V)$, B) $dE/dV=f(V)$ e C) $d^2E/dV^2=f(V)$ de uma titulação de 20 ml de HCl $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ com NaOH isento de carbonato

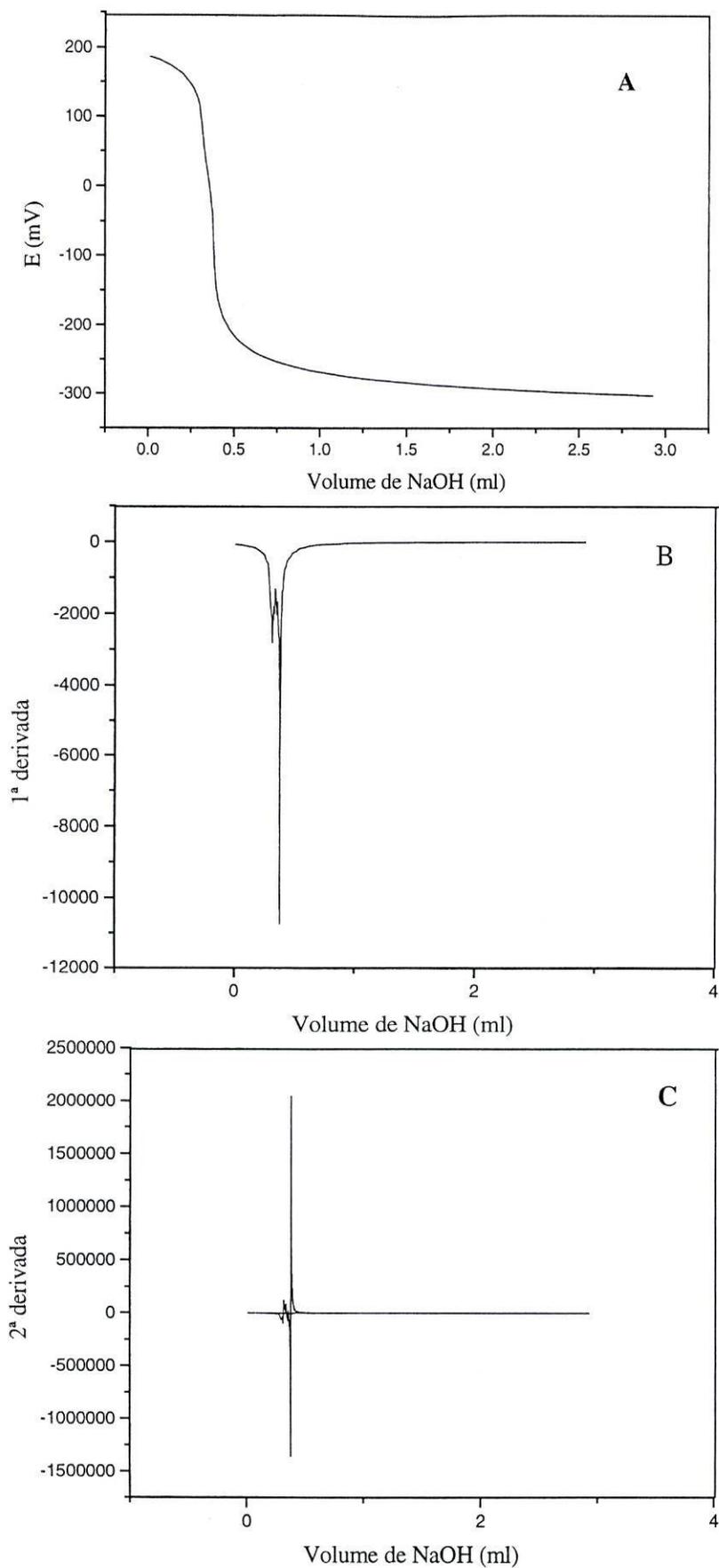


Figura 2.4- Representação gráfica de A) $E=f(V)$, B) $dE/dV=f(V)$ e C) $d^2E/dV^2=f(V)$ de uma titulação de 20 ml de HCl $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ com NaOH contendo carbonato

2.6 MÉTODOS DE CÁLCULO UTILIZADOS

Nesta secção será feita uma descrição do programa computacional utilizado para a obtenção das constantes de acidez e o método de cálculo dos erros associados aos valores das constantes de acidez.

Programa SQUAD

Os resultados obtidos para a determinação de constantes de acidez por espectrofotometria de ultravioleta/visível foram tratados com o programa SQUAD.⁶⁴

Este programa, cujas iniciais significam **Stability Quotients from Absorbance Data**, está escrito em linguagem FORTRAN IV e foi concebido para procurar simultaneamente ou individualmente, a partir dos resultados experimentais, o melhor conjunto de constantes de estabilidade para qualquer espécie formada em solução, desde que a sua formação seja dependente do pH, podendo ao mesmo tempo calcular as absorvidades molares e as concentrações das espécies em solução.

O SQUAD, pode a partir de resultados experimentais apropriados, calcular constantes de estabilidade para complexos de fórmula geral $M_m M_e H_j L_m L_q$, onde $m, e, n, q \geq 0$ e j é positivo (para protões), negativo (para iões hidróxido) ou nulo. É, portanto, capaz de calcular constantes de acidez, constantes de hidrólise, constantes de estabilidade de complexos simples ($ML, ML_2, \text{etc.}$) e de complexos polinucleares ($M_2L_3, M_2L_2H, M_3L_4(OH)_2, \text{etc.}$).

O programa consegue lidar com: a) 50 comprimentos de onda; b) 25 espectros; c) 6 constantes de estabilidade desconhecidas, variadas simultaneamente; d) Um total de 20 constantes de estabilidade; e) O cálculo de absorvidades molares por comprimento de onda para 10 espécies; f) Um máximo de 2 metais; g) Um máximo de 2 ligandos.

Para o cálculo das constantes de equilíbrio das espécies em solução e das respectivas absorvidades molares é utilizado o método não linear de mínimos quadrados de Gauss-Newton que minimiza a função U ,

$$U = \sum_{i=1}^{NS} \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^{calc.} - A_{i,k}^{obs.})^2$$

em que, NS é o número de soluções em que é medida a absorvância $A_{i,k}$, NW é o número de comprimentos de onda seleccionados e $A_{i,k}^{calc}$ é a absorvância teórica obtida a partir da lei de Beer.

Para dar início ao programa é necessário introduzir os seguintes dados: os valores de absorvâncias, $A_{i,k}$, para cada espectro; as concentrações totais das espécies reagentes, $C_{M,i}$, $C_{L,i}$, C_{Hi} e o percurso óptico para cada espectro; as absortividades molares, $\epsilon_{i,j}$, conhecidas ou previamente determinadas; os coeficientes estequiométricos e as constantes de equilíbrio, β_j para as j espécies, com a indicação das constantes que são para refinar.

Na figura 2.5 apresenta-se um esquema geral do ficheiro de entrada deste programa, que é constituído por diferentes blocos (alguns opcionais) que se iniciam sempre com uma *Keyword* e finalizam na maior parte das vezes com *End*.

Seguidamente irão ser descritos os parâmetros que foram utilizados para a obtenção das constantes de acidez uma benzodiazepina em meio micelar:

- Secção 1: Dictionary é utilizado para nomear de forma apropriado as espécies MTL1 (o primeiro metal do complexo), MTL2 (o segundo metal do complexo), LIG1 (o primeiro ligando do complexo), LIG2 (o segundo ligando do complexo), PROT (o protão como ligando) e HYDR (o ião hidróxido como ligando).
- Secção 2: Introduzem-se os coeficientes estequiométricos de cada complexo; as estimativas iniciais dos valores das constantes; a indicação que permite saber se as constantes são para refinar ($\equiv VB$) ou se mantêm constantes ($\equiv FB$), e se as absortividades molares são para ser calculadas ($\equiv VE$) ou se são introduzidas como dado experimental ($\equiv FE$).
- Secção 3: Esta secção é opcional e permite que o programa calcule a absortividade molar de qualquer espécie não complexada. Se for esta a opção introduz-se o nome da espécie e VE.
- Secção 4: Esta secção contém um total de 10 itens, incluindo DATA, que permitem indicar, entre outras coisas, os comprimentos de onda inicial, final e os seus incrementos ; o número de iterações e o refinamento de $\log\beta$ ou de β .

- Secção 7: Nesta secção indicam-se as concentrações totais das espécies em solução, o pH, o percurso óptico e os valores de absorvâncias a todos comprimentos de onda.
- Secção 8: Assinala o fim dos espectros que vão ser utilizados para cálculo da constante. Os resultados experimentais colocados depois de -1.0 não serão levados em conta no cálculo.

Título	
Subtítulo	
DICTIONARY:	
	Secção 1
END:	
SPECIES:	
	Secção 2
END:	
OTHER:	
	Secção 3
END:	
DATA:	
	Secção 4
MOL. ABS.:	
	Secção 5
END:	
BASELINE:	
	Secção 6
SPECTRA:	
	Secção 7
-1.0	Secção 8

Figura2.5- Esquema geral do ficheiro de entrada do SQUAD

Como exemplo, apresentam-se na figura 2.6 as primeiras quatro secções do ficheiro de entrada utilizado neste trabalho para a obtenção da constante de acidez de uma benzodiazepina (CLDZ).em meio micelar (Triton X-100).

```

Título
Subtítulo
DICTIONARY:
LIG1 = cldz; PROT = H:
END:
SPECIES:
Cldz (1) H (1); 4.19; VB; VE:
END:
OTHER:
Cldz; VE:
END:
DATA:
300.0      500.0      5.00
LOGB
PRIN
NOCD
MR
NOPL
PAGE
20
1.0

```

Figura 2.6- Exemplo de um ficheiro de entrada utilizado neste trabalho

Na figura 2.7 encontra-se representado um diagrama simplificado do SQUAD que mostra as várias etapas do programa, indicando a sua interrelação, seguindo-se uma descrição breve do *modus operandi* do SQUAD, não com o objectivo de apresentar a teoria matemática por detrás de cada subrotina mas sim indicar a sua utilidade para o programa. Uma descrição mais pormenorizada é fornecida por Leggett *et al.*⁶⁵

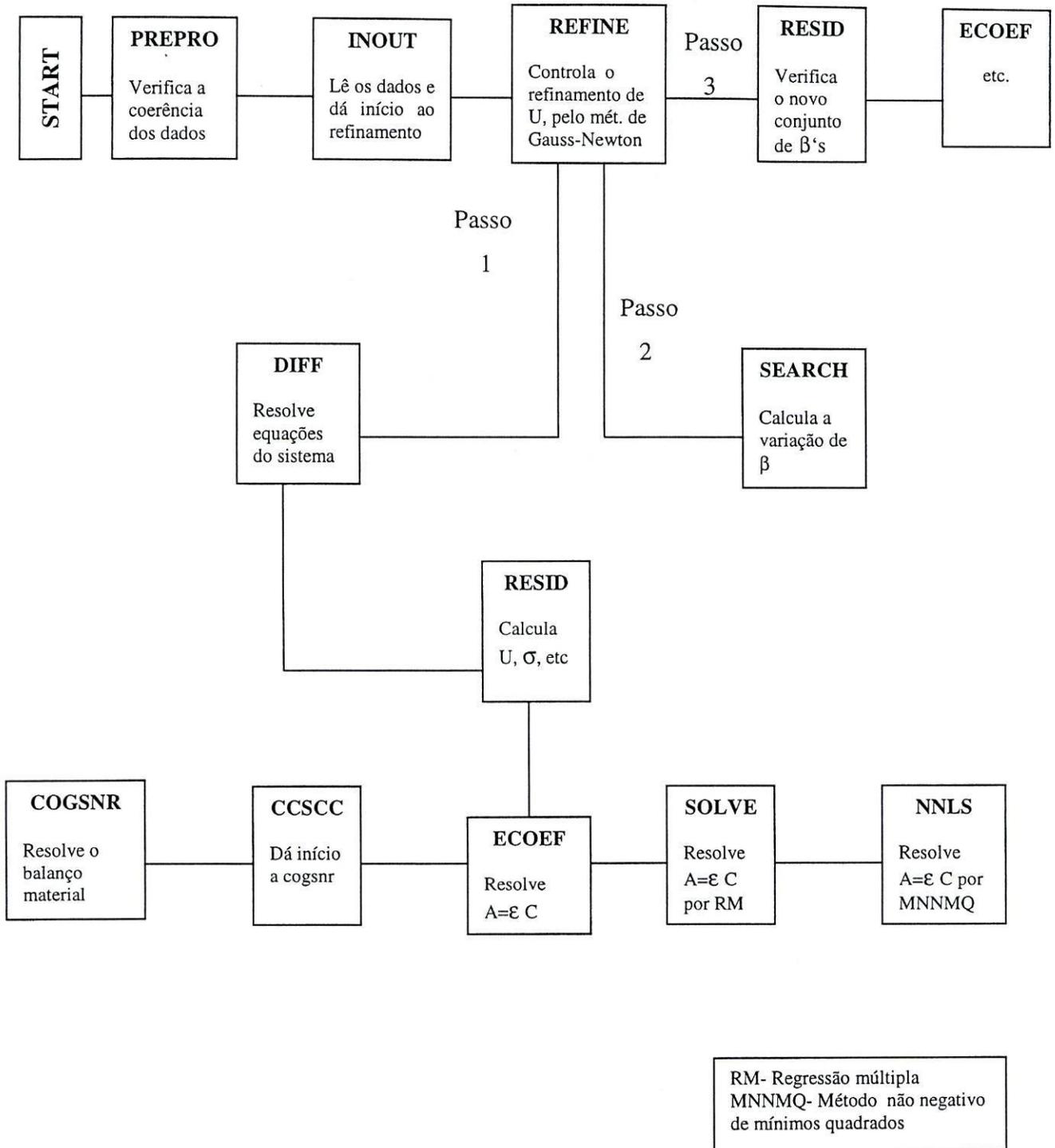


Figura 2.7- Diagrama simplificado do SQUAD.

A subrotina PREPRO verifica a coerência dos dados introduzidos, e caso existam erros, surgem mensagens que os identificam.

A subrotina INOUT lê os dados, dá início ao refinamento e controla a saída dos resultados.

A subrotina REFINE controla a minimização da função U em três passos: DIFF, SEARCH e RESID.

A subrotina DIFF constrói as equações não lineares com base na resolução de U efectuada em REFINE e consiste na resolução das equações dos balanços materiais com base nos valores introduzidos para $C_{M,i}$, $C_{L,i}$, $C_{H,i}$, e b_j , fornecendo a concentração das espécies (efectuada pelas subrotinas CCSCC e COGSNR), seguida pela resolução do conjunto de equações lineares $A_{i,j} = [\text{espécies}]_{i,j} C_{i,j} b_j$ derivadas da Lei de Beer (efectuada pela subrotina SOLVE, caso a opção seja o método de regressão múltipla ou pela subrotina NNLS caso a opção seja o método não negativo de mínimos quadrados).

A subrotina SEARCH resolve as equações de mínimos quadrados e fornece o conjunto de valores de que as constantes de equilíbrio a determinar devem ser variadas, $\Delta\beta$, de modo que U seja minimizado.

A subrotina RESID verifica o novo conjunto de constantes de equilíbrio, efectuando a mesma sequência de passos a partir de ECOEF.

Quando $\Delta\beta < 0,01$ o processo de minimização é finalizado. A qualidade dos resultados obtidos pode ser avaliada pelos erros que o programa calcula, σ_{DATA} , σ_{CONST} e σ_{SPECT} , que são, respectivamente, o desvio padrão dos dados de absorvância, que mede a qualidade do ajuste do modelo proposto aos dados experimentais, o desvio padrão associado a cada constante refinada e o desvio padrão associado a cada espectro.

Erros

Os valores médios e os erros associados às constantes de acidez foram determinados utilizando o método de Adrien Albert e E.P.Serjeant⁵⁰: o valor médio é calculado encontrando o antilogaritmo de cada pK_{app} e aplicando o logaritmo à média destes; para o valor do erro associado à constante é considerada a diferença máxima entre o pK_{app} médio e um valor de pK_{app} determinado experimentalmente.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos no estudo do comportamento da benzodiazepina *clorodiazepóxido* em soluções micelares de SDS, Triton X-100 e CTAB.

A sequência seguida na apresentação dos resultados coincide com a seguida experimentalmente, isto é, inicia-se pela apresentação dos espectros da benzodiazepina em solução aquosa e em soluções micelares dos três surfactantes, utilizando concentrações abaixo e acima da cmc (3.1), segue-se a apresentação dos resultados obtidos no estudo das propriedades ácido/base em soluções micelares acima da cmc, nomeadamente na determinação dos valores de pK_{app} (3.2) e o respectivo tratamento matemático (3.3). Termina-se com a apresentação do estudo efectuado da solubilidade do CLDZ nos diferentes meios mencionados (3.4).

3.1 ESPECTROS DO CLDZ EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE SURFACTANTES NAS FORMAS MONOMÉRICA E MICELAR

A alteração do espectro ultravioleta/visível ocorrida ao passar de um meio aquoso para um meio micelar está relacionada com a mudança do microambiente da espécie absorvente.

Nessa medida, a espectrofotometria de ultravioleta/visível é uma técnica que pode ser utilizada para detectar possíveis interações do *clorodiazepóxido* em meio micelar, tendo sido com esse objectivo que se iniciou o trabalho experimental desta dissertação por esta etapa.

Execução experimental

Foram traçados os espectros das soluções de CLDZ ($\approx 5,0 \times 10^{-5}$ M) em solução aquosa e em soluções dos surfactantes SDS, Triton X-100 e CTAB. Todas as soluções tinham força iónica ajustada a 0,1 M em NaCl e pH fixo (pH=3 ou pH=9).

O ajuste de pH das várias soluções em estudo foi efectuado por adição de quantidades vestigiais de ácido forte ou base forte às soluções amostra de modo a que a quantidade de volume adicionado fosse desprezável.

Os parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro, necessários para o ajuste de pH, foram obtidos por titulação de ácido forte/base forte. A calibração do sistema de titulação, foi realizada como descrito no capítulo 2. O procedimento seguido para as determinações espectrofotométricas de ultravioleta/visível encontra-se igualmente descrito no capítulo da metodologia.

Utilizaram-se concentrações de SDS ($4,0 \times 10^{-4}$, $8,0 \times 10^{-4}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ M), Triton X-100 ($5,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $7,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ M) e CTAB ($4,0 \times 10^{-4}$, $7,0 \times 10^{-4}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $7,0 \times 10^{-3}$ M) acima e abaixo da concentração micelar crítica (cmc).

Os valores das cmc dos três surfactantes foram retirados da bibliografia e encontram-se apresentados na tabela 3.1.1.

Tabela 3.1.1- Valores das concentrações micelares críticas para os surfactantes sintéticos utilizados neste trabalho

Surfactante	Concentração micelar crítica (mol dm ⁻³)	Referência
SDS	1,4 x 10 ⁻³	14
Triton X-100	2,0 x 10 ⁻⁴	14
CTAB	0,9 x 10 ⁻³	16

Zona espectral abrangida

Ao escolher-se um solvente deve ter-se em consideração a sua transparência na zona de comprimentos de onda em estudo. Nessa medida foi feito um estudo prévio do comportamento espectrofotométrico dos três surfactantes a analisar, com o objectivo de seleccionar a zona espectral onde não há absorção de radiação, de modo a não interferir com o espectro do CLDZ.

Como se pode verificar na figura 3.1.1, os três surfactantes apresentam espectros diferentes o que implicou que a zona espectral escolhida para o estudo espectrofotométrico do *clorodiazepóxido* variasse consoante o surfactante em estudo.

Assim, as absorvâncias foram registadas de 1 em 1 nm, nos seguintes intervalos de comprimentos de onda: em SDS de 200 a 500 nm, em Triton X-100 de 300 a 500 nm e em CTAB de 225 a 500 nm.

Resultados Obtidos e sua Discussão

Como já foi referido no prefácio, o trabalho experimental desta dissertação surge como seguimento do trabalho realizado durante o seminário de licenciatura, no qual foi efectuado o estudo espectral do CLDZ em SDS. No entanto, apesar destes resultados já se encontrarem publicados, optou-se por apresentar os espectros, devido ao interesse em comparar estes resultados com os obtidos com os restantes surfactantes.

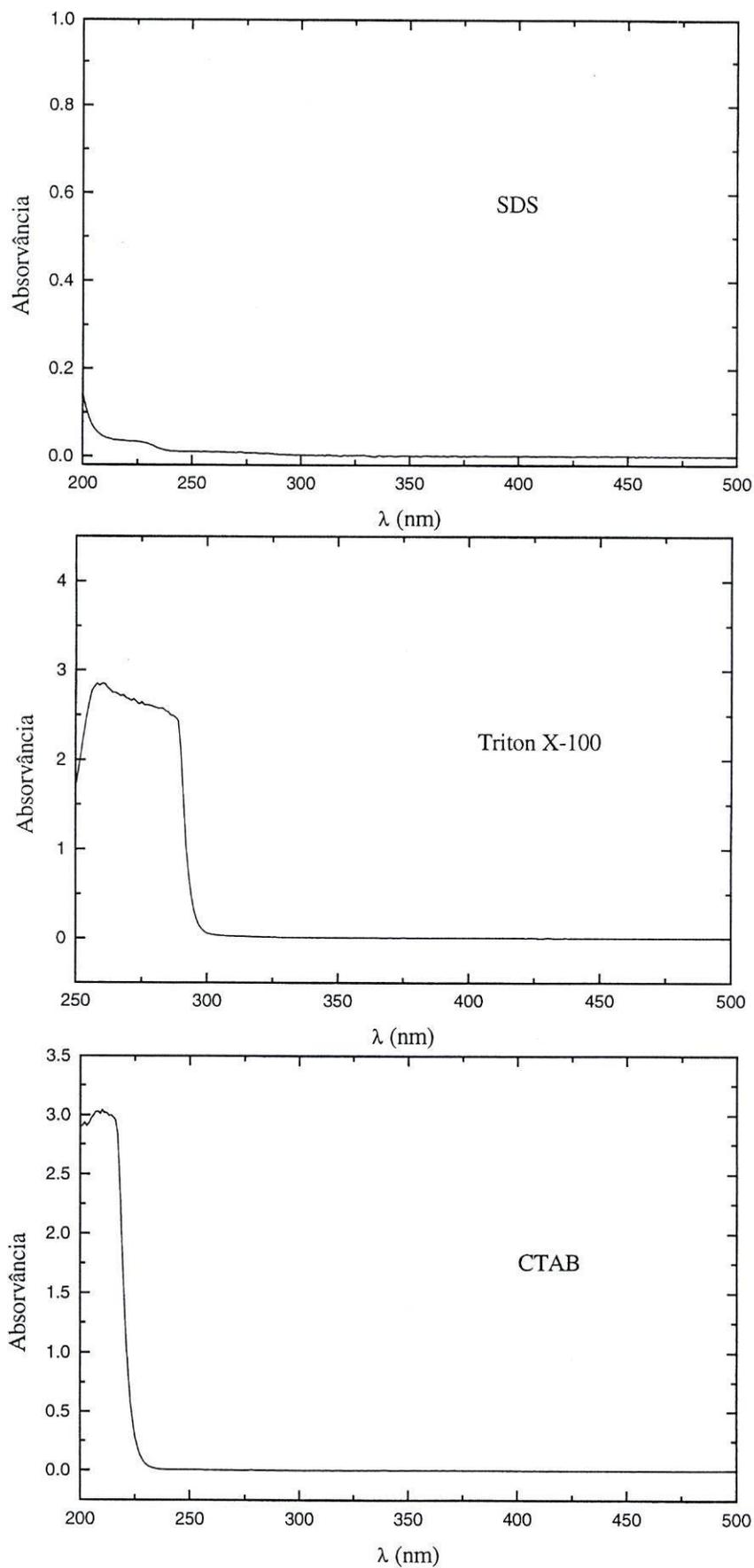


Figura 3.1.1- Espectros dos surfactantes sintéticos SDS, Triton X-100 e CTAB 0,01M .

A) CLDZ em SDS

Os espectros do *clordiazepóxido* no meio micelar aniônico SDS, obtidos a pH controlado, encontram-se representados nas figuras 3.1.2 e 3.1.3.

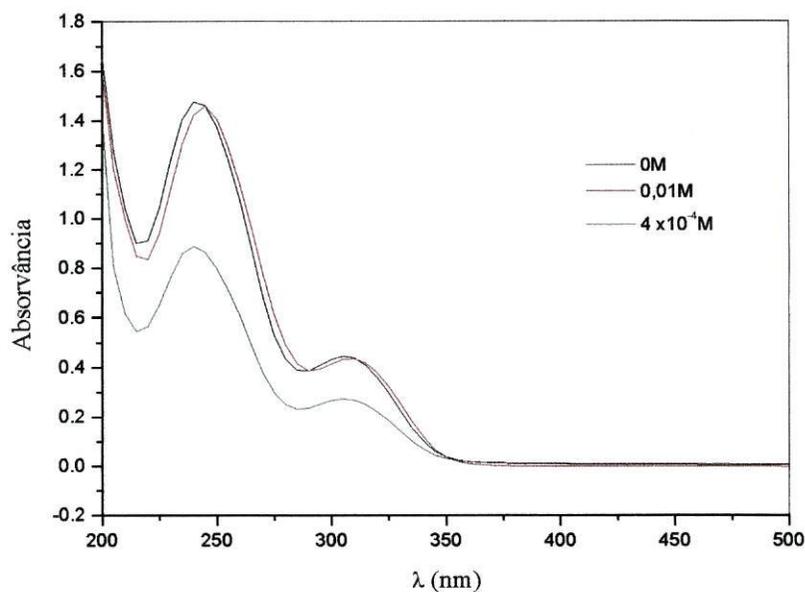


Figura 3.1.2- Espectro do CLDZ em água (preto), em SDS acima da cmc (vermelho) e em SDS abaixo da cmc, (verde) a pH = 3.

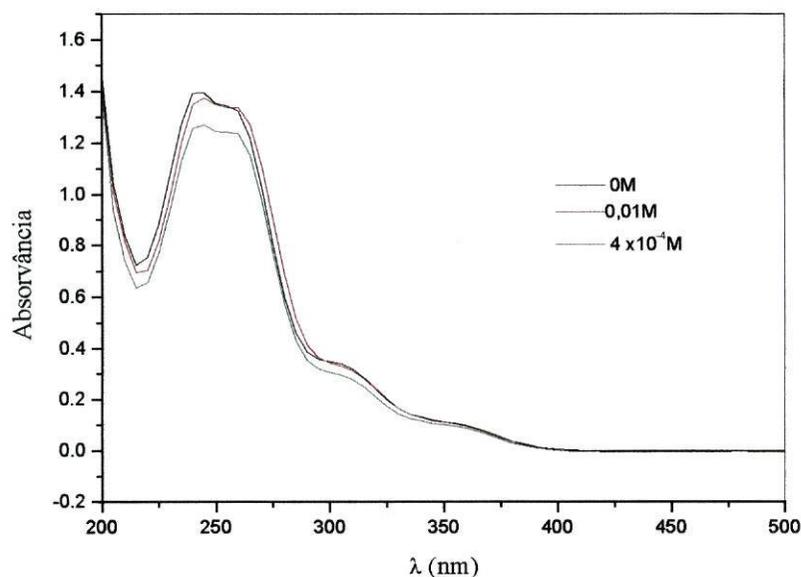


Figura 3.1.3- Espectro do CLDZ em água (preto), em SDS acima da cmc (vermelho) e em SDS abaixo da cmc (verde), a pH = 9.

Verificou-se que o CLDZ em soluções de SDS de concentração superior à cmc apresenta uma absorvância semelhante à da solução aquosa. Contudo, em soluções de SDS de concentração inferior à cmc a absorvância devida ao CLDZ diminui significativamente o que é devido provavelmente ao aparecimento de uma nova espécie *clorodiazepóxido*-monómero de SDS.

De forma a estudar qual a interacção possível, obteve-se os espectros do CLDZ em soluções de SDS de concentração inferior à cmc e de pH ajustado a dois valores distintos designadamente pH=3 e pH=9, correspondendo à existência em solução de *clorodiazepóxido* respectivamente na forma protonada e na forma neutra.

Nestes estudos observou-se que para soluções de SDS com concentração inferior à cmc a pH=3, existe uma diminuição significativa das absorvâncias relativamente às obtidas em solução aquosa, enquanto que para soluções alcalinas apenas se observa uma ligeira diminuição. Em relação às soluções de SDS com concentração superior à cmc, as absorvâncias são semelhantes às obtidas em solução aquosa com o mesmo pH.

Assim, conclui-se que existe uma interacção que ocorre entre a forma protonada do CLDZ e os monómeros de SDS.

B) CLDZ em Triton X-100

Os espectros obtidos a pH controlado do *clorodiazepóxido* no meio micelar neutro Triton X-100, encontram-se representados nas figuras 3.1.4 e 3.1.5.

Analisando os espectros verifica-se que quer a pH ácido quer a pH básico, a absorvância molar das soluções de CLDZ em Triton X-100 é sempre superior à da solução aquosa de CLDZ. De salientar ainda, que devido à gama limitada de comprimentos de onda com que é possível obter espectros com este surfactante, há apenas um comprimento de onda máximo (308 nm) a registar para a espécie protonada do CLDZ (HCLDZ^+) e o valor da respectiva absorvância molar é $9,5 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$.

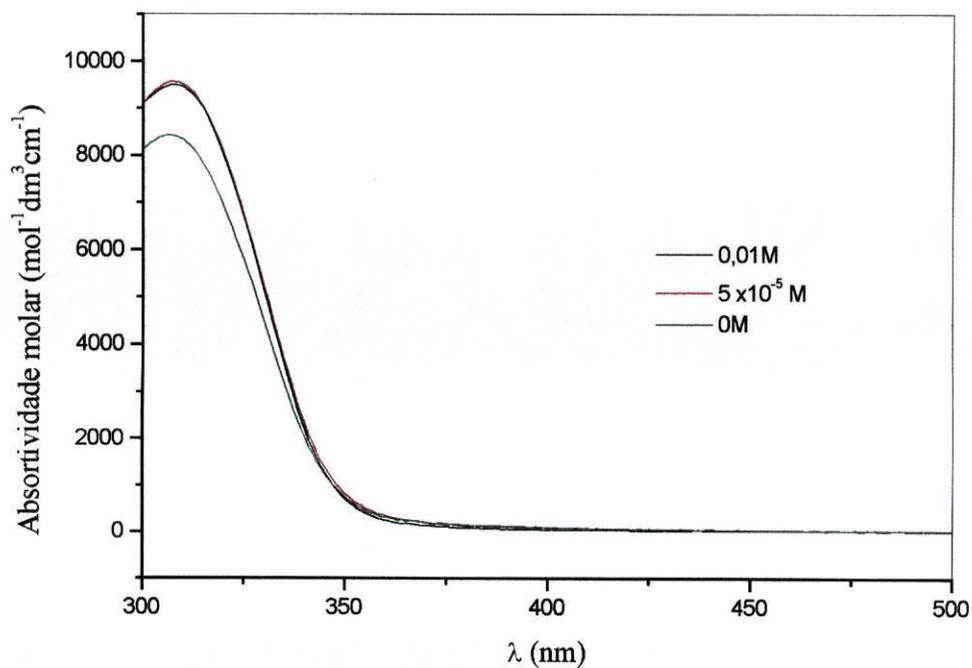


Figura 3.1.4- Espectro do CLDZ em água (verde), em Triton X-100 abaixo da cmc (vermelho) e em Triton X-100 acima da cmc (preto), a pH = 3.

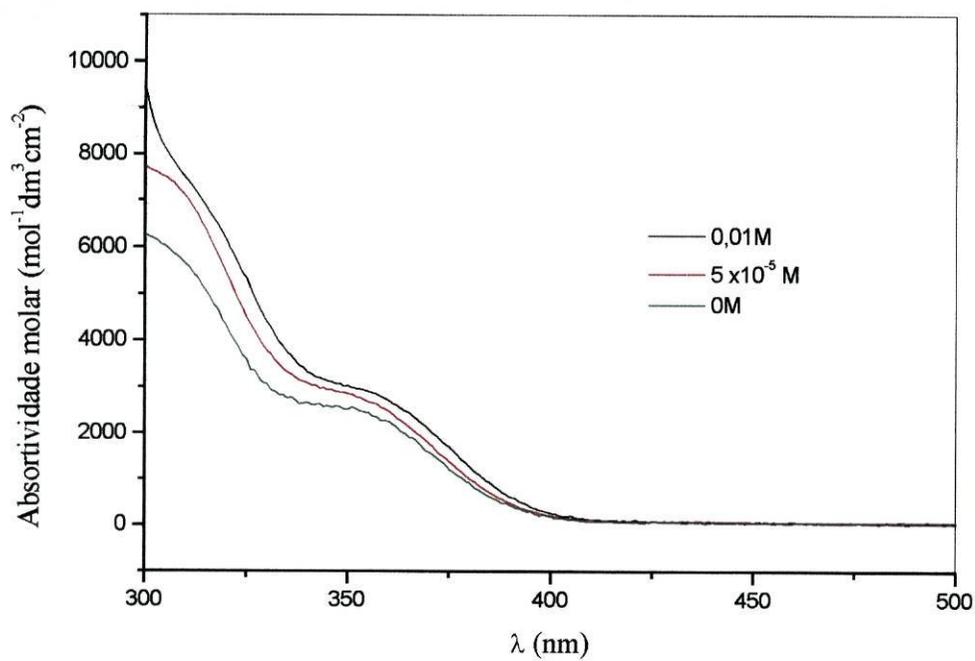


Figura 3.1.5- Espectro do CLDZ em água (verde), em Triton X-100 abaixo da cmc (vermelho) e em Triton X-100 acima da cmc (preto), a pH = 9.

C) CLDZ em CTAB

Foram obtidos os espectros a pH ácido e a pH básico do CLDZ em CTAB a concentrações abaixo ($4,0 \times 10^{-4}$, $7,0 \times 10^{-4}$ M) e acima ($4,0 \times 10^{-3}$, $7,0 \times 10^{-3}$ M) da cmc. Os resultados podem ser observados nas figuras 3.1.6 e 3.1.7, respectivamente.

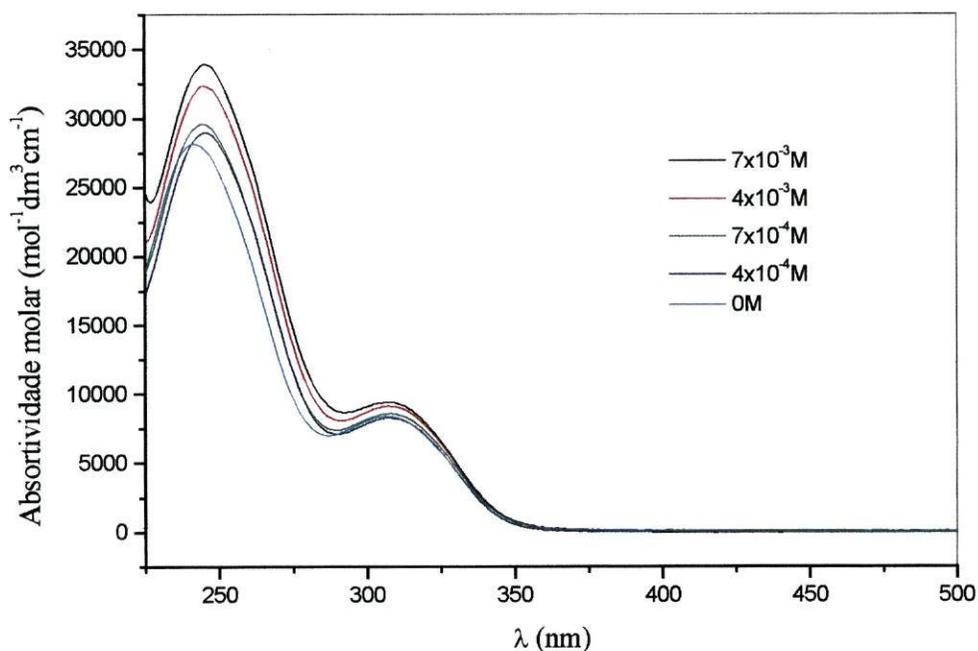


Figura 3.1.6- Espectro de CLDZ em solução aquosa e em soluções de CTAB abaixo e acima da cmc, a pH=3.

Verifica-se que para soluções ácidas o valor da absorvância molar do CLDZ aumenta com o aumento da quantidade de CTAB e que o comprimento de onda de absorvância molar máxima é deslocado ao passar da solução aquosa para as soluções de CTAB abaixo e acima da cmc. Os valores de comprimento de onda máximo e absorvância molar da forma protonada de CLDZ em função da concentração de CTAB, encontram-se registados na tabela 3.1.2.

Tabela 3.1.2- Comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) e absorptividades molares (ϵ) da espécie protonada do *clorodiazepóxido* (HCLDZ⁺) em CTAB

Concentração de CTAB (M)	1º λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	2º λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
0	242	2,8	306	0,8
$4,0 \times 10^{-4}$	245	2,9	307	0,8
$7,0 \times 10^{-4}$	245	2,9	307	0,8
$4,0 \times 10^{-3}$	245	3,2	308	0,9
$7,0 \times 10^{-3}$	245	3,3	308	0,9

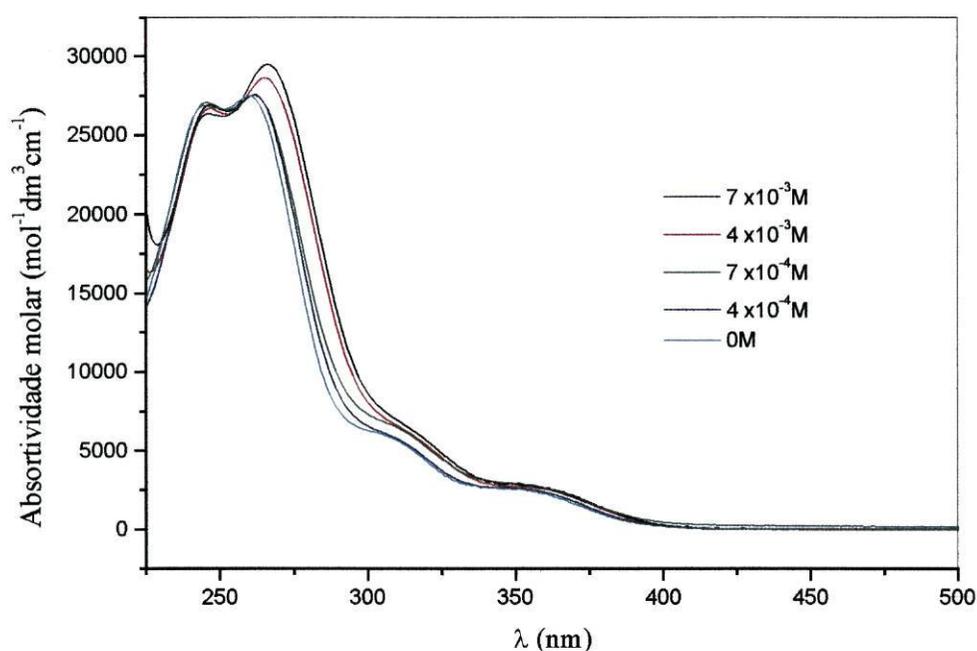


Figura 3.1.7- Espectro de CLDZ em solução aquosa e em soluções de CTAB abaixo e acima da cmc, a pH=9.

Nas soluções alcalinas a absorptividade molar de CLDZ em água é semelhante às de CLDZ em CTAB abaixo da cmc, aumentando contudo com o aumento da concentração de CTAB acima da cmc.

Comparando os espectros a pH=9, verifica-se ainda um desvio batocrômico do comprimento de onda de absorptividade molar máxima com o aumento da quantidade de CTAB em solução (resultados registados na tabela 3.1.3).

Tabela 3.1.3- Comprimento de onda máximo (λ_{\max}) e absorvidade molar (ϵ) da espécie neutra do *clorodiazepóxido* (CLDZ) em CTAB

Concentração de CTAB (M)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
0	260	2,7
$4,0 \times 10^{-4}$	262	2,7
$7,0 \times 10^{-4}$	262	2,7
$4,0 \times 10^{-3}$	265	2,8
$7,0 \times 10^{-3}$	265	2,9

Conclusões

O estudo por espectrofotometria de ultravioleta-visível do comportamento do CLDZ em soluções aquosas de SDS, Triton X-100 e CTAB, revelou que a benzodiazepina interaccua com os três surfactantes, interacção que se processa no entanto de forma distinta.

Analisando os resultados obtidos abaixo da cmc, verifica-se que no meio micelar aniónico SDS, o facto dos espectros obtidos abaixo da cmc a pH ácido exibirem uma diminuição significativa das absorvâncias relativamente às obtidas nas restantes soluções indica que existe uma interacção entre o CLDZ e os monómeros de SDS e ainda que essa interacção ocorre preferencialmente com a forma protonada da benzodiazepina (HCLDZ^+).

Relativamente aos restantes surfactantes, os espectros obtidos a pH ácido no caso do CTAB e os espectros obtidos a pH básico no caso do Triton X-100 mostram que poderá haver alguma interacção entre os monómeros destes surfactantes e o CLDZ.

Acima da cmc, observa-se um desvio batocrómico do comprimento de onda de absorvidade molar máxima nos espectros obtidos em CTAB, que poderá significar uma interacção entre o CLDZ e as micelas deste surfactante.

3.2 CONSTANTES DE ACIDEZ E ABSORTIVIDADES MOLARES DO CLORODIAZEPÓXIDO EM SISTEMAS MICELARES

A composição das diversas membranas biológicas é muito variável e como tal a biodisponibilidade de um fármaco depende de vários factores, como por exemplo do seu pK_a . Assim sendo, o conhecimento prévio deste factor e o modo como ele pode influenciar as propriedades físico-químicas de uma benzodiazepina é essencial na determinação da sua eficácia.

O objectivo deste estudo é verificar a influência de soluções micelares aniónicas (SDS), neutras (Triton X-100) e catiónicas (CTAB) nas propriedades ácido-base do *clorodiazepóxido*, para obter informação sobre a sua localização nesses meios.

Execução experimental

Para a determinação dos valores das constantes de acidez e das absortividades molares, foram traçados os espectros do *clorodiazepóxido* ($\approx 5,0 \times 10^{-5}$ M) em soluções aquosas de NaCl 0,1 M na presença dos três surfactantes sintéticos, a diferentes concentrações, utilizando-se várias soluções para cada uma das concentrações com valores de pH distintos.

Os parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro, necessários para o ajuste de pH, foram obtidos por titulação de ácido forte/base forte. A calibração do sistema de titulação, foi realizada como descrito no capítulo 2. O ajuste de pH das várias soluções em estudo foi efectuado tal como no estudo anterior.

As determinações espectrofotométricas de ultravioleta/ visível foram efectuadas como descrito no capítulo 2. As absorvâncias foram registadas de 1 em 1 nm e num intervalo de comprimentos de onda que variou conforme o surfactante em estudo (ver secção 3.1).

O cálculo das absortividades molares e das constantes de acidez do *clorodiazepóxido* em SDS ($1,5 \times 10^{-3}$, $2,0 \times 10^{-3}$, $3,0 \times 10^{-3}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$, $2,0 \times 10^{-2}$, $3,0 \times 10^{-2}$, $5,0 \times 10^{-2}$ M), em Triton X-100 ($1,0 \times 10^{-3}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $7,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$, $2,0 \times 10^{-2}$, $3,0 \times 10^{-2}$, $4,0 \times 10^{-2}$, $5,0 \times 10^{-2}$, $6,0 \times 10^{-2}$ M) e em CTAB ($1,0 \times 10^{-3}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $7,0 \times 10^{-3}$,

$1,0 \times 10^{-2}$, $2,0 \times 10^{-2}$, $3,0 \times 10^{-2}$, $4,0 \times 10^{-2}$, $5,0 \times 10^{-2}$ M) foi efectuado computacionalmente por intermédio do programa SQUAD.

Os valores obtidos para as constantes de acidez tiveram em conta pelo menos 2 ensaios independentes com mais de seis soluções com concentrações de catião hidrogénio diferentes. Os valores médios e os erros associados às constantes de acidez foram determinados utilizando o método de Adrien Albert e E. P. Serjeant, como descrito no capítulo 2.

Resultados obtidos e sua Discussão

A) Surfactante aniónico (SDS)

De seguida apresentam-se os resultados obtidos com o SDS, apesar de já se encontrarem publicados, devido ao interesse em compara-los com os obtidos com os restantes surfactantes.

Para a determinação dos valores das constantes de acidez foram obtidos os espectros do CLDZ em SDS na concentração em estudo, utilizando várias soluções com valores de pH distintos. O tipo de espectro de ultravioleta-visível que se obtém para o *clorodiazepóxido* em SDS quando se varia $-\log[H^+]$ encontra-se representado na figura 3.2.1.

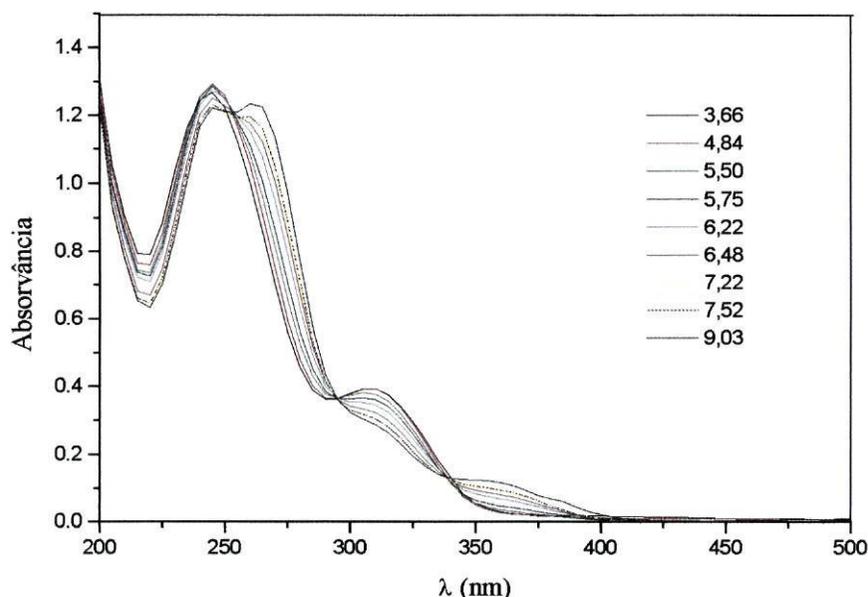


Figura 3.2.1- Espectro de várias soluções de CLDZ em SDS 3×10^{-3} M a diferente pH.

A lei de Lambert-Beer foi verificada para as condições experimentais utilizadas. Verificou-se a ocorrência de uma relação linear entre as absorvâncias a dois comprimentos de onda diferentes para toda a gama de comprimentos de onda utilizada. As curvas de titulação de absorvância em função do pH, para um determinado comprimento de onda, permitiram verificar a existência de uma inflexão perto do valor obtido para os pK_{app} do CLDZ em SDS, como se pode verificar na referência [66].

Os valores das constantes de acidez aparente do CLDZ em SDS calculados pelo programa SQUAD a partir das medições espectrofotométricas de ultravioleta-visível encontram-se registados na tabela 3.2.1.

Tabela 3.2.1- Constantes de acidez aparente do CLDZ em SDS; (I = 0,1M; t = 25°C)

Concentração de SDS (mol/dm ³)*	pK_{app}
0	4,79 ± 0,03
1,5 X 10 ⁻³	5,37 ± 0,08
2,0 X 10 ⁻³	5,59 ± 0,01
3,0 X 10 ⁻³	5,88 ± 0,02
4,0 X 10 ⁻³	6,01 ± 0,01
1,0 X 10 ⁻²	6,02 ± 0,01
2,0 X 10 ⁻²	6,06 ± 0,01
5,0 X 10 ⁻²	6,14 ± 0,03

* Neste trabalho foi obtida a constante relativa ao valor de concentração de SDS 3,0 x 10⁻³ M, tendo-se verificado de novo o da concentração 2,0 x 10⁻³ M.

Analisando a tabela verifica-se que há um aumento dos valores de pK_{app} para o *clorodiazepóxido* em soluções de SDS de concentração superior à cmc, isto é, ocorre uma diminuição da ionização. Estes resultados indicam portanto que a presença de sistemas micelares aniónicos como o SDS favorecem a forma protonada do CLDZ (deslocam o equilíbrio $HCLDZ^+ \leftrightarrow CLDZ + H^+$ para a esquerda), o que pode advir da existência de uma interacção entre a forma protonada do CLDZ e o grupo aniónico das micelas de SDS.

Este comportamento é semelhante ao verificado para muitos compostos que interactuam com micelas de surfactantes aniónicos,⁶⁷ mas só em certa parte, uma vez que ao

analisar a variação das constantes de acidez a diferentes concentrações verifica-se que o CLDZ tem um comportamento distinto dos ácidos neutros. Esperava-se um aumento das constantes de acidez com o aumento das concentrações, e assim de facto acontece, mas só até determinada concentração, ou seja, embora as constantes aumentem todas, os últimos valores não variam significativamente, como se pode verificar pela figura 3.2.2.

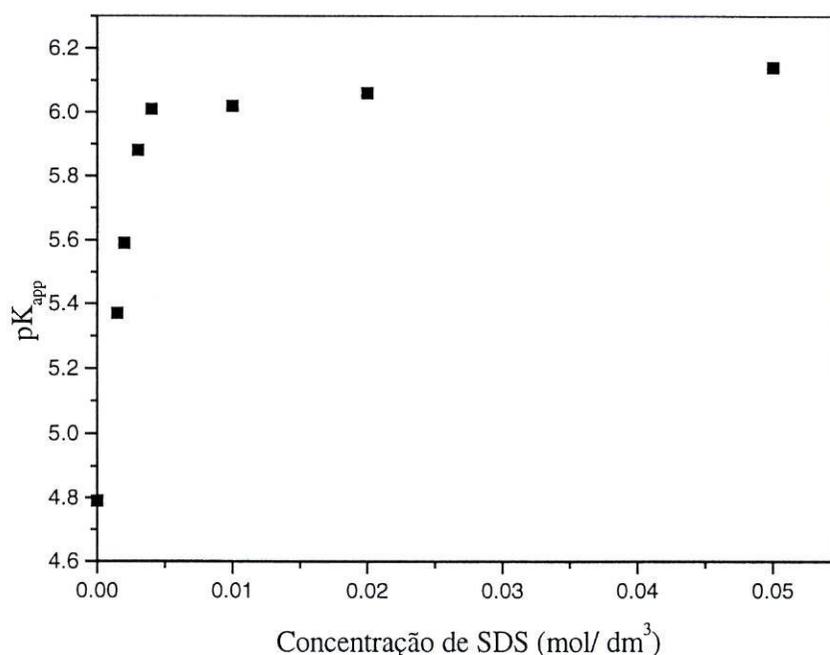


Figura 3.2.2- Representação gráfica da variação de pK_{app} em função da concentração de SDS.

Para além das constantes de acidez aparente, o programa SQUAD pode calcular as absorvidades molares das espécies em solução. Na tabela 3.2.2 apresentam-se os valores dos comprimentos de onda de absorvância máxima (λ_{max}) e das absorvidades molares da espécie protonada (ϵ_{BH^+}) e da espécie neutra (ϵ_B) do *clorodiazepóxido*.

As absorvidades molares obtidas para o CLDZ em SDS são da ordem de grandeza das descritas em literatura para meios aquosos e semelhantes às verificadas em meios mistos.^{6,9}

Tabela 3.2.2- Valores dos comprimento de onda máximo e das absorvidades molares do CLDZ em SDS

HCLDZ ⁺		CLDZ	
λ_{\max} (nm)	ϵ_{BH^+} ($\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ_{B} ($\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
245	2,7	260	2,5
310	0,8	355	0,2

B) Surfactante neutro (Triton X-100)

No estudo do comportamento ácido/base do CLDZ em meio micelar neutro, traçaram-se os espectros desta benzodiazepina em Triton X-100 numa gama mais limitada de comprimentos de onda, o que implicou uma atenção especial no ajuste de pH das soluções utilizadas, de modo a que o espectro apresentasse uma variação significativa com o pH e permitisse assim ao programa SQUAD calcular os valores das constantes de acidez.

Nas figuras 3.2.3 e 3.2.4 encontram-se representados os espectros obtidos em dois ensaios independentes realizados para as concentrações de $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ e $7 \times 10^{-3} \text{ M}$, respectivamente.

Devido ao intervalo mais restrito de comprimentos de onda só se regista um comprimento de onda máximo. Assim, para a espécie protonada do CLDZ, tal como acontecia no surfactante anteriormente estudado, o comprimento de onda em que se verifica um máximo de absorvância é 310 nm e o valor da respectiva absorvidade molar é $0,9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$.

O valor da absorvidade molar calculado pelo programa SQUAD é concordante com o calculado directamente a partir do espectro (ver secção 3.1).

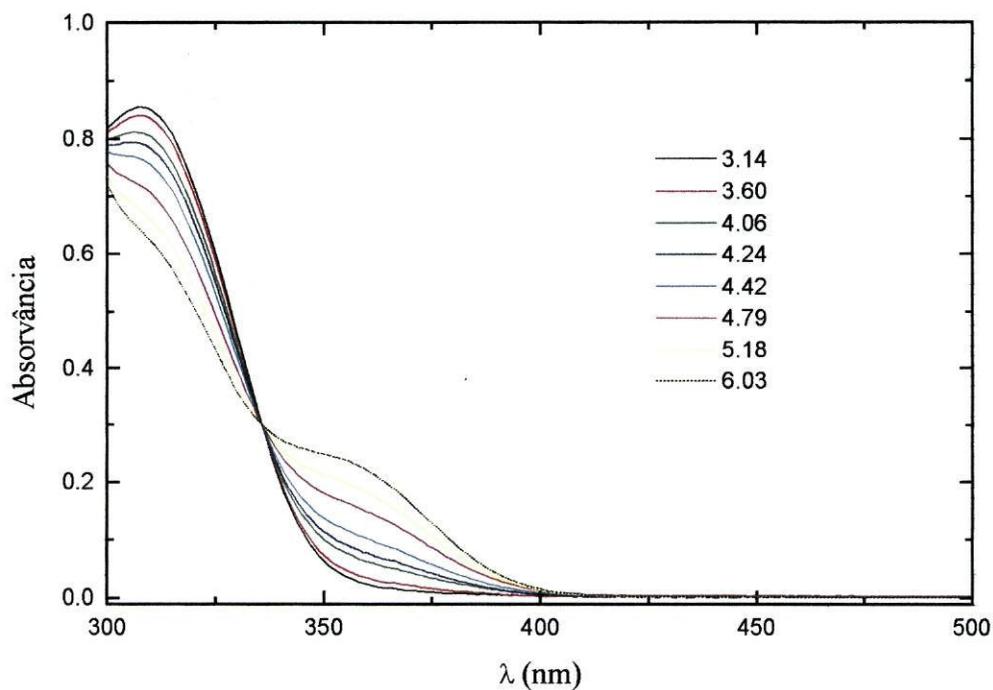


Figura 3.2.3- Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em Triton X-100 $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ a diferente pH.

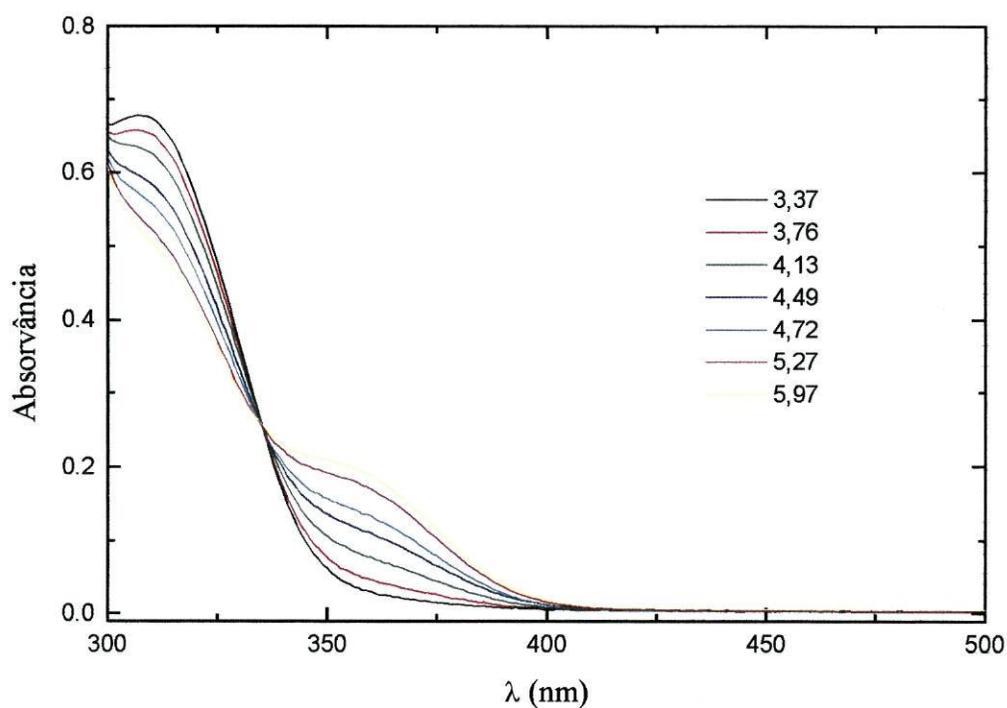


Figura 3.2.4- Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em Triton X-100 $7 \times 10^{-3} \text{ M}$ a diferente pH.

A lei de Lambert-Beer foi verificada para as condições experimentais utilizadas. Observou-se a ocorrência de uma relação linear entre as absorvâncias a dois comprimentos de onda diferentes para toda a gama de comprimentos de onda utilizada, o que indica a existência de 2 espécies absorventes em solução (a forma protonada e a forma neutra do CLDZ). Na figura 3.2.5 encontra-se representada uma relação linear obtida para a concentração de Triton X-100 7×10^{-3} M.

As curvas de titulação de absorvância em função do pH, para um determinado comprimento de onda, permitiram verificar a existência de uma inflexão perto do valor obtido para os pK_{app} do CLDZ em Triton X-100 (figura 3.2.6).

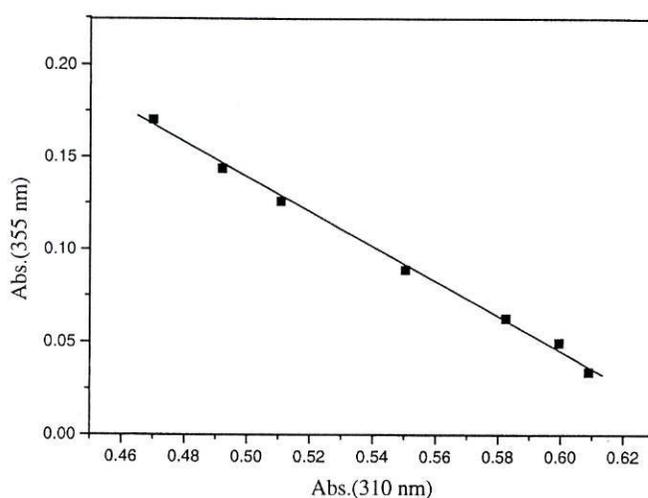


Figura 3.2.5- Representação gráfica da relação linear obtida entre as absorvâncias do CLDZ em Triton X-100 7×10^{-3} M, para os comprimentos de onda 310 e 355 nm.

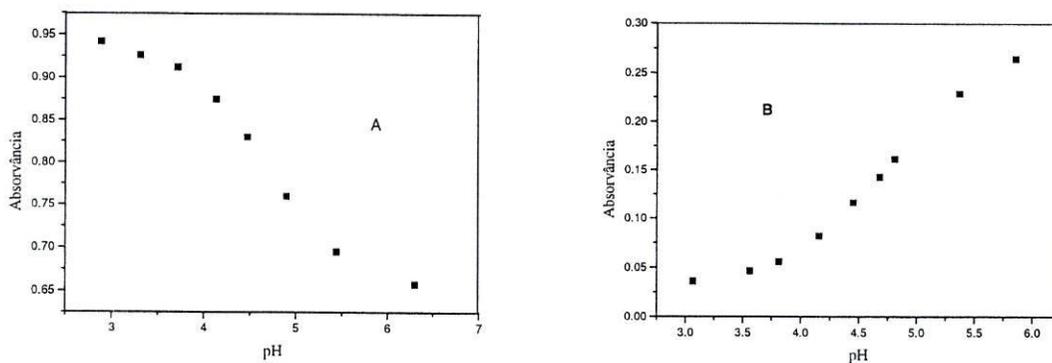


Figura 3.2.6- Curvas de titulações obtidas a 310 nm (A) e a 355 nm (B) para a solução de CLDZ em Triton X-100 1×10^{-3} M.

Na tabela 3.2.3 encontram-se os valores das constantes de acidez aparente do CLDZ em Triton X-100, calculados pelo SQUAD a partir das determinações espectrofotométricas.

Analisando a tabela verifica-se que há uma diminuição dos valores de pK_{app} para o *clorodiazepóxido* em soluções de Triton X-100 de concentração superior à cmc, ou seja ocorre um aumento da ionização. Estes resultados indicam portanto que a presença de sistemas micelares neutros como o Triton X-100 favorecem a forma neutra do CLDZ (deslocam o equilíbrio $HCLDZ^+ \leftrightarrow CLDZ + H^+$ para a direita), devido ao facto de ser a espécie dissociada a ligar-se à micela.

Tabela 3.2.3- Constantes de acidez aparente do CLDZ em Triton X-100; (I = 0,1M; t = 25°C)

Concentração de Triton X-100 (M)	pK_{app}
0	4,79 ± 0,03
1,0 x 10 ⁻³	4,73 ± 0,02
4,0 x 10 ⁻³	4,55 ± 0,02
7,0 x 10 ⁻³	4,42 ± 0,02
1,0 x 10 ⁻²	4,28 ± 0,02
2,0 x 10 ⁻²	4,03 ± 0,01
3,0 x 10 ⁻²	3,84 ± 0,01
4,0 x 10 ⁻²	3,74 ± 0,01
5,0 x 10 ⁻²	3,57 ± 0,02
6,0 x 10 ⁻²	3,55 ± 0,03

Verifica-se ainda que a diminuição das constantes de acidez com o aumento da concentração de surfactante ocorre apenas até determinada concentração, ou seja, embora as constantes diminuam todas, os últimos valores não variam significativamente, como se pode verificar pela figura 3.2.7.

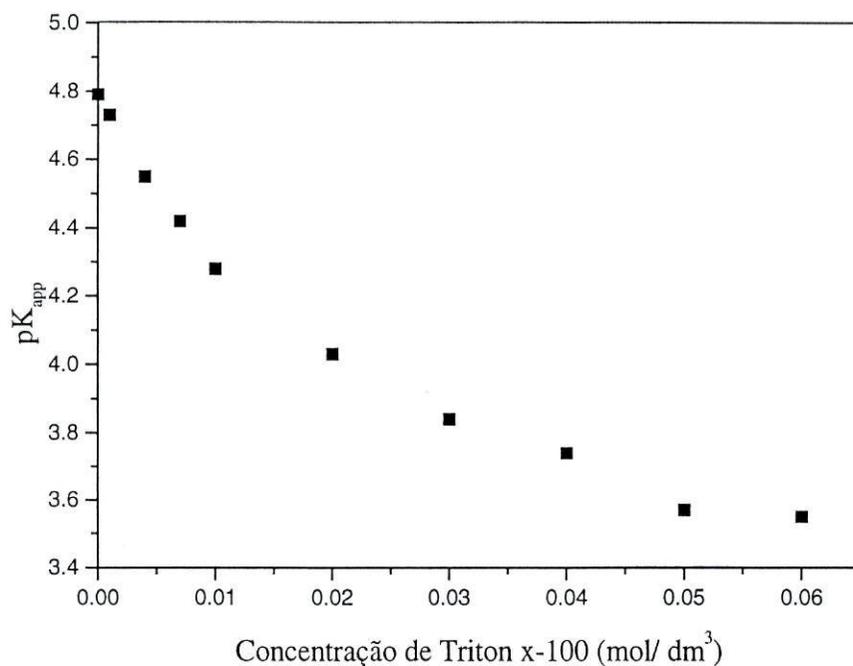


Figura 3.2.7- Representação gráfica da variação de pK_{app} em função da concentração de Triton X-100.

C) Surfactante catiónico (CTAB)

Para a determinação dos valores das constantes de acidez e das absorvidades molares do *clorodiazepóxido* em meio micelar catiónico, foram obtidos os espectros do *clorodiazepóxido* em CTAB na concentração em estudo, utilizando várias soluções com valores de pH distintos.

Nas figuras 3.2.8 e 3.2.9 encontram-se representados os espectros de ultravioleta/visível do *clorodiazepóxido* em CTAB, obtidos em dois ensaios independentes realizados para as concentrações de CTAB 0,01M e 0,04 M respectivamente.

Observando com atenção as duas figuras verifica-se uma maior variabilidade do espectro das soluções com valor de pH mais próximo do valor da constante de acidez respectiva.

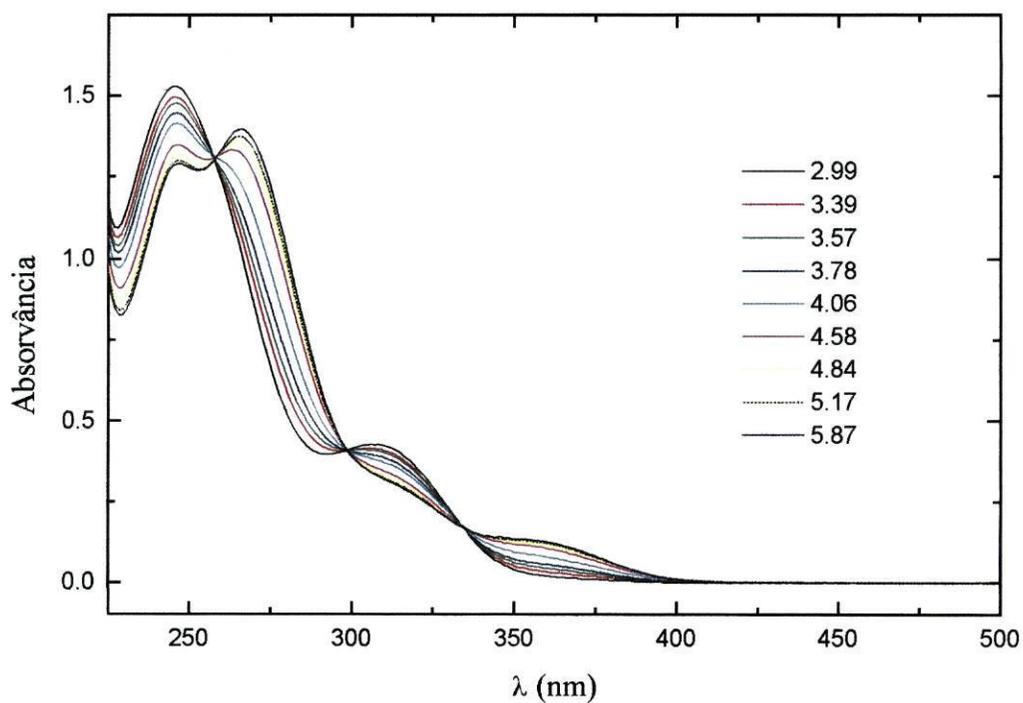


Figura 3.2.8- Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em CTAB 0,01 M a diferente pH.

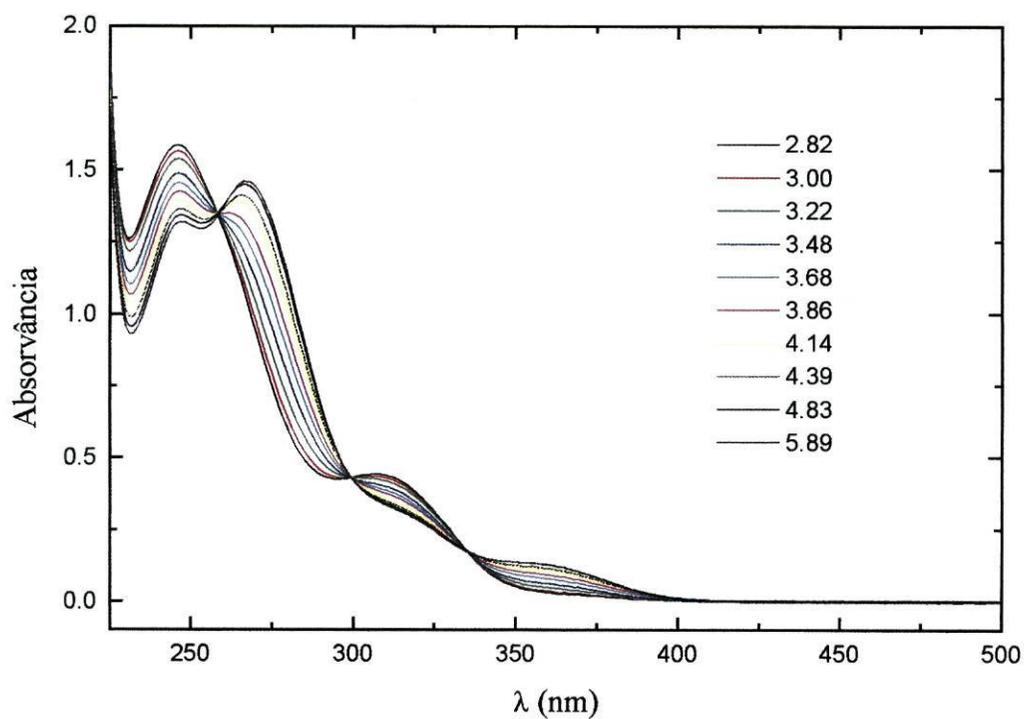


Figura 3.2.9- Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de CLDZ em CTAB 0,04 M a diferente pH.

Os valores das constantes de acidez aparente do CLDZ em CTAB calculados pelo programa SQUAD a partir das determinações espectrofotométricas de ultravioleta/visível encontram-se registados na tabela 3.2.4

Tabela 3.2.4- Constantes de acidez aparente do CLDZ em CTAB; (I = 0,1M; t = 25°C)

Concentração de CTAB (mol/dm ³)	pK _{app}
0	4,79 ± 0,03
1,0 x 10 ⁻³	4,57 ± 0,01
4,0 x 10 ⁻³	4,28 ± 0,02
7,0 x 10 ⁻³	4,06 ± 0,01
1,0 x 10 ⁻²	3,95 ± 0,01
2,0 x 10 ⁻²	3,75 ± 0,03
3,0 x 10 ⁻²	3,71 ± 0,01
4,0 x 10 ⁻²	3,55 ± 0,01
5,0 x 10 ⁻²	3,54 ± 0,02

Analisando a tabela verifica-se que há uma diminuição dos valores de pK_{app} para o *clorodiazepóxido* em soluções de CTAB de concentração superior à cmc, ou seja ocorre um aumento da ionização. Estes resultados indicam portanto que a presença de sistemas micelares catiónicos como o CTAB favorecem a forma neutra do CLDZ (deslocam o equilíbrio $\text{HCLDZ}^+ \leftrightarrow \text{CLDZ} + \text{H}^+$ para a direita), devido à repulsão electrostática entre o grupo catiónico da micela e a forma protonada da benzodiazepina.

Este comportamento é semelhante ao verificado em micelas neutras embora de uma forma mais acentuada, isto é, comparando os valores das constantes de acidez aparente do CLDZ nos dois surfactantes à mesma concentração, verifica-se que o pK_{app} em CTAB é sempre menor.

Verifica-se ainda que tal como já tinha sido observado para o Triton X-100 a diminuição das constantes de acidez com o aumento da concentração de surfactante ocorre apenas até determinada concentração, ou seja embora as constantes diminuam todas, os últimos valores não variam significativamente, como se pode verificar pela figura 3.2.10.

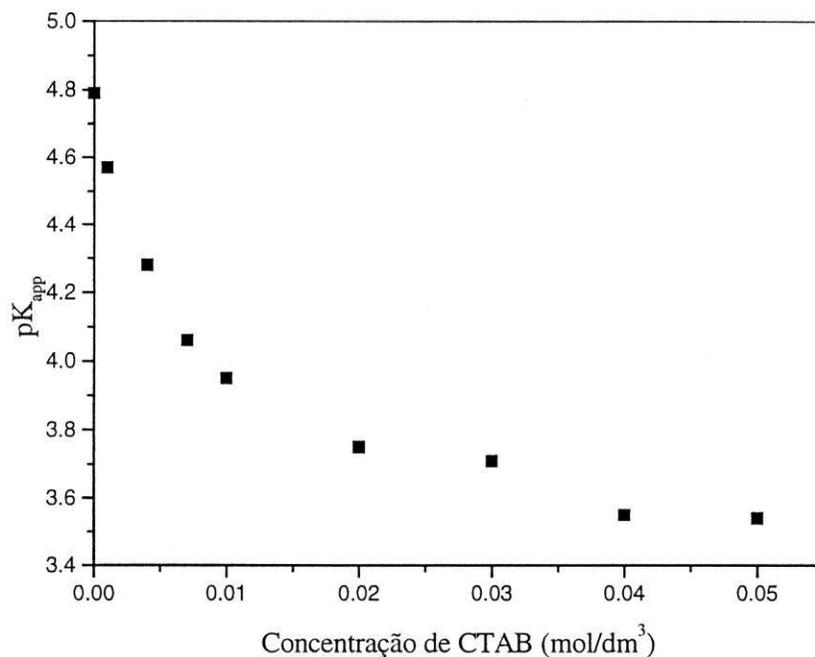


Figura 3.2.10- Representação gráfica da variação de pK_{app} em função da concentração de CTAB.

A lei de Lambert-Beer foi verificada para as condições experimentais utilizadas, verificando-se, tal como nos surfactante anteriores, a ocorrência de uma relação linear entre as absorvâncias a dois comprimentos de onda diferentes para toda a gama de comprimentos de onda utilizada. Na figura 3.2.11 encontra-se representada uma relação linear obtida para a concentração de CTAB 0,04 M.

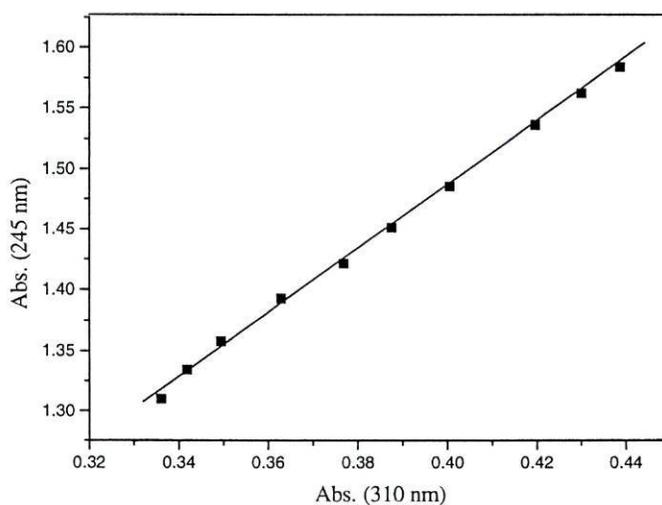


Figura 3.2.11- Representação gráfica da relação linear obtida entre as absorvâncias do CLDZ em CTAB 0,04 M, para os comprimentos de onda 245 e 310 nm.

As curvas de titulação de absorvância em função do pH, para um determinado comprimento de onda, permitiram verificar a existência de uma inflexão perto do valor obtido para os pK_{app} do *clorodiazepóxido* em CTAB (figura 3.2.12), embora as curvas obtidas para comprimentos de onda afastados do comprimento de onda máximo do *clorodiazepóxido* mostrem uma menor inflexão.

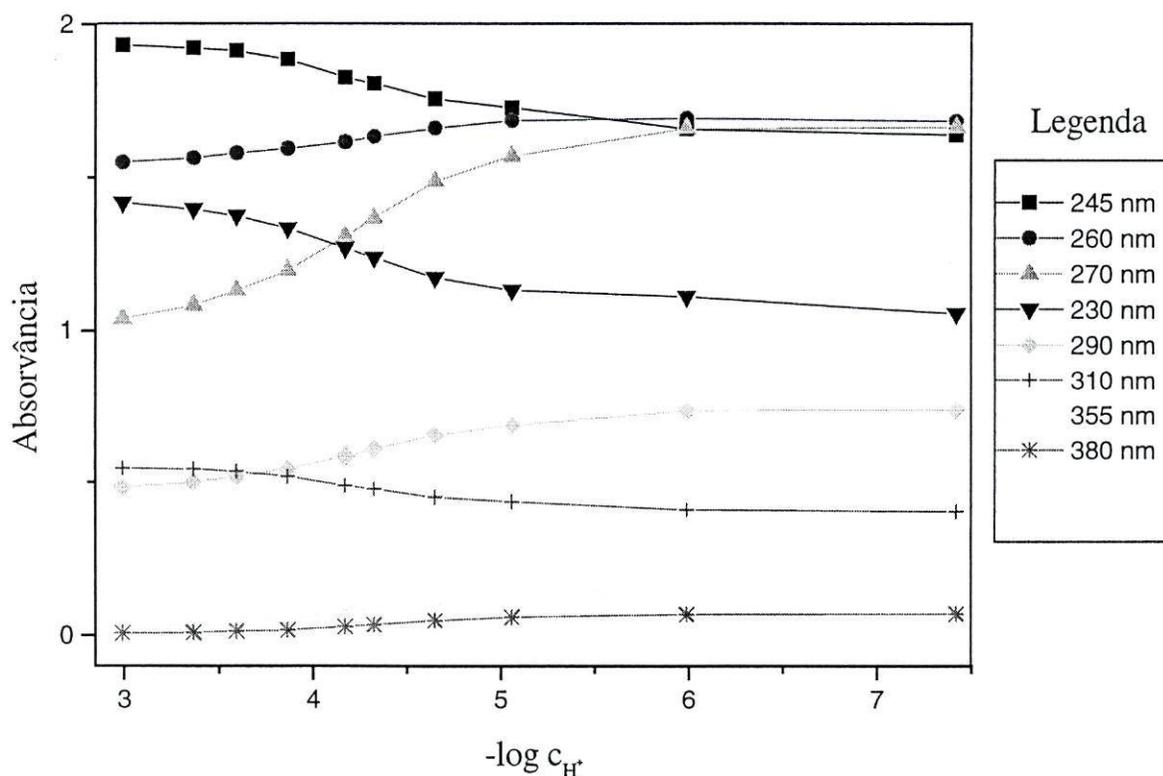


Figura 3.2.12- Representação gráfica de $A_\lambda = f(-\log c_{H^+})$ do *clorodiazepóxido* em CTAB 4×10^{-3} M, para vários comprimentos de onda, mostrando uma inflexão perto do valor obtido para o pK_{app} .

Para além das constantes de acidez aparente, o programa SQUAD determinou as absorvidades molares das espécies em solução. Nas tabelas 3.2.5 e 3.2.6, apresentam-se os valores dos comprimentos de onda de absorvância máxima (λ_{max}) e das absorvidades molares da espécie protonada (ϵ_{BH^+}) e da espécie neutra (ϵ_B) do *clorodiazepóxido*, respectivamente.

Verificou-se que os valores das absorvidades molares calculados pelo programa SQUAD eram concordantes, a menos do erro experimental, com os valores determinados directamente a partir dos espectros (ver secção 3.1).

Tabela 3.2.5- Comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) e absorvidades molares (ϵ) da espécie protonada do *clorodiazepóxido* (HCLDZ⁺) em CTAB, determinados com o programa SQUAD

Concentração de CTAB (M)	1º λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	2º λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
$1,0 \times 10^{-3}$	245	3,1	310	0,9
$4,0 \times 10^{-3}$	245	3,2	310	0,9
$7,0 \times 10^{-3}$	245	3,2	310	0,9
$3,0 \times 10^{-2}$	245	3,3	310	0,9
$4,0 \times 10^{-2}$	245	3,4	310	0,9
$5,0 \times 10^{-2}$	245	3,4	310	0,9

Tabela 3.2.6- Comprimento de onda máximo (λ_{\max}) e absorvidade molar (ϵ) da espécie neutra do *clorodiazepóxido* (CLDZ) em CTAB, determinados com o programa SQUAD

Concentração de CTAB (M)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
$1,0 \times 10^{-3}$	265	2,8
$4,0 \times 10^{-3}$	265	2,8
$7,0 \times 10^{-3}$	265	2,9
$1,0 \times 10^{-2}$	262	2,9
$4,0 \times 10^{-2}$	265	3,0

Conclusões

Analisando os resultados, verifica-se que a variação do valor da constante de acidez aparente do *clorodiazepóxido* em meio micelar está condicionada às características polares do surfactante.

Assim, observa-se um aumento dos valores de pK_{app} para o CLDZ em soluções de SDS e uma diminuição dos mesmos valores para soluções de CLDZ em Triton X-100 e em CTAB.

A diminuição da ionização ocorrida no meio micelar aniônico SDS, indicam que este meio favorece a forma protonada do CLDZ (deslocam o equilíbrio $HCLDZ^+ \leftrightarrow CLDZ + H^+$ para a esquerda), o que pode advir da existência de uma interação entre a forma protonada do CLDZ e o grupo aniônico das micelas de SDS. Este comportamento é aliás semelhante ao verificado para muitos compostos que interactivam com micelas de surfactantes aniônicos.⁶⁷

O aumento da ionização ocorrida no meio micelar neutro Triton X-100 e no meio micelar catiónico, será devido respectivamente à associação da espécie neutra do CLDZ à micela e à repulsão electrostática entre o grupo catiónico da micela e a forma protonada da benzodiazepina.

De salientar ainda que a variação dos valores de pK_{app} é semelhante para os três surfactantes: +1,3 para o SDS e -1,2 para o Triton X-100 e CTAB. Estes desvios estão de acordo com os já verificados para outras benzodiazepinas.⁶⁷

3.3 TRATAMENTO MATEMÁTICO DAS CONSTANTES DE ACIDEZ DO CLORDIAZEPÓXIDO EM MEIO MICELAR

É do conhecimento geral que estruturas organizadas alteram o equilíbrio e as propriedades ácido / base de processos químicos.⁴³⁻⁴⁵ Nesse sentido foram desenvolvidos modelos matemáticos para quantificar o efeito dos meios micelares nas constantes de equilíbrio de várias substâncias.^{12,45,48, 68-75}

No presente trabalho a aplicação de dois destes modelos tem como objectivo dar uma interpretação quantitativa da variação das constantes de acidez aparente do CLDZ em meios micelares aniónicos, neutros e catiónicos.

Resultados Obtidos e sua Discussão

Foi realizado o tratamento matemático dos valores das constantes de acidez descritas na secção 3.2, pela aplicação de dois modelos, designadamente o modelo de Berezin⁴⁵ e o modelo PIE.⁴⁸

O modelo de Berezin assume a distribuição das várias substâncias entre a fase micelar e a aquosa e o modelo de PIE contempla a existência de permuta iónica entre as espécies iónicas em solução e o contra-ião do surfactante. Segundo este modelo a superfície da micela funciona como uma resina de troca iónica, onde as espécies iónicas em solução serão adsorbidas por troca com os contra-íons do surfactante.

De seguida serão apresentados os resultados obtidos para cada um dos surfactantes analisados, tendo o tratamento matemático sido efectuado com o programa MicrocalTM OriginTM versão 5.0 (1991-1997, Microcal Software Inc, Northampton, MA, EUA), utilizando a sua subrotina de minimização não linear.

A) Surfactante aniónico (SDS)

Aplicou-se inicialmente o modelo de Berezin aos resultados obtidos na determinação das constantes de acidez aparente do *clordiazepóxido* em SDS.

Para verificar se este modelo pode descrever o efeito dum meio organizado nas propriedades ácido/base, optou-se por utilizar em primeiro lugar a forma linearizada da

equação deduzida por Berezin, para obter uma estimativa do valor das constantes de ligação do CLDZ às micelas. Os valores obtidos foram posteriormente utilizados como parâmetros da minimização não linear da referida equação (eq. 1.21), que possibilitou a determinação do valor final das constantes de ligação.

A equação deduzida por Berezin, pode portanto ser rescrita como:

$$\left(\frac{1 - \frac{K_{app}}{K_a}}{C_D} \right) = K_{BH^+}^m \frac{K_{app}}{K_a} - K_B^m \quad (3.1)$$

onde C_D é a concentração de surfactante acima da cmc (a diferença entre a concentração total de surfactante, C_T , e a concentração micelar crítica, cmc), $K_{HB^+}^m$ e K_B^m são as constantes de ligação às micelas das espécies protonadas e das espécies neutras, respectivamente, e K_a é a constante de acidez da espécie protonada em meio aquoso.

Representando graficamente $(1 - K_{app}/K_a)/C_D$ em função de K_{app}/K_a , obtém-se uma relação linear cujo declive e ordenada de origem correspondem aos valores das constantes de ligação da forma protonada e da forma neutra do CLDZ à micela respectivamente.

Na representação gráfica da equação 3.1, obtida utilizando os valores das constantes de acidez do *clorodiazepóxido* em SDS, os valores obtidos para as constantes de ligação e erros associados da forma neutra e da forma protonada da benzodiazepina foram, respectivamente, $517 \pm 97,8$ e $1,23 \times 10^4 \pm 1,14 \times 10^3$.

Na figura 3.3.1 encontra-se a representação gráfica de K_{app} em função de C_D , dos valores tabelados na secção 3.2 (tabela 3.2.1) e o ajuste aos pontos experimentais, obtido a partir do modelo matemático de minimização não linear da equação de Berezin. Os valores calculados desta forma para as constantes de ligação encontram-se na tabela 3.3.1.

Na aplicação do modelo de PIE (equação 1.26) utilizou-se para o grau de ionização das micelas aniónicas de SDS o valor $\alpha = 0,75^{48}$, e para a cmc do SDS o valor $1,4 \times 10^{-3} M^{14}$. O tratamento matemático foi igualmente realizado com o programa MicrocalTM OriginTM versão 5.0 e os resultados e erros associados obtidos pela aplicação do modelo PIE encontram-se registados na tabela 3.3.1.

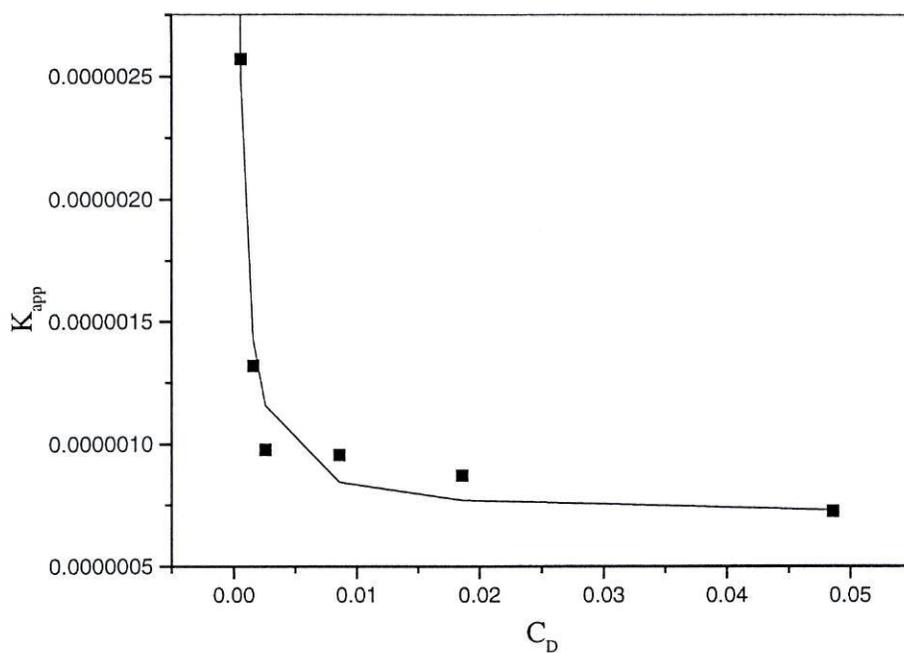


Figura 3.3.1- Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em SDS e o melhor ajuste obtido com o modelo de Berezin.

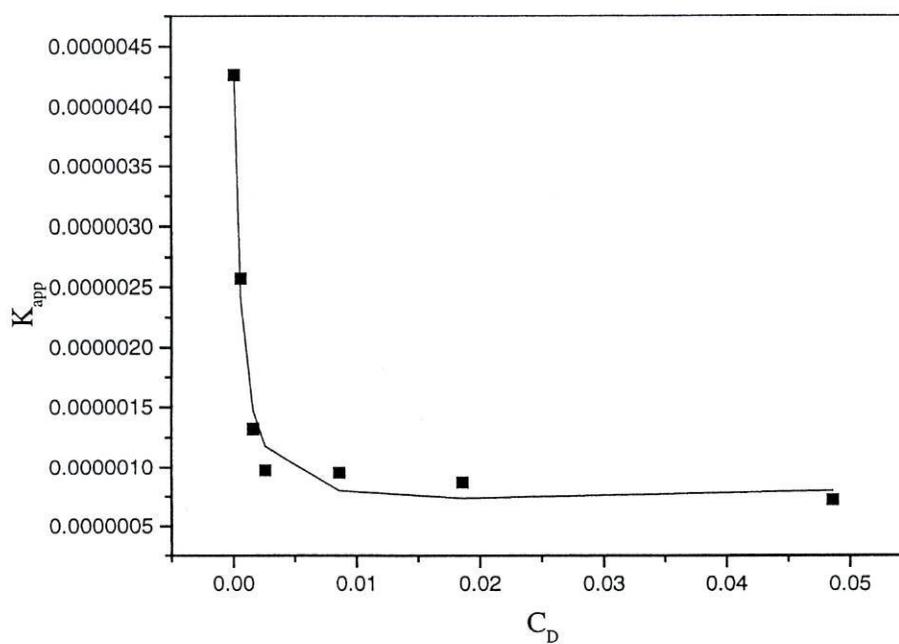


Figura 3.3.2- Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em SDS e o melhor ajuste obtido com o modelo de PIE.

Analisando a tabela 3.3.1 verifica-se que o valor obtido para a quantidade de Na^+ permutado (W) com as outras espécies de carga positiva em solução é negativo, o que implica a invalidade da suposição da existência de troca iónica entre as espécies catiónicas em solução, como por exemplo a forma protonada do CLDZ, e o contra-íon do SDS.

De facto, apesar de em termos matemáticos o modelo de PIE permitir um bom ajuste aos pontos experimentais, em termos químicos o valor obtido para a soma das concentrações de H^+ e HB^+ ligadas às micelas, não tem significado.

Assim, o modelo que melhor fornece uma interpretação quantitativa da variação das constantes de acidez aparente do CLDZ num meio micelar aniónico, é o modelo de Berezin.

B) Surfactante neutro (Triton X-100)

Para quantificar o efeito do meio micelar neutro Triton X-100 nas constantes de acidez aparente de CLDZ foi apenas aplicado o modelo de Berezin, uma vez que a ausência de carga das micelas de Triton X-100 impossibilita a ocorrência de permuta iónica, tornando o modelo de PIE à partida inválido.

Aplicando a equação 3.1 aos valores tabelados na secção 3.2 (tabela 3.2.3), foi possível obter uma estimativa dos parâmetros da equação de Berezin. Os valores das constantes de ligação e erros associados da forma neutra e da forma protonada da benzodiazepina calculados desta forma foram, respectivamente, $192 \pm 9,43$ e $-6,24 \pm 0,978$.

Na figura 3.3.3 encontra-se a representação gráfica de K_{app} em função de C_D , para o sistema CLDZ em Triton X-100 e o ajuste obtido com o modelo matemático de minimização não linear da equação de Berezin. Os valores determinados das constantes de ligação e erros associados da forma neutra e da forma protonada da benzodiazepina foram respectivamente $241,13 \pm 28,77$ e $-2,57 \pm 1,89$.

Em termos químicos os valores obtidos para as constantes de ligação da forma protonada e neutra do CLDZ, significam que a interacção do CLDZ com as micelas de Triton X-100 é preferencialmente realizada pela forma neutra da benzodiazepina, podendo desta forma o valor da constante de ligação da forma protonada do CLDZ ser considerado aproximadamente nulo, ou seja desprezável.

Assim, com este pressuposto é possível simplificar a equação de Berezin, que toma a forma:

$$\frac{K_{app}}{K_a} = 1 + K_B^m C_D \quad (3.2)$$

O valor da constante de ligação da forma neutra do CLDZ às micelas de Triton X-100 e o respectivo erro associado calculados a partir da equação 3.2 encontram-se registados na tabela 3.3.1.

Os resultados obtidos no tratamento matemático das constantes de acidez aparente do CLDZ em Triton X-100, indicam portanto, que a variação observada dos valores de pK_{app} é devido apenas à partição da forma neutra do *clorodiazepóxido* entre a fase micelar e o meio aquoso.

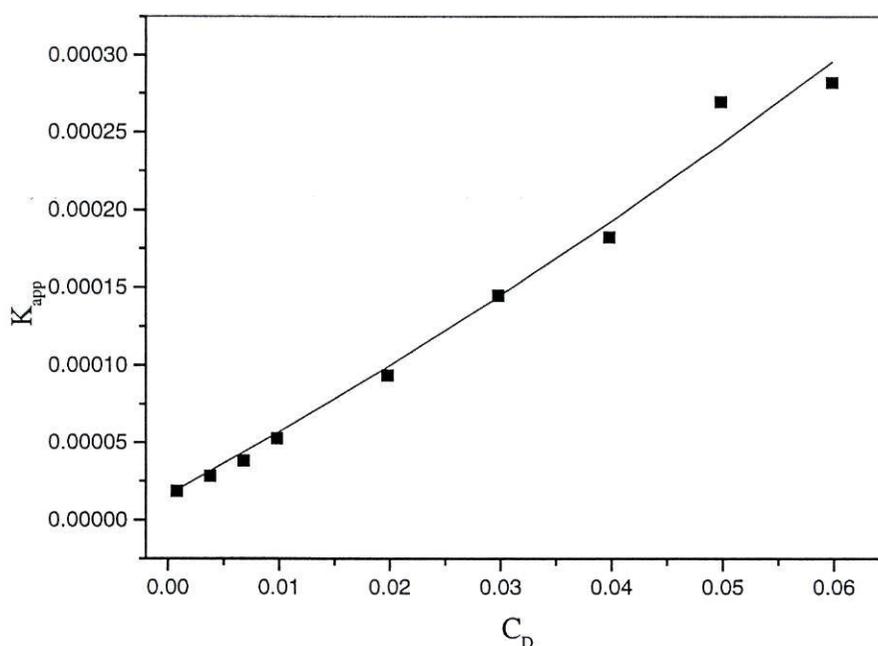


Figura 3.3.3- Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em Triton X-100 e o melhor ajuste obtido pelo modelo de Berezin.

C) Surfactante catiónico (CTAB)

Iniciou-se o tratamento matemático das constantes de acidez aparente do CLDZ em CTAB pela aplicação do modelo de Berezin.

Aplicando a equação 3.1 aos valores tabelados na secção 3.2 (tabela 3.2.4), foi possível obter uma estimativa dos parâmetros da equação de Berezin. Os valores das constantes de ligação e erros associados da forma neutra e da forma protonada da benzodiazepina calculados desta forma foram, respectivamente, $818 \pm 53,9$ e $26,7 \pm 4,58$.

Na figura 3.3.4 encontra-se a representação gráfica de K_{app} em função de C_D , para o sistema CLDZ em CTAB e o melhor ajuste aos pontos experimentais do modelo de Berezin.

Os valores das constantes de ligação e erros associados da forma neutra e da forma protonada da benzodiazepina determinados por um modelo matemático de minimização não linear da equação de Berezin encontram-se registados na tabela 3.3.1.

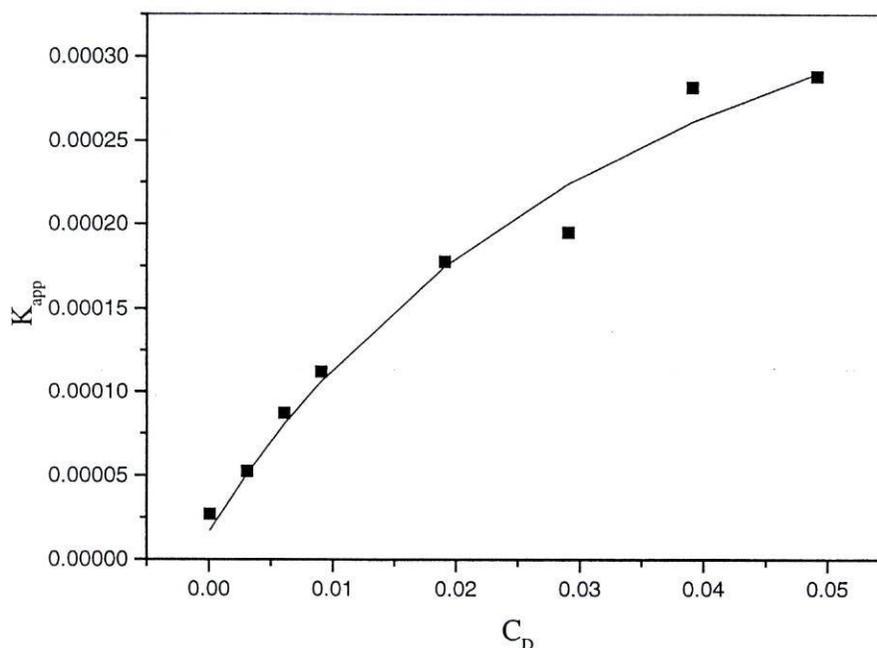


Figura 3.3.4- Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em CTAB e o melhor ajuste obtido pelo modelo de Berezin.

Na aplicação do modelo de PIE (equação 1.31) utilizou-se para o grau de ionização das micelas catiónicas de CTAB o valor $\alpha = 0,75^{24}$, e para a cmc do CTAB o valor $9,0 \times 10^{-4} M^{16}$.

Na figura 3.3.5 encontra-se representado K_{app} em função de C_D e o melhor ajuste do modelo de PIE. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 3.3.1.

Tabela 3.3.1- Constantes de ligação da forma protonada e neutra do CLDZ às micelas de SDS, Triton X-100 e CTAB, obtidos a partir das constantes de acidez aparente

Surfactante	Modelo Berezin			Modelo de PIE				
	K_B	K_{HB+}		K_B	K_{HB+}	K_{HB+Y}	$K_{B/Y+}$	W
SDS	559 ± 103	$1,28 \times 10^4 \pm 1,27 \times 10^3$		$278 \pm 93,9$	—	$1,33 \times 10^4 \pm 652$	—	$-6,0 \times 10^{-5} \pm 2,0 \times 10^{-5}$ *
Triton X-100	$278 \pm 8,46$	0		—	—	—	—	—
CTAB	769 ± 116	$23,7 \pm 7,57$		—	$5,68 \pm 5,40$	—	$240 \pm 51,3$	$-3,3 \times 10^{-4} \pm 3,7 \times 10^{-4}$ **

* $W = |H^+|_b + |HB^+|_b$ (ver cap.1)

** $W = |OH|_b + |B|_b$ (ver cap.1)

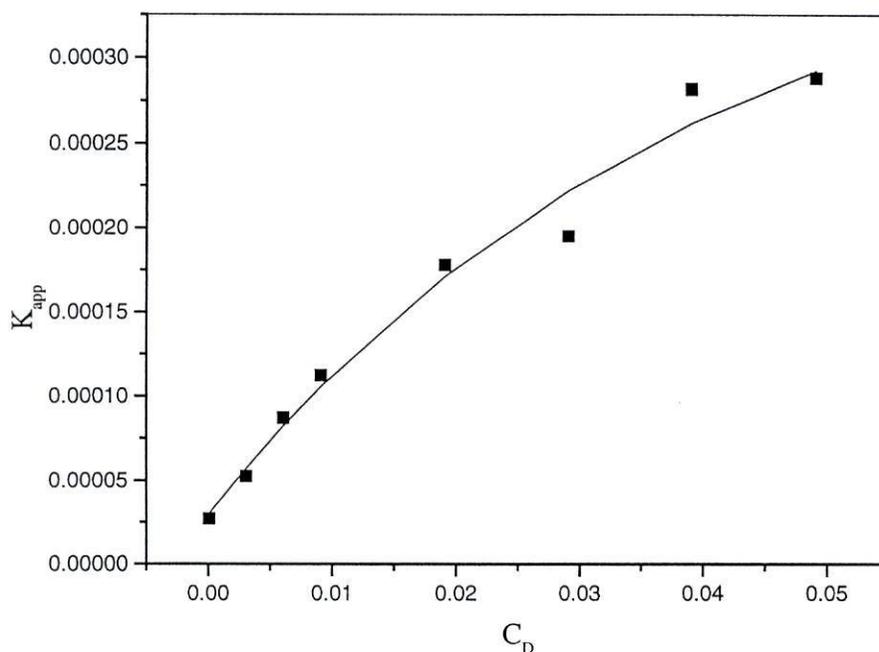


Figura 3.3.5- Representação gráfica de $K_{app} = f(C_D)$ para o sistema CLDZ em CTAB e o melhor ajuste obtido pelo modelo de PIE.

Ambos os modelos ajustam-se bem aos pontos experimentais (ver figuras 3.3.4 e 3.3.5) e os valores obtidos para as diferentes constantes não permitem concluir qual deles representa com mais rigor o que se passa com o CLDZ no meio micelar CTAB.

O valor muito baixo obtido para W , que neste caso representa a soma das concentrações de OH^- e B ligadas à micela, é explicado pelo facto das micelas de CTAB se ligarem mais fortemente aos seus contra-íões que a OH^- ou B , tornando válida a suposição que a concentração de OH^- e de B na superfície micelar é aproximadamente nula.²⁴

Conclusões

O tratamento matemático efectuado às constantes de acidez aparente de CLDZ em diferentes meios micelares, permitiu verificar que a variação dos valores das constantes com a concentração de surfactante depende da classe do surfactante utilizado (aniónico, neutro ou catiónico).

Assim, quer no meio micelar aniónico (SDS) quer no meio micelar neutro (Triton X-100), o modelo que melhor fornece uma interpretação quantitativa da variação das constantes de acidez aparente do CLDZ é o modelo de Berezin, que assume a partição das espécie entre as fases aquosa e micelar.

De salientar que no caso do surfactante SDS obteve-se um melhor ajuste aos pontos experimentais com modelo de permuta iónica (PIE). No entanto, a determinação das constantes de ligação, não se deve limitar à resolução de um problema matemático, devendo os valores obtidos serem analisados sob um ponto de vista químico. Deve-se portanto evitar escolher o modelo que fornece os melhores parâmetros - até porque a introdução de mais parâmetros pode levar a uma melhor convergência - mas sim, escolher o modelo cujos parâmetros tenham significado químico e que fornece valores que por análise das propriedades químicas da substância permitem concluir, neste caso, que é o modelo que melhor descreve o que se passa com o CLDZ em meio micelar.

Comparando a magnitude dos valores das constantes de ligação da forma protonada e neutra do *clorodiazepóxido*, é possível inferir que a associação da benzodiazepina às micelas aniónicas de SDS é efectuada preferencialmente pela forma protonada do CLDZ (HCLDZ^+), enquanto que em Triton X-100 esta associação é apenas devida à forma neutra (CLDZ).

A interpretação dos resultados obtidos em CTAB é dificultada pelo facto dos dois modelos matemáticos obterem bons ajustes aos pontos experimentais, como se pode verificar pelos gráficos $K_{\text{app}}=f(C_D)$. Para uma melhor interpretação dos valores determinados será necessário efectuar outros estudos, que permitam afirmar qual dos modelos expressa com mais rigor o efeito de um meio micelar catiónico nas propriedades ácido/base do CLDZ.

3.4 SOLUBILIDADE DO CLDZ EM SOLUÇÕES AQUOSAS E MICELARES

Numa tentativa de entender a relação propriedades químicas/atividade farmacológica de uma droga, têm sido deduzidas várias equações matemáticas que incluem parâmetros que traduzem as propriedades físico-químicas dessas drogas.

Os parâmetros de solubilidade medem a interação entre as drogas e as regiões hidrofóbicas de macromoléculas e permitem interpretar, por um lado, o transporte das drogas desde a sua administração até ao local de acção, por outro, a possibilidade de existirem interações entre as drogas e as regiões hidrofóbicas dos meios onde se encontram.

Execução Experimental

Os ensaios realizados para a determinação da solubilidade, foram efectuados dispersando um excesso de CLDZ em 25 ml de solução aquosa e em soluções dos surfactantes SDS ($4,0 \times 10^{-4}$, $8,0 \times 10^{-4}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ M), Triton X-100 ($1,0 \times 10^{-3}$, $4,0 \times 10^{-3}$, $7,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ M) e CTAB ($4,0 \times 10^{-3}$, $7,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ M). Todas as soluções tinham força iónica ajustada a 0,1 M em NaCl e pH fixo (pH = 3 ou pH = 9).

Para assegurar a dissolução do CLDZ, mantiveram-se todas as soluções em observação durante 48h, à temperatura de 25°C. Durante este período de tempo o valor de pH foi controlado, pela adição de quantidades vestigiais de ácido clorídrico concentrado até pH \approx 3 nas soluções acidificadas e de quantidades vestigiais de hidróxido de sódio concentrado até pH \approx 9 nas soluções alcalinas.

Obtiveram-se soluções saturadas límpidas por filtração, utilizando filtros de marca Macherey- Nagel referência 72900, de 25 mm, com 0,45 μ m de poro. Estas soluções foram posteriormente diluídas de forma apropriada no solvente contendo a mesma concentração de surfactante em estudo e força iónica ajustada com NaCl 0,1M.

O ajuste final de $-\log|H^+|$ das soluções amostra e das soluções padrão com concentração conhecida de *clorodiazepóxido* para a construção da recta de calibração foi efectuado como mencionado atrás por adição de quantidades vestigiais de ácido forte ou base forte, utilizando os parâmetros de calibração do eléctrodo de vidro obtidos pelo método de Gran a partir de uma titulação de ácido forte/base forte. A calibração do sistema de titulação utilizado foi efectuada como descrito no capítulo 2.

A concentração máxima de CLDZ dissolvido nas soluções saturadas em estudo (solubilidade) foi determinada por espectrofotometria de ultravioleta/visível, ao comprimento de onda de absorvância máxima. As determinações espectrofotométricas foram efectuadas como descrito no capítulo 2.

Foi realizada uma recta de calibração em cada dia em que se determinaram concentrações de *clorodiazepóxido*.

O efeito da solubilização da forma protonada e da forma não protonada do CLDZ em soluções micelares foi avaliado pela representação gráfica da equação 1.8 ou da equação 1.10 descritas na secção 1.3 do capítulo 1. A partir da relação linear obtida foi possível determinar as constantes de ligação do CLDZ às micelas.

Resultados Obtidos e sua Discussão

O aumento de solubilidade de compostos em meios micelares é normalmente atribuído à distribuição de espécies não iónicas na pseudofase micelar e ao aparente aumento da ionização destes compostos.⁴⁴ Com o objectivo de diferenciar as duas contribuições foram determinadas as solubilidades do CLDZ em solução aquosa e em soluções micelares a pH ácido e a pH básico.

Os valores da solubilidade do *clorodiazepóxido* obtidos a pH=3 e a pH=9, permitiram calcular a constante de ligação da forma protonada (K_{HB}^+) e da forma desprotonada (K_B) do CLDZ às micelas, respectivamente.

A) CLDZ em água

Para a aplicação da equação matemática que permite obter as constantes de ligação é necessário utilizar o valor da solubilidade do *clorodiazepóxido* em meio aquoso (S_w), que foi necessariamente obtido ao mesmo valor de pH.

Na tabela 3.4.1 encontram-se os valores obtidos no estudo da solubilidade do CLDZ em meio aquoso a pH=3 e a pH=9.

Tabela 3.4.1- Solubilidade do CLDZ em meio aquoso a pH=3 e a pH= 9, a 25°C.

pH	Solubilidade de CLDZ em água (M)
3	$1,14 \times 10^{-3}$
9	$3,16 \times 10^{-4}$

B) CLDZ em SDS

Os resultados obtidos no estudo da solubilidade do *clorodiazepóxido* no meio micelar aniónico SDS encontram-se na tabela 3.4.2. Como se pode verificar, este estudo foi apenas efectuado a pH=9, uma vez que a pH ácido ocorria a formação de um precipitado branco, devido à interacção detectada aquando do estudo espectrofotométrico do CLDZ em SDS (ver secção 3.1).

Tabela 3.4.2- Efeito do sistema micelar SDS na solubilidade do CLDZ, a 25°C

Concentração de SDS (M)	Solubilidade de CLDZ a pH=9 (M)
$4,0 \times 10^{-4}$	$3,21 \times 10^{-4}$
$8,0 \times 10^{-4}$	$4,76 \times 10^{-4}$
$4,0 \times 10^{-3}$	$9,68 \times 10^{-4}$
$1,0 \times 10^{-2}$	$2,04 \times 10^{-3}$

Na figura 3.4.1 está representado o gráfico dos valores obtidos em função da concentração de SDS, a partir do qual facilmente se confirma que o valor da solubilidade do CLDZ em soluções micelares com concentração abaixo da cmc é idêntico ao valor da solubilidade do CLDZ em água, aumentando depois com o aumento da concentração de SDS.

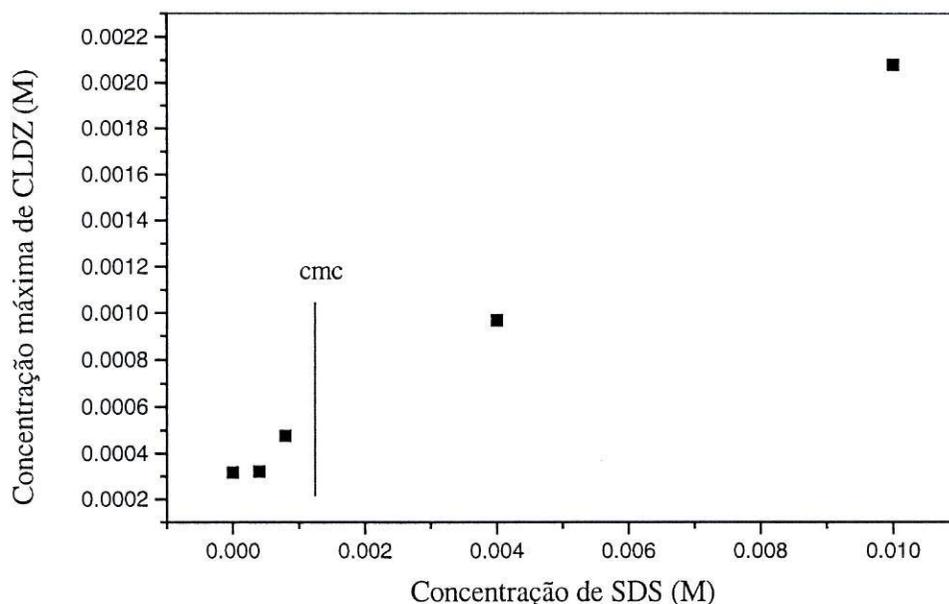


Figura 3.4.1- Representação gráfica da variação da solubilidade do CLDZ em função da concentração de SDS a pH=9.

De modo a avaliar a interacção entre o CLDZ e as micelas de SDS, efectuou-se o tratamento matemático, relacionando S_m/S_w com C_D , segundo a equação 1.8, em que se obtém uma relação linear, com a ordenada na origem igual a 1 e cujo declive é a constante de ligação.

No estudo da solubilidade do *clorodiazepóxido* em SDS, a recta obtida por regressão linear apresenta a equação $y = 1,6 + 565x$ e tem um coeficiente de correlação igual a 0,9988.

O valor da constante de ligação da forma neutra do CLDZ às micelas aniónicas de SDS determinado a partir do estudo de solubilidade ($K_B = 565$) é concordante com o obtido pelo método de Berezin na secção 3.3.

C) CLDZ em Triton X-100

Os resultados obtidos no estudo da solubilidade do *clorodiazepóxido* no meio micelar neutro Triton X-100, quer a pH ácido quer a pH básico encontram-se registados na tabela 3.4.3.

Tabela 3.4.3- Efeito do sistema micelar Triton X-100 na solubilidade do CLDZ, a 25°C

Concentração de Triton X-100 (M)	Solubilidade de CLDZ a pH=3 (M)	Solubilidade de CLDZ a pH=9 (M)
$1,0 \times 10^{-3}$	$1,58 \times 10^{-3}$	$5,32 \times 10^{-4}$
$4,0 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-3}$	$7,87 \times 10^{-4}$
$7,0 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-3}$
$1,0 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-3}$	$1,35 \times 10^{-3}$

Na figura 3.4.2, encontra-se a representação gráfica dos valores obtidos com as soluções ácidas (espécie protonada) e com as soluções alcalinas (espécie desprotonada) em função da concentração de Triton X-100.

Como se pode verificar, apesar do CLDZ ser mais solúvel em meios ácidos, a variação da solubilidade a pH=3 é insignificante, enquanto que para pH alcalino o valor da solubilidade aumenta visivelmente com a concentração de surfactante.

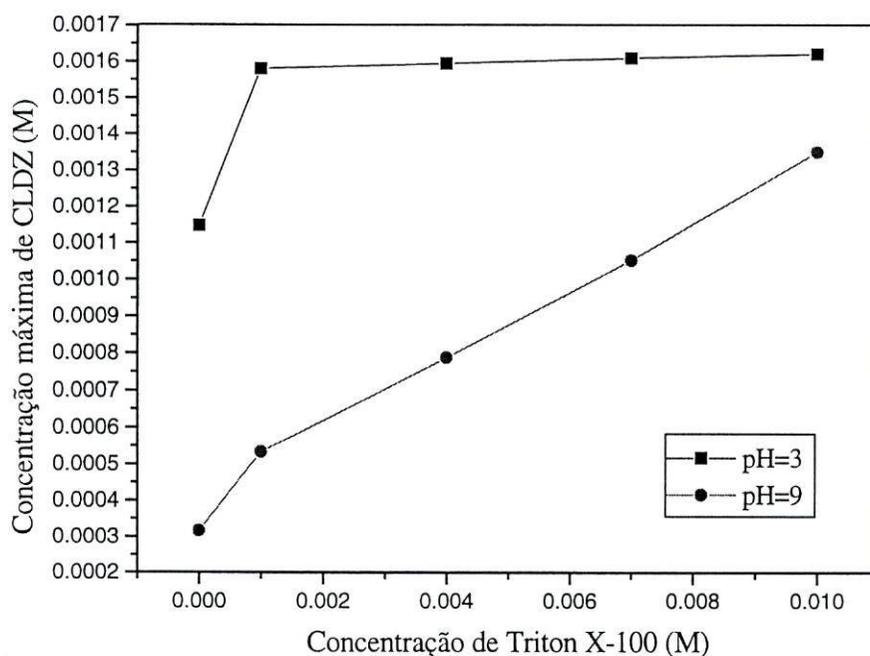


Figura 3.4.2- Representação gráfica da variação da solubilidade do CLDZ em função da concentração de Triton X-100 a pH=3 (quadrados) e a pH=9 (círculos).

Na aplicação da equação 1.8 ao estudo do efeito do sistema micelar Triton X-100 na solubilidade do CLDZ a pH ácido e a pH alcalino, obtiveram-se relações lineares com as seguintes equações de recta:

- A relação linear obtida para a forma protonada do CLDZ apresenta a equação da recta $y = 1,3 + 4,01x$ e tem um coeficiente de correlação igual a 0,9975.
- A forma neutra ou desprotonada do CLDZ apresenta uma relação linear com uma equação de recta $y = 1,4 + 284x$ e com um coeficiente de correlação igual a 0,9993.

Os valores da constante de ligação da forma protonada ($K_{HB^+} = 4,01$) e da forma neutra ($K_B = 284$) do CLDZ às micelas, determinados a partir deste estudo, são concordantes com os obtidos pelo método de Berezin a partir da variação das constantes de acidez.

D) CLDZ em CTAB

Os resultados obtidos no estudo da solubilidade do *clorodiazepóxido* no meio micelar catiónico CTAB, quer a pH ácido quer a pH básico encontram-se registados na tabela 3.4.4.

Tabela 3.4.4- Efeito do sistema micelar CTAB na solubilidade do CLDZ, a 25°C

Concentração de CTAB (M)	Solubilidade de CLDZ a	
	pH=3 (M)	pH=9 (M)
$4,0 \times 10^{-3}$	$1,34 \times 10^{-3}$	$3,68 \times 10^{-4}$
$7,0 \times 10^{-3}$	$1,35 \times 10^{-3}$	$7,14 \times 10^{-4}$
$1,0 \times 10^{-2}$	$1,36 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-3}$

Na figura 3.4.3 encontra-se a representação gráfica dos valores de solubilidade obtidos com as soluções ácidas (espécie protonada) e com as soluções alcalinas (espécie desprotonada) em função da concentração de CTAB.

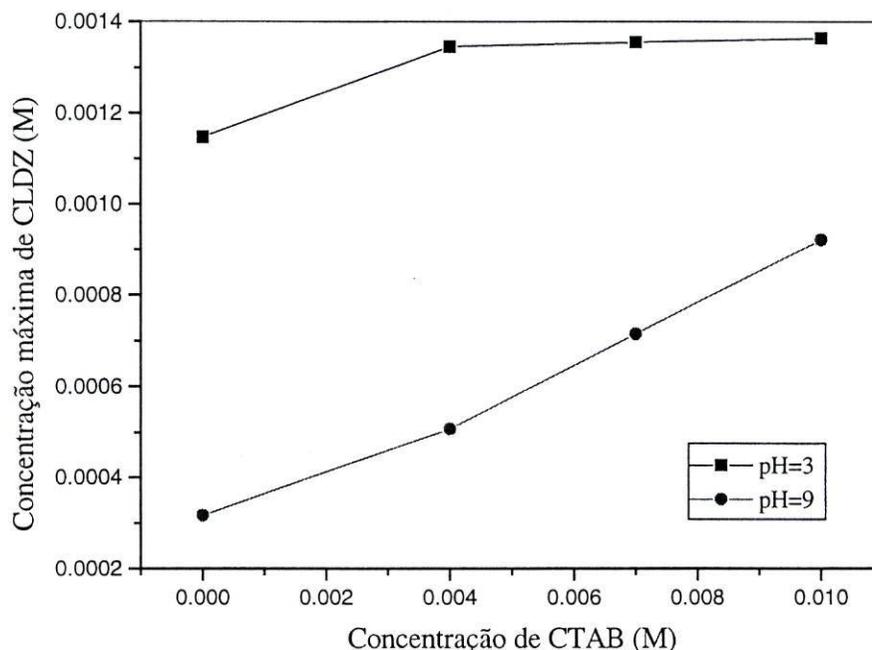


Figura 3.4.3- Representação gráfica da variação da solubilidade do CLDZ em função da concentração de CTAB a pH=3 (quadrados) e a pH=9 (círculos).

Analisando o gráfico, verifica-se que a solubilidade do CLDZ em meios ácidos é nitidamente superior em solução micelar do que em solução aquosa. No entanto, o valor da solubilidade não é influenciado pela quantidade de micelas, uma vez que o aumento de concentração de surfactante não se traduziu no aumento do valor da concentração máxima de *clorodiazepóxido* dissolvido.

Comparando os resultados obtidos a pH ácido com os obtidos a pH alcalino, observa-se que, à semelhança do ocorrido em meio micelar neutro, apesar do *clorodiazepóxido* ser mais solúvel em meios ácidos, é para pH alcalino que o valor da solubilidade aumenta significativamente com o aumento da concentração de surfactante.

De modo a avaliar a interação entre a droga e as micelas catiónicas de CTAB, efectuou-se o tratamento matemático, relacionando S_m/S_w com C_D .

A recta obtida por regressão linear para a forma protonada do CLDZ apresenta a equação da recta $y = 1,1 + 2,95x$ e tem um coeficiente de correlação igual a 0,99999.

A forma neutra ou desprotonada do CLDZ apresenta uma relação linear com uma equação de recta $y = 0,9 + 219x$ e com um coeficiente de correlação igual a 1.

Os valores da constante de ligação da forma protonada e da forma neutra do CLDZ às micelas determinados a partir deste estudo são portanto, $K_{HB^+} = 2,95$ e $K_B = 219$, respectivamente. Estes resultados são concordantes com os obtidos no tratamento matemático da variação das constantes de acidez aparente, utilizando o modelo de PIE que assume a troca iónica entre as micelas de CTAB e outras espécies iónicas em solução.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo da solubilidade do *clorodiazepóxido*, encontram-se resumidos na tabela 3.4.5, a partir da qual facilmente se verifica que os valores encontrados para as constantes de ligação são todos concordantes com os obtidos no estudo das constantes de acidez.

Tabela 3.4.5- Constantes de ligação da forma protonada (K_{HB^+}) e desprotonada (K_B) do *clorodiazepóxido* às micelas determinadas a partir de estudos de solubilidade

Surfactante	K_{HB^+}	K_B
SDS	—	565 ± 20
Triton X-100	$4,01 \pm 0,20$	284 ± 7
CTAB	$2,95 \pm 0,10$	219 ± 1

Assim, o estudo da solubilidade vem corroborar os estudos anteriores e comprovar que a interacção entre o CLDZ e as micelas ocorre preferencialmente pela forma protonada do CLDZ no caso do surfactante SDS e pela forma neutra do CLDZ nos meios micelares Triton X-100 e CTAB.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação das propriedades ácido/base conjuntamente com a solubilidade do CLDZ em diferentes meios micelares, permitiu verificar o tipo de interações (hidrofóbicas ou electrostáticas) deste fármaco em meios organizados.

Do trabalho realizado há que realçar o facto de que os estudos efectuados interpretados individualmente apenas mostram a possibilidade de ocorrência de uma interacção, havendo necessidade de os comparar entre si para se poder afirmar de uma forma conclusiva a natureza dessa interacção.

A obtenção dos espectros do CLDZ nos diferentes meios a pH controlado, apenas permitiu verificar a probabilidade de ocorrer uma interacção entre a benzodiazepina e os surfactantes, e que essa interacção seria de natureza diferente.

Assim, em soluções de SDS abaixo da cmc, o facto dos espectros obtidos a pH ácido exibirem uma diminuição significativa das absorvâncias relativamente às obtidas nas restantes soluções indica que existe uma interacção entre o CLDZ e os monómeros de SDS que ocorre preferencialmente com a forma protonada da benzodiazepina (HCLDZ^+). Observou-se ainda a possibilidade de haver uma interacção com os monómeros de CTAB a pH ácido e com os monómeros de Triton X-100 a pH básico. Relativamente à possibilidade de uma interacção do CLDZ com as micelas dos surfactantes (concentrações de surfactante acima da cmc), observou-se um desvio batocrómico do comprimento de onda de absorvidade molar máxima nos espectros obtidos em CTAB, que comprova essa possibilidade.

Como o CLDZ tem características ácido/base, optou-se por determinar as constantes de acidez nos diferentes meios micelares, com vista a analisar a variação dos valores obtidos ao passar de um meio aquoso para um meio micelar.

Nesta análise das propriedades ácido-base do CLDZ em meios micelares, verificou-se uma variação dos valores das constantes de acidez concordante com o previsto (ver secção 1.4) para ácidos catiónicos, isto é, uma diminuição das características ácidas em meios aniónicos e uma aumento das características ácidas em meios neutros e catiónicos.

Esta observação significa que meios micelares aniónicos favorecem a forma protonada do CLDZ (deslocam o equilíbrio para a esquerda), o que pode advir da existências de uma interacção entre a forma protonada e o grupo aniónico das micelas. Em meios neutros e catiónicos o aumento da ionização (deslocamento do equilíbrio para a direita) será devida respectivamente à associação da espécie neutra do CLDZ às micelas e à repulsão electrostática entre o grupo catiónico das micelas e a forma protonada do CLDZ.

De salientar ainda que a variação dos valores das constantes de acidez ao passar de um meio aquoso para um meio micelar (≈ 1) foi semelhante para os três surfactantes o que está de acordo com o já verificado para outras benzodiazepinas.⁶⁷

A análise dos resultados obtidos neste estudo, por aplicação de modelos matemáticos, permitiu calcular as diferentes constantes de associação entre o CLDZ e as micelas dos diferentes surfactantes.

Neste tratamento optou-se pela utilização de dois dos modelos mais usados, modelo de Berezin e o modelo PIE, que assumem respectivamente, como já foi referido, a distribuição das várias substâncias entre a fase micelar e aquosa e a existência de permuta iónica entre as espécies iónicas em solução e o contra-íão do surfactante.

De salientar, que encontram-se publicados outros tratamentos matemáticos, todos eles baseados na formação da pseudofase micelar, como por exemplo o modelo de Fernandez e Fromherz⁷³. Este modelo assume que a polaridade da interface micelar é idêntica para todos os surfactantes e o surfactante neutro é usado como “avaliador” dos efeitos da superfície polar dos surfactantes iónicos nas constantes de acidez. Este tipo de modelo não é aplicável aos resultados obtidos nesta dissertação, uma vez que o valor determinado das constantes de acidez nos meios Triton X-100 e CTAB são semelhantes.

Comparando a magnitude dos valores das constantes de ligação da forma protonada e neutra do *clorodiazepóxido*, é possível inferir que a associação da benzodiazepina às micelas aniónicas de SDS é efectuada preferencialmente pela forma protonada do CLDZ (HCLDZ^+), enquanto que em Triton X-100 esta associação é apenas devida à forma neutra (CLDZ).

A interpretação dos resultados obtidos em CTAB é dificultada pelo facto dos dois modelos matemáticos obterem bons ajustes aos pontos experimentais, como se pode verificar pelos gráficos $K_{app}=f(C_D)$. Para uma melhor interpretação dos valores determinados foi necessário recorrer a outros estudos.

Relativamente ao tratamento matemático realizado, é de salientar que a determinação de constantes de ligação através destes modelos não se deve limitar à resolução de um problema matemático, devendo os valores obtidos serem analisados sob um ponto de vista químico. Deve-se portanto evitar escolher o modelo que fornece os melhores parâmetros estatísticos, até porque desta forma o modelo escolhido seria invariavelmente o modelo PIE, uma vez que quanto maior for o número de parâmetros introduzidos mais convergente é o método, mas sim escolher o modelo cujos parâmetros tenham significado químico e que forneça valores que por análise das propriedades químicas da substância permitam concluir que é o modelo que melhor descreve o que se passa com o CLDZ em meio micelar. Desta

forma, por vezes é necessário efectuar outros estudos para confirmar qual o modelo mais fiável, tal como aconteceu no caso do CTAB, em que os dois modelos aplicados eram considerados válidos, mesmo com o valor muito baixo obtido para a soma das concentrações de OH^- e B ligadas às micelas, uma vez que este valor pode ser considerado aproximadamente nulo pelo facto das micelas de CTAB se ligarem mais fortemente aos seus contra-íões que a OH^- e B.

O último estudo realizado foi o estudo de solubilidade do CLDZ nos diferentes meios e teve como objectivo determinar por outro método as constantes de ligação e o tipo de interacções da benzodiazepina às micelas.

Os resultados obtidos permitiram verificar o aumento da solubilidade do CLDZ em meios micelares relativamente ao meio aquoso, como esperado e que os valores das constantes de ligação determinados por este estudo são concordantes, a menos do erro experimental, com os obtido no estudo das propriedades ácido-base.

Assim, após a análise de todos os estudos efectuados. Verifica-se que:

- O fármaco CLDZ- um ácido catiónico- na presença de micelas aniónicas diminui as suas características ácidas devido à interacção electrostática com a forma protonada do CLDZ
- Em meios micelares neutros a interacção é apenas devida à forma neutra do CLDZ que se distribui pelas fases aquosa e micelar
- Na presença de micelas catiónicas o CLDZ aumenta as suas características ácidas.
- Os valores determinados das constantes de acidez aparente do CLDZ em Triton X-100 e em CTAB são semelhantes, o que indica um tipo de interacção com o CLDZ também semelhante, neste caso uma interacção preferencialmente hidrofóbica.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFIA

1. Garrett, J.; Osswald, W. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas- Manual de Farmacologia e Farmacoterapia*, I Vol., 2ª ed., Porto Editora, 1986
2. Goodman & Gilman`s. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*; eighth ed., Pergamon Press, 1990
3. Randall, L. O. *Dis. Nerv. Syst.*, **1961**, 22, Suppl. Part. II
4. Bach, L. H. S. *J. Med. Chem.*, **1979**, 22,
5. Pfendt, L.B.; Sladic, D. M.; Janjic, T. J; Popovic, G. V. *Analyst*, **1990**, 115, 383
6. Clifford, J. M.; Smyth, W. F. *Analyst*, **1974**, 99, 245
7. Barrett, J.; Smyth, W. F.; Davidson, I. E. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1973**, 25, 387-393
8. Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J. L. F. C. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 28, 53
9. Santos, A. P.G. *Interações entre moléculas com relevância biológica mediadas por catiões metálicos*, Tese de Doutorado, Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, 1994
10. Lafargue, P.; Meunier, J.; Lemontey, J. *J. Chromat.*, **1971**, 62, 42
11. Guardia, M. L.; Rodilla, F. *Journal of Molecular Structure*, **1986**, 143, 493
12. Berezin, I. V.; Martinek, K.; Yatsimirskii, A. K. *Russian Chem. Rev. (Engl. Trans.)*, **1973**, 42, 787
13. Garcia, M. E. D.; Sanz-Medel, A. *Talanta*, **1986**, 33, 255
14. Jones, M. N.; Chapman, D. *Micelles, Monolayers and Biomenbranes*, Wiley-Liss: New York, 1995

15. Myers, D. *Surfactant Science and Technology*, VCH Publishers Inc., 1988
16. Sudholter, E. J. R.; Langkruis, G. B. V.; Engberts, J. B. F. N. *Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, **1980**, 99/3, 73
17. Habarta, L.; Dorsey, J. *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 1132
18. Klevens, H. B. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1953**, 30, 74
19. Atkins, P. W. *Physical Chemistry*, Oxford University Press: Oxford, 1994
20. Menger, F. M. *Accounts of Chem. Research*, **1979**, 12, 111
21. Hess, K.; Gundermann, J. *Ber.*, **1937**, 70, 1800
22. Everett, D. H. *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry: London, 1994
23. Stigter, D. *J. Phys. Chem.*, **1964**, 68, 3603
24. Romsted, L. S. *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 5107
25. Clifford, J. *Trans. Faraday Soc.*, **1965**, 61, 1276
26. Hinze, W. L. *Solution Chemistry of Surfactants*, vol 1, Plenum Press: New York, 1979
27. Hinze, W. L.; Singh, H. N.; Baba, Y.; Harvey, N. G. *Trends Anal. Chem.*, **1984**, 3, 193
28. Klopff, L. L.; Nieman, T. A. *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 1539
29. Hinze, W. L.; Riech T. E.; Singh, H. N.; Baba, Y. *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 2180
30. Kato, M.; Yamada, M.; Suzuki, S. *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 2529

31. Hoshino, H.; Hinze, W. L. *Anal Chem.*, **1987**, 59, 496
32. Kornahrens, H. D.; Cook, K. D.; Armstrong, D. W. *Anal Chem.*, **1982**, 54, 1325
33. Armstrong, D. W.; Ward, T. J.; Berthod, A. *Anal Chem.*, **1986**, 58, 579
34. Berthod, A.; Dorsey, J. G. *Analysis*, **1988**, 16, 75
35. Pelizzetti, E.; Pramauro, E. *Anal. Chem. Acta*, **1985**, 169, 1
36. Tong, L. K.; Glezman, M. S. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 4305
37. Bunton, C. A.; Robinson, L. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5972
38. Bunton, C. A.; Robinson, J. *Org. Chem.*, **1969**, 34, 780
39. Winters, L. J.; Grunwald, E. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 4608
40. Herries, D. G.; Bishop, W.; Richards, F. M. *J. Phys. Chem.*, **1964**, 68, 1842
41. Harkins, W. D.; Stearns, R. S.; Oppenheimer, H.; Simon, E. *J. Chem. Phys.*, **1947**, 15, 496
42. Winsor, P. A. *Manuf. Chem.*, **1956**, 89, 130
43. Khaledi, M. G.; Rodgers, A. H. *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 239, 121
44. Gerakis, A. M.; Koupparis, M. A.; Efstathiou, C. E. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1993**, 11, 33
45. Pramauro, E.; Pelizzetti, E. *Anal. Chim. Acta*, **1981**, 126, 253
46. Pelizzetti, E.; Pramauro, E. *Anal. Chim. Acta*, **1980**, 403
47. Underwood, A. L., *Anal. Chim. Acta*, **1982**, 140, 89

48. Quina, F. H.; Chaimovich, H. *J. Phys. Chem.*, **1979**, 83, 1844
49. Gonçalves, M. L. S. S. *Métodos Instrumentais para análise de soluções. Análise quantitativa*, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa
50. Albert, A.; Serjeant, E. *The determination of ionization constants*, 2^a ed., Chapman Hall: London, 1971
51. Polster, J.; Lachmann, H. *Spectrometric titrations. Analysis of chemical equilibria*, VCH, Weinheim, 1989
52. Meloun, M.; Mility, J. *Microchim. Acta*, **1993**, 112, 155
53. Zhou, J.; Zou, S.; Liang, W. *Talanta*, **1993**, 40, 925
54. McBryde, W.; *Talanta*, **1974**, 21, 979
55. Tuck, D. G. *Pure & Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1161
56. Vasconcelos, M. T. S. D.; Machado, A. A. S. C. *Rev. Port. Quím.*, **1991**, 28, 120
57. Domingues, V. M. F. *Estudo das interações do Pindolol em soluções de dodecildulfato de sódio*, Tese de Mestrado, Departamento de Química-Física da Faculdade de Farmácia do Porto, 1997
58. Galter, H. *pH Measurement: Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation*, VCH: Weinheim, 1991
59. Westcott, C. C. *pH Measurements*, Academic: New York, 1978
60. Interunion Commission on Biothermodynamics, *Recommendations for Measurement, and Presentatio of Biochemical Equilibrium Data*, vol. 251, The Journal of Biological Chemistry: New York, 1976

61. Gran, G. *Analyst*, **1952**, 77, 661
62. Gameiro, P.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C.; Castro, B. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, no prelo
63. Machado, A. *Análise volumétrica*, 2^a ed, Centro de Investigação em Química (U.P): Porto, 1978
64. Leggett, D. J.; McBryde, W. A. E. *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1065
65. Leggett, D. J.; Kelly, S. L.; Shiue, L. R.; Wu, Y. T.; Chang, D.; Kadish, K. M. *Talanta*, **1983**, 30, 579
66. Oliveira, A. M. S. *Estudo do comportamento do clordiazepóxido em soluções aquosas de dodecilsulfato de sódio*, Seminário Científico, Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, 1996
67. Castro, B.; Gameiro, P.; Guimarães, C.; Lima, L. F. C.; Reis, S. *J. Pharm. Sci.*, **1998**, 87, 356
68. He, Z.; O'Connor, P. J.; Romsted, L. S.; Zanette, D. *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 4219
69. Funasaki, N. *J. Phys. Chem.*, **1979**, 83, 1998
70. Romsted, L. S.; Zanette, D. *J. Phys. Chem.*, **1988**, 92, 4690
71. Pal, T.; Jana, N. R. *Langmuir*, **1996**, 12, 3114
72. Bunton, C. A.; Ohmenzetter, K.; Sepulveda, L. *J. Phys. Chem.*, **1977**, 81, 2000
73. Fernandez, M. S.; Fromherz, P. *J. Phys. Chem.*, **1977**, 81, 1755
74. Romsted, L. S. *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 5113

75. Cordes, E. H. *Pure Appl. Chem.*, **1978**, 50, 617

76. Sommer, L. *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet*,
Elsevier: Budapest, 1989

APÊNDICES

APÊNDICE A

PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DO CLDZ E DO DZP

As benzodiazepinas são tranquilizantes típicos que exercem os efeitos ansiolítico, frenador da agressividade, sedativo e corrector da tensão emocional.

Basta reparar na tabela A.1, para se verificar que a indústria tem sido extremamente activa na produção de pequenas alterações da estrutura (referida no capítulo 1), conduzindo a uma série de medicamentos.

Apesar de alguns compostos apresentarem pouco mais do que repetições do fármaco padrão, existem algumas indicações selectivas fora do campo do tratamento da ansiedade (1), nomeadamente na insónia (2), na epilepsia (3) e no período que antecede a anestesia geral (4).

TABELA A.1: PRINCIPAIS BENZODIAZEPINAS

1- Usadas sobretudo como tranquilizantes

alprazolam; bromazepam; clobazam; clorazepato; clorodesmetildiazepam; clordiazepóxido; desmetildiazepam; diazepam; lorazepam; medazepam; oxazepam; prazepam

2- Usadas sobretudo como hipnóticos

estazolam; flunitrazepam; flurazepam; lormetazepam; nitrazepam; quazepam; temazepam; triazolam

3- Usadas como antiepilépticos

clonazepam; diazepam; nitrazepam

4- Usadas como pré-anestésicos

diazepam; flunitrazepam; midazolam

Tal como acontece para quase todas as séries homólogas, as diferenças entre os diversos tranquilizantes dizem respeito a rapidez de absorção, a duração de acção, metabolização e intensidade de efeitos. O *clorodiazepóxido* e o *diazepam* são os que mais tempo permanecem no organismo porque são extensamente metabolizados.

Nas tabelas A.2 e A.3 encontram-se respectivamente as propriedades farmacocinéticas e as formas de administração e dosagem das duas benzodiazepinas utilizadas neste trabalho

Tabela A.2: Propriedades farmacocinéticas

	<i>Diazepam</i>	<i>Clorodiazepóxido</i>
Biodisponibilidade oral (%)	100 ± 14	100
Excreção urinária (%)	—	< 1
Ligação ao plasma (%)	98,7 ± 0,2	96,5 ± 1,8
Clearance (ml.min⁻¹.Kg⁻¹)	0,38 ± 0,06	0,54 ± 0,49
Volume de distribuição (l/Kg)	1,1 ± 0,3	0,30 ± 0,03
Tempo de semi-vida (h)	43 ± 13	10 ± 3.4
Concentração efectiva	300-400 ng/ml	> 0,7 µg/ml

Tabela A.3: Formas de administração e dosagens

	<i>Diazepam</i>	<i>Clorodiazepóxido</i>
Forma de administração ‡	CAR; I; L	C; I
Dose diária usual (mg)*	4-40 (2-20)	15-40 (25-100)
Dose máxima diária (mg)	2-40	10-100 (25-300)

‡ Formas de administração: C = capsula; CAR = capsulas de acção retardada; I = injeção; L = líquido

* O valor das doses diárias é o administrado na totalidade considerando 2 ou 4 porções por dia. Entre parêntesis é a dosagem para uma única toma diária. Todas as dosagens referidas são para adultos ou adolescentes. Para crianças dos 6 aos 12 anos o *clorodiazepóxido* pode ser administrado por via oral em doses repartidas entre 10 a 30 mg. O *diazepam* pode ser administrado em doses repartidas de 3 a 10 mg a crianças acima de 6 meses de idade.

APÊNDICE B

REQUISITOS DA IUPAC PARA A PUBLICAÇÃO DE CONSTANTES DE EQUILÍBRIO

Uma análise dos resultados publicados sobre constantes de equilíbrio realizada pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) mostrou uma enorme divergência no modo como estes forem obtidos e posteriormente publicados. Em muitos casos a falta da especificação das condições experimentais utilizadas não permite tirar conclusões sobre a fiabilidade dos resultados, o que impede a sua reprodução e utilização em estudos posteriores.

Assim sendo, a IUPAC propôs oito condições que devem ser seguidas para a determinação de constantes de equilíbrio válidas, de que se salienta a descrição da instrumentação usada, o método de calibração, a composição das soluções e a indicação da temperatura a que as determinações foram realizadas.

De seguida apresentam-se os itens considerados importantes pela IUPAC e que deverão portanto constar em qualquer publicação que contenha resultados de constantes de equilíbrio:⁵⁵

1. A pureza dos reagentes e solventes, e o procedimento seguido para a sua purificação.
2. A composição das soluções, especialmente a força iónica, e outros factores relevantes, incluindo a gama de concentrações dos metais e ligandos investigados. Para sistemas de solventes mistos deve ser definida a composição do solvente.
3. Quando se adequar, a zona de pH utilizada nas medições, o titulante utilizado e o valor assumido para K_w .

4. A instrumentação utilizada no estudo experimental (por exemplo: decimilivoltímetro, eléctrodos, espectrofotómetro, etc.) e uma descrição explícita do método de calibração.
5. A temperatura e o intervalo de temperaturas abrangidas.
6. O número de pontos experimentais registados numa titulação e o número de ensaios independentes efectuados.
7. O programa computacional ou qualquer outro método de cálculo utilizado para obter os resultados finais a partir dos dados experimentais e a respectiva referência da literatura.
8. O desvio padrão do resultado final e o método utilizado para estabelecer este parâmetro.

APÊNDICE C

ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DAS PROPRIEDADES ÁCIDO-BASE DO DIAZEPAM

Efectuou-se o estudo de outra benzodiazepina utilizada como ansiolítico, o *diazepam* (DZP), em soluções do surfactante aniónico SDS.

Neste estudo utilizou-se concentrações de surfactante acima e abaixo da cmc, com o intuito de verificar a existência de uma interacção dos monómeros de SDS e o *diazepam*, tendo-se determinado também as constantes de acidez aparente do DZP em SDS.

C.1. ESPECTROS DO DZP EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE SDS ABAIXO E ACIMA DA CMC

O estudo foi efectuado por espectrofotometria de ultravioleta-visível, utilizando-se para o traçado dos espectros soluções de DZP ($\approx 5 \times 10^{-5}$ M) com força iónica ajustada a 0,1M em NaCl, na ausência e na presença do surfactante aniónico SDS, a concentrações abaixo e acima da cmc ($[\text{SDS}] = 4,0 \times 10^{-4}$; $8,0 \times 10^{-4}$; 0,01; 0,05 M).

A execução experimental foi realizada como no estudo anterior com uma única excepção, a zona espectral abrangida foi neste caso de 210 a 450 nm.

Os resultados obtidos neste estudo encontram-se representados nas figuras c.1 e c.2.

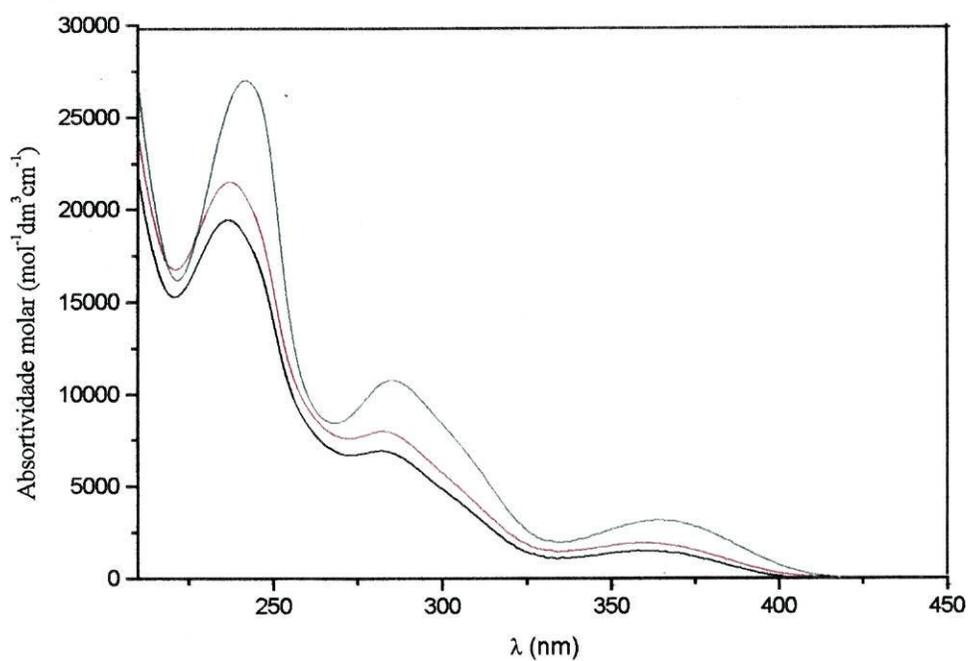


Figura C.1- DZP em água (preto), em SDS abaixo da cmc (vermelho) e em SDS acima da cmc (verde), a $\text{pH}=3$.

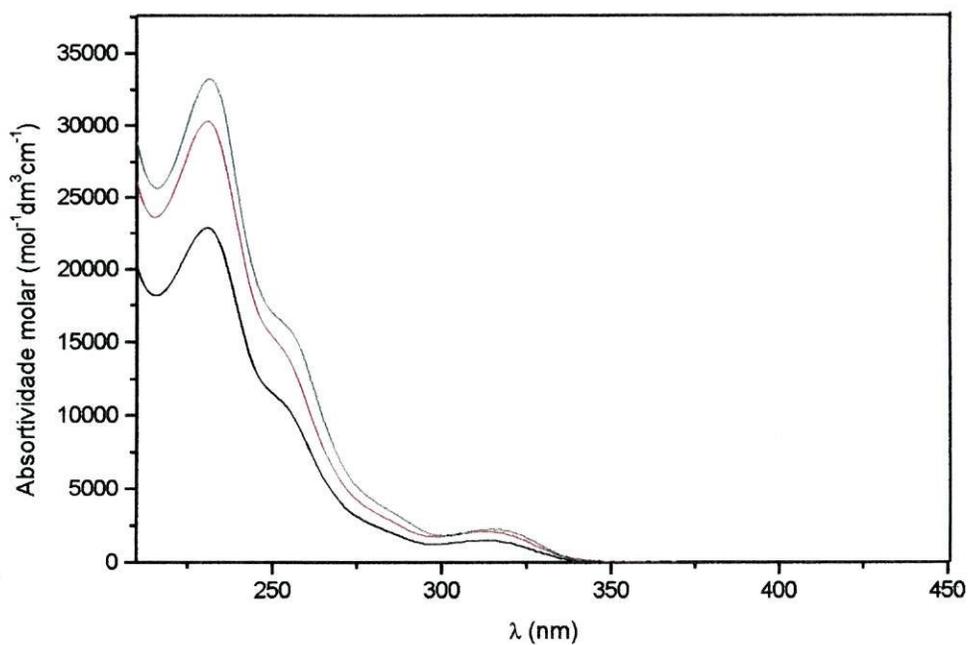


Figura C.2- DZP em água (preto), em SDS abaixo da cmc (vermelho) e em SDS acima da cmc (verde), a $\text{pH}=9$.

Analisando os espectros, verifica-se que quer a pH ácido quer a básico a absorptividade molar das soluções em SDS são sempre superiores à da solução de DZP em água (com $I=0,1M$ em NaCl).

Este estudo revelou ainda que para as soluções a pH ácido se verifica um ligeiro deslocamento da banda correspondente à transição electrónica de maior energia (tabela C.1), o que indica a possibilidade de haver uma interacção entre as micelas e o DZP, uma vez que o comprimento de onda de absorptividade molar máxima é deslocado com o aumento da quantidade de SDS em solução.

Tabela C.1- Valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{max}) de DZP em água e em SDS, a pH=3

Meio	λ_{max} (nm)		
H ₂ O	236	282	357
SDS	240	285	360

C.2 CONSTANTES DE ACIDEZ APARENTE DO DIAZEPAM EM SOLUÇÕES DE SDS

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos anteriormente, determinaram-se as constantes de acidez do DZP em SDS. O procedimento experimental é idêntico ao estudo anterior.

Na tabela C.2 encontram-se registados os valores médios das constantes de acidez aparente do *diazepam* em dodecilsulfato de sódio $4,0 \times 10^{-4}$, $8,0 \times 10^{-4}$, $9,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $2,0 \times 10^{-3}$, $4,0 \times 10^{-3}$ e $0,01 M$.

Na figura C.3 encontra-se ilustrado a forma como o pK_{app} do *diazepam* varia com a concentração de SDS, verificando-se assim que a constante de acidez não varia significativamente até SDS $8,0 \times 10^{-4} M$, voltando a ser aproximadamente constante para valores mais elevados de concentração de SDS (a partir de $1,0 \times 10^{-3} M$).

Tabela C.2- Constantes de acidez aparente do DZP em SDS; (I = 0,1 M; t = 25°C)

Conc. de SDS (mol /dm ³)	pK _{app}
0	3,57 ± 0,06
4,0 x 10 ⁻⁴	3,53 ± 0,02
8,0 x 10 ⁻⁴	3,57 ± 0,04
9,0 x 10 ⁻⁴	3,72 ± 0,03
1,0 x 10 ⁻³	3,93 ± 0,04
2,0 x 10 ⁻³	3,96 ± 0,03
4,0 x 10 ⁻³	3,98 ± 0,04
0,01	4,01 ± 0,01

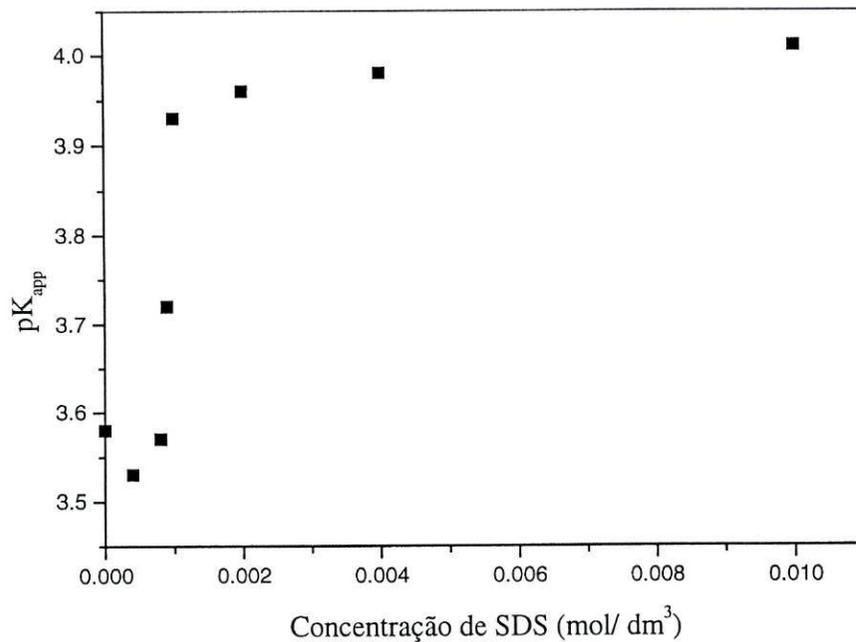


Figura C.3-Representação gráfica da variação do pK_{app} de DZP com a concentração de SDS.

O espectro de ultravioleta/visível obtido para o *diazepam* em SDS encontra-se na figura C.4, e mostra o tipo de espectro que se obtém para o DZP quando se varia $-\log I H^+$

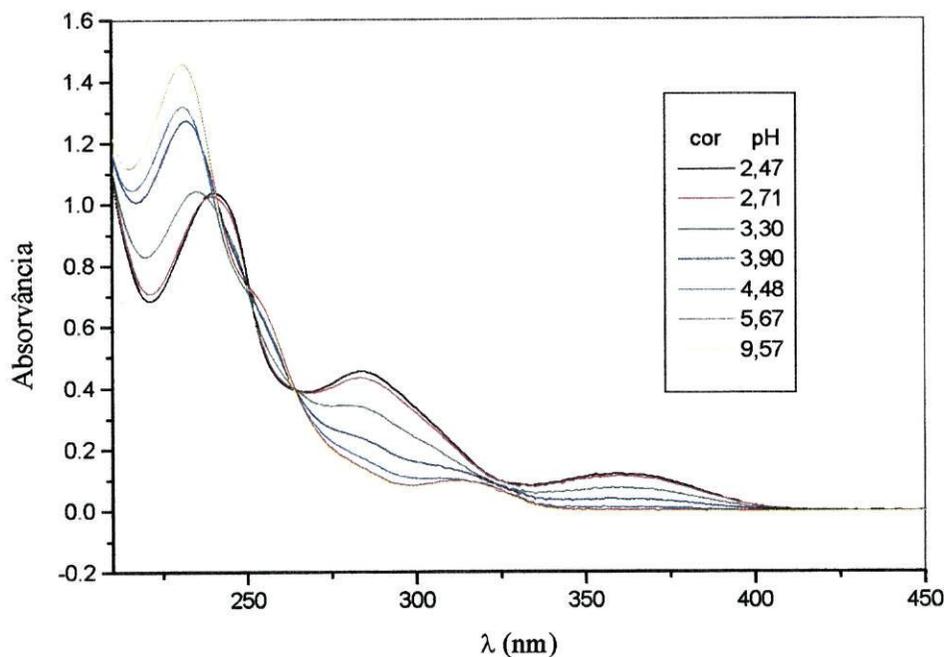


Figura C.4- Representação da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de DZP em SDS a diferente pH.

Na tabela C.3 apresentam-se os valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) e das absorvidades molares médias do DZP em SDS obtidos neste trabalho, em que ϵ_{BH^+} é a absorvidade molar da espécie protonada e ϵ_{B} a absorvidade molar da espécie neutra.

Tabela C.3- Valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) e das absorvidades molares de DZP em SDS

HDZP⁺		DZP	
λ_{\max} (nm)	$\epsilon_{\text{BH}^+} (\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	λ_{\max} (nm)	$\epsilon_{\text{B}} (\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
240	2,2	230	3,2
285	1,1	250(s)	1,5
360	0,3	315	0,2

As absorptividades molares do DZP, obtidas neste trabalho são da ordem de grandeza das descritas na bibliografia para meio mistos água/etanol ou água/ metanol,⁹ como se pode verificar na tabela C.4.

Tabela C.4- Valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) e das absorptividades molares de DZP em meios mistos

HDZP ⁺		DZP	
λ_{\max} (nm)	$\epsilon_{\text{BH}^+} (\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	λ_{\max} (nm)	$\epsilon_{\text{B}} (\times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
241	2,8	231	3,3
286	1,3	253(s)	1,7
360	0,4	310	0,2

C.3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as constantes de acidez do *diazepam* em SDS sugerem que a concentração micelar crítica do SDS na presença do DZP é diferente da cmc do SDS em NaCl 0,1M cujo valor é $1,4 \times 10^{-3}$ M, uma vez que a constante de acidez do DZP em água, descrita na bibliografia ($\text{pK}_a = 3,57 \pm 0,06$) é semelhante às constantes de acidez em SDS obtidas para as concentrações de surfactante mais baixas ($4,0 \times 10^{-4}$ e $8,0 \times 10^{-4}$ M), mas diferente da obtida para SDS $9,0 \times 10^{-4}$ M.

Assim, verifica-se que abaixo da cmc o pK_{app} tem um valor único e idêntico, a menos do erro experimental, ao pK_a da água e acima da cmc o pK_{app} é também aproximadamente independente do valor da concentração de SDS e apresenta um valor maior.

Numa primeira análise, estes resultados sugerem a existência de uma interação entre a forma protonada do *diazepam* (HDZP⁺) e o SDS, que faz diminuir as repulsões electrostáticas entre os grupos polares do SDS, o que por sua vez provoca a diminuição da concentração micelar crítica.

O aumento do pK_{app} dever-se-á à estabilização da forma protonada do DZP, por formação de um par iónico ou de uma ligação de hidrogénio com o grupo sulfato do SDS. Este tipo de interações provoca normalmente um desvio batocrómico do λ_{\max} , e aumento das absorptividades molares, o que se verifica para estes resultados experimentais.⁷⁶

ERRATA

página	linha	onde se lê	deve ler-se
8	1	5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona	5-fenil-1,4-benzodiazepina
19	5 e legenda da figura nº1.1	5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona	5-fenil-1,4-benzodiazepina
39	eq. 1.14	$ HB _b + HB _f$	$ HB^+ _b + HB^+ _f$
45	22	$\Delta G = -RT \ln K$	$\Delta G^\circ = -RT \ln K$
51	2, 18	$25 \pm 0,1$	$25,0 \pm 0,1$
55	13	gases reais	gases ideais
57	23	$A = -Ve 10^{KF/2,303RT}$	$A = -CbVe 10^{KF/2,303RT}$
94	16	$517 \pm 97,8$	517 ± 98
96	18	$192 \pm 9,43 e - 6,24 \pm 0,978$	$192 \pm 9 e - 6,24 \pm 0,98$
98	4	$818 \pm 53,9 e 26,7 \pm 4,58$	$818 \pm 54 e 26,7 \pm 4,6$
99	5	$278 \pm 93,9 \dots 1,33 \times 10^4 \pm 652$	$278 \pm 94 \dots 1,33 \times 10^4 \pm 6,52 \times 10^2$
99	6	$278 \pm 8,46$	278 ± 8
99	7	$23,7 \pm 7,57 \dots 240 \pm 51,3$	$23,7 \pm 7,6 \dots 240 \pm 51$