



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

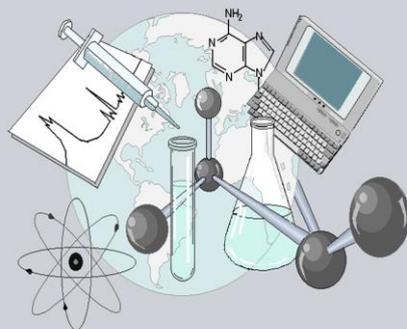
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FERNANDO RODRIGUES DE CARVALHO**

**“Estudo Eletroquímico da Dinâmica Molecular de  
Fenotiazínicos em Solução Aquosa e em Estruturas  
Supramoleculares”**

**CCE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, DEZEMBRO /2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

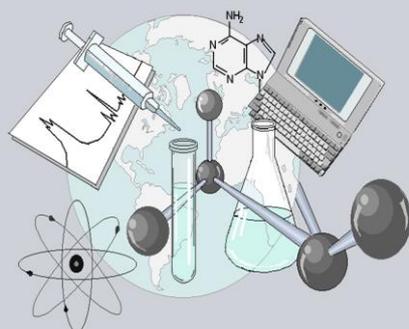
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo Eletroquímico da Dinâmica Molecular de  
Fenotiazínicos em Solução Aquosa e em Estruturas  
Supramoleculares”**

Tese apresentada por **Fernando Rodrigues de Carvalho** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Rafael da Silva



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, DEZEMBRO /2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C331e Carvalho, Fernando Rodrigues de  
Estudo eletroquímico da dinâmica molecular de  
fenotiazínicos em solução aquosa e em estruturas  
supramoleculares / Fernando Rodrigues de Carvalho --  
Maringá, 2016.  
189 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rafael da Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de  
Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

1. Fenotiazínicos. 2. Copolímeros. 3. Coeficiente  
de difusão. 4. Eletroquímica. 5. Estrutura  
molecular. 6. Estudo fotofísico. I. Silva, Rafael  
da, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.  
Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 23.ed. 541

MRP - 003538



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Fernando Rodrigues de Carvalho**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 09 de dezembro de 2016.

**COMISSÃO JULGADORA:**

**Prof. Dr. Rafael da Silva**  
PRESIDENTE - DQI/UEM

**Prof. Dr. Wilker Caetano**  
MEMBRO - DQI/UEM

**Prof. Dr. Adley Forti Rubira**  
MEMBRO - DQI/UEM

**Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia**  
MEMBRO - DQI/UEL

**Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki**  
MEMBRO - UNESP

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese primeiramente ao Pai Celestial que me concedeu a capacidade e desejo de buscar conhecimento. À minha eterna e querida esposa Nancy, que me apoiou neste longo trajeto, tendo paciência, me ouvindo, incentivando e me ajudando a alcançar meus objetivos. À meus estimados filhos, Beatriz, Laura, Benjamin e Levi que brincavam do meu lado muitas vezes enquanto eu trabalhava, e sem saber muito o que estava acontecendo, tinham paciência de esperar para brincar depois que eu terminasse. À minha mãe Maria e a meu Pai Fidelfino, que sem eles eu não estaria nesta vida mortal passando pelas experiências, que como esta, me ajudaria a ter uma visão mais ampliada da ciência.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Rafael da Silva, por todas as discussões científicas, pelo exemplo de pesquisador e excelência na pesquisa, pela confiança e boa vontade de me ajudar a progredir como pesquisador. Acima de tudo, por ser um grande amigo e em muitas vezes um irmão.*

*Ao Prof. Dr. Wilker Caetano, também por todas as discussões científicas, ensinamentos, apoio e compreensão. Pela amizade, incentivo mesmo na correria do dia a dia.*

*Ao Prof. Vagner Roberto de Souza, pelos ensinamentos eletroquímicos, que despertou em mim a curiosidade e interesse neste magnífico tema.*

*A meu amigo Dr. Ricardo H. Gonçalves, pelas ótimas discussões eletroquímicas, risadas e exemplo de pesquisador.*

*A todos os demais professores do Departamento de Química da UEM que contribuíram com minha formação.*

*Aos colegas do Grupo NUPESF pela boa convivência, ensinamentos e ajuda em executar algumas medidas.*

*Aos colegas do bloco 23 por todas as vezes que realizei experimentos no DLS.*

*Aos alunos de IC, Guilherme, Amanda e Eduardo, pela grande ajuda na execução de alguns experimentos.*

*A todos os alunos e funcionários do Departamento de Química pela convivência agradável.*

# VALORES

Uma revelação dada ao **Profeta Joseph Smith** em 1843 disse: “qualquer princípio de inteligência que alcançarmos nesta vida, surgirá conosco na ressurreição. E se nessa vida uma pessoa, por sua diligência e obediência, adquirir mais conhecimento e inteligência do que outra, ela terá tanto mais vantagem no mundo futuro”.

*(Doutrina e Convênios 130:18-19)*

O **Profeta David O. McKay** ensinou: “nenhum sucesso na vida compensa o fracasso no lar”

Para mim, o sucesso na vida é, ou pelo menos deveria ser, o reflexo do sucesso no lar.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	16
ABREVIATURAS.....	16
SÍMBOLOS .....	17
RESUMO .....	19
ABSTRACT .....	21
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>23</b>
INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1 Conceitos fundamentais da voltametria .....	26
1.2 Modelos de dupla camada elétrica.....	29
1.3 Corrente faradaica e leis de Fick .....	32
1.4 Teoria de Butler-Volmer.....	34
1.5 Voltametria Cíclica (VC).....	40
1.6 Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).....	42
1.7 Espectroscopia de absorção .....	45
1.6 Espectroscopia de emissão de fluorescência.....	46
1.9 Anisotropia de fluorescência estática.....	48
1.10 Espalhamento de luz ressonante (RLS) .....	49
1.11 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	50
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>52</b>
ELUCIDAÇÃO DE ESTRUTURAS UNIDIMENSIONAIS SUPRAMOLECULARES FORMADAS POR EMPILHAMENTO $\pi$ - $\pi$ DE FENOTIAZÍNICOS EMPREGANDO VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL .....	52
2.1 INTRODUÇÃO .....	53
2.2 MATERIAIS E METODOLOGIA.....	58
2.2.1 Materiais .....	58
2.2.2 Metodologia.....	59
2.2.2.1 Preparo das soluções .....	59

2.2.2.2	Caracterização eletroquímica .....	59
2.2.2.3	Estimativa dos coeficientes de difusão.....	60
2.2.2.4	Espectroscopia UV-Visível .....	61
2.2.2.5	Espectroscopia de fluorescência e RLS .....	61
2.4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	61
2.4.1	<i>Avaliação do efeito de adsorção dos fenotiazínicos</i> .....	61
2.4.2	<i>Caracterização eletroquímica do AO e AM em meio aquoso</i> .....	65
2.4.3	<i>Estudo da reversibilidade</i> .....	68
2.4.4	<i>Estudo da autoagregação do AO e AM em meio aquoso</i> .....	71
2.4.5	<i>Estimativas dos parâmetros cinéticos: coeficientes de transferência de elétrons (<math>\alpha</math>) e constantes de velocidades de reação da superfície (<math>k_s</math>)</i> .....	77
2.4.6	<i>Estimativas dos coeficientes de difusão</i> .....	79
2.5	<b>CONCLUSÃO PARCIAL</b> .....	85
<b>CAPITULO 3</b> .....		<b>87</b>
AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO FORMADOS ENTRE CICLODEXTRINAS E FERROCENO .....		
		87
3.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	88
3.2	<b>MATERIAIS E METODOLOGIA</b> .....	91
3.2.1	Materiais .....	91
3.2.2	Metodologia.....	91
3.2.2.1	Preparo das soluções e composto de inclusão .....	91
3.2.2.2	Caracterização eletroquímica e estimativa do coeficiente de difusão ...	92
3.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	92
3.3.1	<i>Caracterização eletroquímica e reversibilidade</i> .....	92
3.3.2	<i>Estimativa do coeficiente de difusão</i> .....	95
3.3.3	<i>Efeito da concentração sobre o coeficiente de difusão aparente</i> .....	97
3.4	<b>CONCLUSÃO PARCIAL</b> .....	98
<b>CAPÍTULO 4</b> .....		<b>99</b>
ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AZUL DE ORTOTOLUIDINA E COPOLÍMEROS DO TIPO P-123 E F-127: UMA ABORDAGEM ELETROQUÍMICA.....		
		99
4.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	100
4.2	<b>MATERIAIS E METODOLOGIA</b> .....	104

4.2.1 Materiais .....	104
4.2.2 Metodologia.....	105
4.2.2.1 Preparo das soluções e formulados .....	105
4.2.2.2 Caracterização eletroquímica .....	105
4.2.2.3 Determinações das constantes de ligação ( $K_b$ ).....	106
4.2.2.4 Estimativa dos coeficientes de difusão aparente .....	107
4.2.2.5 Avaliação do efeito temporal na ligação do AO .....	107
4.2.2.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	107
4.3 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	107
4.3.1 <i>Caracterização eletroquímica</i> .....	107
4.3.2 <i>Reversibilidade dos sistemas</i> .....	110
4.3.3 <i>Estudo de estabilidade eletroquímica dos formulados</i> .....	112
4.3.4 <i>Determinações das constantes de ligação</i> .....	114
4.3.5 <i>Estimativas dos parâmetros cinéticos: coeficientes de transferência de elétrons (<math>\alpha</math>) e constantes de velocidades de reação da superfície (<math>k_s</math>)</i> .....	116
4.3.6 <i>Estimativas dos coeficientes de difusão aparente</i> .....	119
4.3.7 <i>Efeito temporal da interação do AO</i> .....	123
4.4 <i>CONCLUSÃO</i> .....	125
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>126</b>
AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA NO PROCESSO DE AUTOAGREGAÇÃO DE PLURONICS® DO TIPO P-123 E F-127 E TERMODINÂMICA DE LIGAÇÃO COM AZUL DE ORTOTOLUIDINA .....	
.....	126
5.1 <i>INTRODUÇÃO</i> .....	127
5.2 <i>MATERIAIS E MÉTODOLOGIA</i> .....	132
5.2.1 Materiais .....	132
5.2.2 Metodologia.....	132
5.2.2.1 Preparo das soluções e formulados .....	132
5.2.2.2 Avaliação do efeito da temperatura sobre os copolímeros.....	132
5.2.2.3 Voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD)...	133
5.2.2.4 Estimativa dos coeficientes de difusão aparente .....	133
5.2.2.5 Determinações das constantes de ligação.....	133
5.2.2.6 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos de ligação .....	133
5.3 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	134

5.3.1 <i>Avaliação do efeito da temperatura</i> .....	134
5.3.2 <i>Estimativas dos parâmetros termodinâmicos</i> .....	138
5.4 <i>CONCLUSÃO PARCIAL</i> .....	147
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>12648</b>
ESTUDO FOTOFÍSICO DA INTERAÇÃO FENOTIAZÍNICO-POLAXAMERO: IMPLICAÇÕES NO PROCESSO DE AUTOAGREGAÇÃO DE COPOLÍMERO COLOIDAL EM SOLUÇÃO .....	148
6.1 <i>INTRODUÇÃO</i> .....	149
6.2 <i>MATERIAIS E METODOLOGIA</i> .....	150
6.2.1 <i>Materiais</i> .....	150
6.2.2 <i>Metodologia</i> .....	150
6.2.2.1 <i>Preparo das soluções e formulados</i> .....	150
6.2.2.2 <i>Avaliação do efeito da temperatura sobre os copolímeros</i> .....	150
6.2.2.3 <i>Espectroscopia UV-Visível</i> .....	151
6.2.2.4 <i>Espectroscopia de fluorescência</i> .....	151
6.2.2.5 <i>Anisotropia de fluorescência (r)</i> .....	151
6.2.2.6 <i>Espalhamento de luz ressonante (RLS)</i> .....	151
6.2.2.7 <i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	151
6.3 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	152
6.3.1 <i>UV-Vis</i> .....	152
6.3.2 <i>Fluorescência</i> .....	156
6.3.3 <i>Anisotropia de fluorescência (r)</i> .....	161
6.3.4 <i>RLS</i> .....	163
6.3.5 <i>DLS</i> .....	166
6.4 <i>CONCLUSÃO PARCIAL</i> .....	170
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>172</b>
CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	172
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>174</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Níveis de energia de uma espécie genérica A sofrendo oxidação ou redução na superfície do ET. Adaptado de Gosser (Gosser 1993). .....	27
<b>Figura 1.2.</b> Representação do conjunto de etapas que resulta na medida voltamétrica. 28	
<b>Figura 1.3.</b> Representação da dupla camada elétrica dos modelos de Helmholtz, Gouy-Chapman, Stern, Grahame, e Bockris, Devanathan e Muller. ....	31
<b>Figura 1.4.</b> Representação do conjunto de etapas que resulta na medida voltamétrica. 35	
<b>Figura 1.5.</b> Transferência de elétrons de um ET metálico inerte. O potencial aplicado no mesmo altera o nível de energia mais elevado, $E_F$ , facilitando a redução (esquerda) ou a oxidação (direita). ....	36
<b>Figura 1.6.</b> Efeito de uma variação no potencial aplicado ao eletrodo na redução de O para R. ....	37
<b>Figura 1.7.</b> Simetrias das barreiras de ativação para os casos: <b>A)</b> $\alpha < 0,5$ ; <b>B)</b> $\alpha = 0,5$ ; <b>C)</b> $\alpha > 0,5$ . ....	38
<b>Figura 1.8.</b> <b>A)</b> Sinal de excitação. <b>B)</b> Corrente resultante. ....	40
<b>Figura 1.9.</b> Esquema da cela eletroquímica empregada nos experimentos deste trabalho. ET = eletrodo de trabalho, ER = eletrodo de referência e EA = eletrodo auxiliar. ....	42
<b>Figura 1.10.</b> <b>A)</b> Sinal de excitação. <b>B)</b> Corrente resultante. ....	43
<b>Figura 1.11.</b> Variação da corrente faradaica e capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso. ....	44
<b>Figura 1.12.</b> Níveis de energia de uma molécula diatômica simples. ....	45
<b>Figura 1.13.</b> Diagrama de Jablonski representando processos de absorção de radiação, processos não radioativos e radioativos. ....	47
<b>Figura 1.14.</b> Representação de medida de DLS por PCS em uma amostra com partículas grandes e outra com partículas pequenas. A intensidade de luz espalhada em medida em função do tempo. ....	51
<b>Figura 2.1.</b> Estrutura molecular do AO ( <b>A</b> ) e AM ( <b>B</b> ). ....	56
<b>Figura 2.2.</b> Formas estruturais no processo redox do AO em função do pH (Hoffmann, Dias et al. 2007). ....	57
<b>Figura 2.3.</b> Formas estruturais no processo redox do AO em função do pH (Ong, Toorisaka et al. 2005). ....	58
<b>Figura 2.4.</b> Plot $i_{pc}$ versus $v^{1/2}$ . <b>A)</b> Baixa concentração de fenotiazínico ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). <b>B)</b> Alta concentração de fenotiazínico ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). ....	62

<b>Figura 2.5.</b> VC do AO (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso, 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl e T = 30,0 °C. <b>A)</b> Vários ciclos. <b>B)</b> $i_p$ em função do número de ciclos. ....	63
<b>Figura 2.6.</b> Plot $\log(\text{Chen, Stepanenko et al.})$ versus $\log(v)$ . <b>A)</b> e <b>B)</b> Para o AO. <b>C)</b> e <b>D)</b> Para o AM. ....	64
<b>Figura 2.7.</b> Plot $i_p$ versus $v$ . <b>A)</b> Para o AO. <b>B)</b> Para o AM. ....	65
<b>Figura 2.8.</b> <b>A)</b> Equilíbrio redox do AO em pH > 5. <b>B)</b> Equilíbrio redox do AM em pH > 5,6 (Hoffmann, Dias <i>et al.</i> 2007, Ong, Toorisaka <i>et al.</i> 2005). ....	66
<b>Figura 2.9.</b> Eletroquímica dos fenotiazínicos (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso, KCl (0,1 mol $\text{L}^{-1}$ ) e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e T = 30,0 °C. <b>A)</b> VC. <b>B)</b> VPD. ....	66
<b>Figura 2.10.</b> Eletroquímica dos fenotiazínicos (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso, KCl 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e T = 30,0 °C <b>A)</b> VC. <b>B)</b> VPD. ....	67
<b>Figura 2.11.</b> VC dos fenotiazínicos (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso, KCl (0,1 mol $\text{L}^{-1}$ ), variando a velocidade de varredura (10 - 200 $\text{mV s}^{-1}$ ) e T = 30,0 °C. <b>A)</b> AO; <b>B)</b> AM; <b>C)</b> Plot de $i_{pc}$ versus $v^{1/2}$ (6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e <b>D)</b> Plot de $i_{pc}$ versus $v^{1/2}$ (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). ....	68
<b>Figura 2.12.</b> Modulo da razão entre as correntes de picos ( $ i_{pa}/i_{pc} $ ) versus velocidade de varredura, para os fenotiazínicos (6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). ....	70
<b>Figura 2.13.</b> Espectros de absorvidade molar em função do comprimento de onda a 30,0 °C e 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl. <b>A)</b> AO e <b>B)</b> AM. ....	71
<b>Figura 2.14.</b> Absortividade molar e razão das absorvidades molares em função da concentração de fenotiazínico. ....	72
<b>Figura 2.15.</b> Representação de autoagregados (dímeros) baseado na teoria do éxiton (Kasha, Rawls <i>et al.</i> 1965). ....	73
<b>Figura 2.16.</b> Espectros de emissão de fluorescência em função da concentração, $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm}$ , T = 30,0 °C e 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl. A emissão foi coletada no pico de máxima emissão. <b>A)</b> e <b>B)</b> Referente ao AO. <b>C)</b> e <b>D)</b> Referente ao AM. ....	73
<b>Figura 2.17.</b> Espectros de emissão de fluorescência em função da concentração do AO e AM, $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm}$ , T = 30,0 °C e 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl. ....	75
<b>Figura 2.18.</b> Espectros de RLS em função da concentração de fenotiazínicos em água, 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl e T = 30,0 °C. $\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$ (AO), $\lambda_{em} = 640 \text{ nm}$ (AM), $\lambda_{RLS} = 760 \text{ nm}$ (fenotiazínicos) e delta ( $\Delta$ ) = 5 nm. <b>(A)</b> , <b>(C)</b> e <b>(E)</b> para o AO e <b>(B)</b> , <b>(D)</b> e <b>(F)</b> para o AM. ....	76
<b>Figura 2.19.</b> Plot de $E_{pc}$ versus $\ln v$ para o AO e AM em meio aquoso a 30,0 °C. ....	77

<b>Figura 2.20.</b> A) Plot de $\alpha$ versus [fenotiazínico]. B) Plot de $k_s$ versus [fenotiazínico].	78
<b>Figura 2.21.</b> VPD em meio aquoso, 0,1 mol L <sup>-1</sup> de KCl e T = 30,0°C para o AO (A) e AM (B) a diferentes concentrações aumentando de 0,3 - 400 μmol L <sup>-1</sup> e plot de $i_{pc}$ em função da concentração para a AO (C) e AM (D).	80
<b>Figura 2.22.</b> Coeficiente de difusão ( $D$ ) dos fenotiazínicos em função da concentração em meio aquoso, 0,1 mol L <sup>-1</sup> de KCl e T = 30,0°C. A) AO e B) AM.	80
<b>Figura 2.23.</b> A) Valores de raio hidrodinâmico relativo ( $R_H^r$ ) em função da concentração de fenotiazínicos. B) Representação esquemática do processo de auto agregação com i) representando o processo de agregação inicial representada na CAC, em seguida, ii) crescimento unidimensional do agregado via empilhamento molecular e iii) um colapso do empilhamento unidimensional dos agregados através de uma transição de fase formando grupos de agregados mais compactos.	82
<b>Figura 2.24.</b> SAXS para os fenotiazínicos em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de KCl e 30,0 °C. A) AO e B) AM.	84
<b>Figura 3.1.</b> Estruturas químicas das CDs.	88
<b>Figura 3.2.</b> Estrutura molecular do ferroceno ([Fe(η <sup>5</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> )]—composto sanduíche.	90
<b>Figura 3.3.</b> Representação dos compostos de inclusão entre ferroceno e as ciclodextrinas.	90
<b>Figura 3.4.</b> VC do Fc (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) na mistura água/etanol (40%) e em meio aquoso encapsulado na β-CD e γ-CD, KCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> ), v = 50 mV s <sup>-1</sup> e T = 30,0 °C.	93
<b>Figura 3.5.</b> Voltamogramas cíclicos dos sistemas em KCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> ), variando a velocidade de varredura (10 - 1000 mV s <sup>-1</sup> ). A) e B) Fc (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ), em meio de água com 40 % de etanol. C) e D) Fc (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) + β-CD (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) em meio aquoso. E) e F) Fc (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) + γ-CD (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) em meio aquoso.	95
<b>Figura 3.6.</b> Coeficiente de difusão estimado por VPD em função da concentração. A) Para o complexo de inclusão β-CD/Fc. B) Para os fenotiazínicos.	97
<b>Figura 4.1.</b> Representação de um agente tensoativo.	100
<b>Figura 4.2.</b> Representação da formação de micelas. Equilíbrio dinâmico.	101
<b>Figura 4.3.</b> Estrutura dos surfactantes Pluronic®: A) P-123 e B) F-127.	102
<b>Figura 4.4.</b> Representação da formação de micelas de copolímero tribloco. Equilíbrio dinâmico.	103
<b>Figura 4.5.</b> Representação da rota de confecção dos formulados.	105

<b>Figura 4.6.</b> VC do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e incorporado nos copolímeros: P-123 (8%), F-127 (8%) e TX ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . .....	108
<b>Figura 4.7.</b> Equilíbrio redox do AO em $\text{pH} > 5$ . .....	109
<b>Figura 4.8.</b> Avaliação da reversibilidade do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) encapsulado nos copolímeros (8%), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> e <b>B)</b> AO/ $\text{H}_2\text{O}$ . <b>C)</b> e <b>D)</b> AO/P-123. <b>E)</b> e <b>F)</b> AO/F-127. ....	111
<b>Figura 4.9.</b> Voltametria cíclica de 30 ciclos consecutivos para o AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e para os sistemas formulados em copolímeros (8%), KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> AO/P-123. <b>B)</b> AO/F-127. ....	112
<b>Figura 4.10.</b> Voltametria cíclica de 30 ciclos consecutivos do AO ( $35$ e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e em meio de TX ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> AO sem TX. <b>B)</b> AO com TX. ....	113
<b>Figura 4.11.</b> Variação da corrente catódica do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) nos VPD com adição de copolímero, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $t_m = 0,1 \text{ s}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> VPD para AO/P-123. <b>B)</b> Curva de corrente em função da [P-123]. <b>C)</b> VPD para AO/F-127. <b>B)</b> Curva de corrente em função da [P-127]. ....	114
<b>Figura 4.12.</b> Representação do equilíbrio termodinâmico do AO ligado a micela de copolímero. ....	116
<b>Figura 4.13.</b> Estimativa dos parâmetros cinéticos do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso e copolímeros (8%), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> Plot $E_{pc}$ versus $\nu$ . <b>B)</b> Plot $E_{pc}$ versus $\ln \nu$ . ....	117
<b>Figura 4.14.</b> Estimativa do $D_{ap}$ para o AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso e em copolímeros (8%), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> Variação do tempo de modulação ( $t_m$ ) para o sistema AO/P-123. <b>B)</b> Plot de $i_{pc}$ versus $1/(t_m)^{1/2}$ . ....	119
<b>Figura 4.15.</b> Equilíbrios dinâmicos existentes nos sistemas: equilíbrio monômero e autoagregado de AO, equilíbrio autoagregado de AO e unímeros e equilíbrio unímeros com AO e micela. ....	122
<b>Figura 4.16.</b> Efeito do tempo na interação do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com P-123 (8%), KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> VC do AO em P-123 por adição direta em função do tempo. <b>B)</b> VCs do AO em P-123 por adição direta comparando com AO em P-123 formulado. ....	123

<b>Figura 4.17.</b> Efeito do tempo na interação do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com copolímeros (8%), por adição direta, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . <b>A)</b> Plot de $i_{pa}$ versus tempo. <b>B)</b> Plot de $E_{pa}$ versus tempo. ....	124
<b>Figura 5.1.</b> Representação esquemática dos possíveis formatos dos copolímeros tribloco PEO-PPO-PEO. ....	130
<b>Figura 5.2.</b> Efeito da temperatura sobre os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímero (8%) formulados, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Para VC, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e VPD, $t_m = 0,1 \text{ s}$ . <b>A)</b> VC, $i_{pa}$ versus Temperatura. <b>B)</b> VPD, $i_{pc}$ versus Temperatura. <b>C)</b> VPD, $D_{ap}$ versus Temperatura. <b>D)</b> VPD, $E_{1/2}$ versus Temperatura. ....	135
<b>Figura 5.3.</b> Curvas de variação da corrente catódica do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em função da [copolímero], ajustada pela Equação 4.1, em várias temperaturas, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $t_m = 0,1 \text{ s}$ . ....	138
<b>Figura 5.4.</b> Plot de van't Hoff para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros. ....	141
<b>Figura 5.5.</b> Plot de van't Hoff para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros. ....	142
<b>Figura 5.6.</b> Plot de $\Delta G^\circ$ versus T para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros. ...	143
<b>Figura 5.7.</b> Plot de $\Delta G^\circ$ versus T para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros. ...	143
<b>Figura 5.8.</b> Representação do equilíbrio do AO ligado a unímeros, abaixo da TMC. ....	144
<b>Figura 5.9.</b> Representação do equilíbrio do AO ligado a micela. ....	145
<b>Figura 6.1.</b> Variação da absorbância do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em copolímeros (8%) com a temperatura, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . <b>A)</b> e <b>B)</b> Sistema AO/P-123. <b>C)</b> e <b>D)</b> Sistema AO/F-127. A Figura inserida é uma ampliação da região referente ao sinal de agregado. ....	153
<b>Figura 6.2.</b> Variação da absorbância do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura, em meio aquoso e em copolímeros (8%) com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. ....	154
<b>Figura 6.3.</b> Variação da absorbância do AO ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura, em meio de copolímeros (8%) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. ....	155
<b>Figura 6.4.</b> Variação da intensidade de emissão e no comprimento de onda do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura em meio de copolímeros (8%), KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . $\lambda_{excitação} = 560 \text{ nm}$ e $\lambda_{emissão} = 676 \text{ nm}$ . ....	156
<b>Figura 6.5.</b> Variação no comprimento de onda do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura em meio aquoso e de copolímeros (8%), KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . $\lambda_{excitação} = 560 \text{ nm}$ e $\lambda_{emissão} = 676 \text{ nm}$ . ....	158

<b>Figura 6.6.</b> Variação da intensidade de emissão e no comprimento de onda do AO (6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura em meio de copolímeros (8%), KCl 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ . $\lambda_{\text{excitação}} = 560 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 676 \text{ nm}$ . .....	159
<b>Figura 6.7.</b> Variação da anisotropia de fluorescência (r) do AO com a temperatura em copolímeros (8%), KCl 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ . $\lambda_{\text{excitação}} = 600 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 646 \text{ nm}$ . <b>A)</b> [AO] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <b>B)</b> [AO] = 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . .....	161
<b>Figura 6.8.</b> Avaliação da intensidade do espalhamento de luz (RLS) em função da temperatura, 8% dos copolímeros e 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ de KCl, $\lambda_{\text{RLS}} = 400$ . <b>A)</b> RLS do AO/P-123, [AO] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <b>B)</b> RLS do AO/F-123, [AO] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <b>C)</b> RLS <i>versus</i> temperatura do AO/P-123, [AO] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <b>D)</b> RLS <i>versus</i> temperatura do AO/f-127, [AO] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <b>E)</b> RLS <i>versus</i> temperatura do AO/P-123, [AO] = 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <b>F)</b> RLS <i>versus</i> temperatura do AO/F-127, [AO] = 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . .....	164
<b>Figura 6.9.</b> Variação do coeficiente de difusão das micelas de copolímeros (8%) com a temperatura, na presença e na ausência de AO (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ de KCl. ..	166
<b>Figura 6.10.</b> Medidas de DLS de copolímeros (8%) a 30,0 °C, na presença e na ausência de AO (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ de KCl. ....	168
<b>Figura 6.11.</b> Medidas de DLS de copolímeros (8%) em função da temperatura, na presença de AO (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ de KCl. <b>A)</b> AO/P-123. <b>B)</b> AO/F-127. ....	169

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1.</b> Parâmetros eletroquímicos ( $E_p$ , $E_{1/2}$ , $n\Delta E_p$ e $i_{pa}/i_{pc}$ ) dos fenotiazínicos ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso e em várias $v$ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	70
<b>Tabela 3.1.</b> Algumas propriedades e dimensões das três CDs mais comuns (Miranda, Martins et al. 2011). ....	89
<b>Tabela 3.2.</b> Parâmetros eletroquímicos ( $E_p$ , $E_{1/2}$ , $n\Delta E_p$ e $i_{pa}/i_{pc}$ ) do Fc ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na mistura água/etanol (40%) e em meio aquoso encapsulado na $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD, KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	94
<b>Tabela 3.3.</b> Valores de coeficientes de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) do ferroceno na mistura água/etanol (40%) e em meio aquoso, encapsulado na $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD, KCl, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	96
<b>Tabela 4.1.</b> Parâmetros eletroquímicos ( $E_p$ , $E_{1/2}$ , $n\Delta E_p$ e $i_{pa}/i_{pc}$ ) do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso, em copolímeros (8%) e TX ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	109
<b>Tabela 4.2.</b> Valores $K_b$ , $\Delta G^\circ$ e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para AO/copolímeros, com $[\text{AO}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	115
<b>Tabela 4.3.</b> Parâmetros cinéticos, $\alpha$ e $k_s$ do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso e em copolímeros (8%), potencial formal ( $E^\circ$ ) e coeficiente de correlação ( $R$ ), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	117
<b>Tabela 4.4.</b> Valores de $D_{ap}$ e $D$ estimados por VPD e DLS, respectivamente, do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e incorporado nas micelas de copolímeros (8%), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	120
<b>Tabela 5.1.</b> Propriedades dos copolímeros P-123 e F-127 (Alexandridis, Holzwarth <i>et al.</i> 1994, Wanka, Hoffmann <i>et al.</i> 1994). ....	131
<b>Tabela 5.2.</b> Valores de TMC para os copolímeros (8%) com AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. ....	136
<b>Tabela 5.3.</b> Valores de constante de ligação ( $K_b$ ) e variação da energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ) em várias temperaturas, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $t_m = 0,1 \text{ s}$ . ....	141
<b>Tabela 5.4.</b> Parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ , $\Delta H^\circ$ e $\Delta S^\circ$ ) em várias temperaturas, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127. ....	144
<b>Tabela 6.1.</b> Valores de TMC para os copolímeros (8%) com AO em baixa ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e alta ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, empregando-se várias técnicas. ....	166

<b>Tabela 6.2.</b> Valores dos raios hidrodinâmicos ( $R_H$ ) (Kadam, Yerramilli et al. 2009) das micelas de copolímeros (8%) na presença e ausência de AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl a $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . .....	167
<b>Tabela 6.3.</b> Valores de TMC para os copolímeros (8%) com AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, empregando-se várias técnicas. ....	170

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

### Abreviaturas

AM	Azul e metileno
AO	Azul de ortotoluidina
Ads	Adsorção
CMC	Concentração micelar crítica
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistema
CD	Cicloextrina
Cp	Ciclopentadienil
Des	Dessorção
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
RLS	Espalhamento de luz ressonante
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
EA	Eletrodo auxiliar
ET	Eletrodo de trabalho
ER	Eletrodo de referência
Fc	Ferroceno
Fluo	Fluorescência
Fosf	Fosforecência
HOMO	Orbital de maior energia ocupado
LUMO	Orbital de maior energia desocupado
OHP	Plano exterior de Helmholtz
IHP	Plano interior de Helmholtz
TMC	Temperatura micelar crítica
TX	Triton X-100
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencia
RV	Relaxação vibracional

## Símbolos

$A$	Área do eletrodo
$\varepsilon$	Absortividade molar
$\Delta E$	Amplitude do pulso
$\Gamma$	Concentração de espécies adsorvida na superfície do eletrodo
$l$	Caminho ótico
$S_1$	Corrente antes da aplicação do pulso
$S_2$	Corrente depois da aplicação do pulso
$i_p$	Corrente de pico
$i_{pc}$	Corrente de pico catódica
$i_{pa}$	Corrente de pico anódica
$i_c$	Corrente capacitiva
$i_F$	Corrente faradaica
$[R]_{sup}$	Concentração da espécie reduzida na superfície do eletrodo
$[O]_{sup}$	Concentração da espécie oxidada na superfície do eletrodo
$\alpha$	Coefficiente de transferência de carga
$k$	Constante de velocidade
$k_d$	Coefficiente de transferência de massa
$k_a$	Constante de velocidade do processo anódico
$k_c$	Constante de velocidade do processo catódico
$k_s$	Constante de velocidade de reação da superfície do eletrodo
$k_o$	Constante de velocidade padrão de reação da superfície do eletrodo
$k_h$	Constante de velocidade heterogênea
$D$	Coefficiente de difusão
$D_o$	Coefficiente de difusão translacional
$D_{ap}$	Coefficiente de difusão aparente
$D_{livre}$	Coefficiente de difusão da espécie livre
$D_{agr}$	Coefficiente de difusão da espécie agregada
$D_{uni}$	Coefficiente de difusão da espécie ligada a unímeros
$D_{mic}$	Coefficiente de difusão da espécie incorporada na micela
$F$	Constante de Faraday
$k$	Constante de Boltzmann
$j$	Densidade de corrente
$S_o$	Estado fundamental singlete

O	Espécie oxidada
R	Espécie reduzida
O <sub>sup</sub>	Espécie oxidada na superfície do eletrodo de trabalho
O <sub>ad</sub>	Espécie oxidada adsorvida na superfície do eletrodo de trabalho
R <sub>sup</sub>	Espécie reduzida na superfície do eletrodo de trabalho
O <sub>dess</sub>	Espécie oxidada dessorvida na superfície do eletrodo de trabalho
R <sub>Bulk</sub>	Espécie reduzida no Bulk (seio da solução)
O <sub>Bulk</sub>	Espécie oxidada no Bulk (seio da solução)
G	Energia de Gibbs
E <sub>F</sub>	Nível de Fermi
n	Número de elétrons
A	Fator pré-exponencial
I	Intensidade da luz transmitida
S <sub>1</sub>	Primeiro estado excitado singlete
T <sub>1</sub>	Primeiro estado excitado triplete
E <sub>pc</sub>	Potencial de pico catódico
E <sub>pa</sub>	Potencial de pico anódico
E <sub>1/2</sub>	Potencial de meia onda
R <sub>H</sub>	Raio hidrodinâmico
S <sub>2</sub>	Segundo estado excitado singlete
t <sub>m</sub>	Tempo de modulação
ΔE <sub>p</sub>	Variação de potencial de pico
v	Velocidade de varredura
ΔG <sup>*</sup>	Variação da energia de Gibbs de ativação
ΔG <sup>°</sup>	Variação da energia de Gibbs padrão
ΔH <sup>*</sup>	Variação da entalpia de ativação
ΔH <sup>°</sup>	Variação da entalpia padrão
ΔS <sup>*</sup>	Variação da entropia de ativação
ΔS <sup>°</sup>	Variação da entropia padrão
μ	Viscosidade do meio

## Resumo

O estudo da dinâmica molecular de espécies em solução fornece informações valiosas para compreender as propriedades macroscópicas dos sistemas. No presente trabalho, faz-se um estudo eletroquímico mostrando a riqueza de informações extraídas empregando técnicas eletroquímicas. As técnicas eletroquímicas consolidaram e forneceram novas informações sobre os sistemas estudados, que são os fenotiazínicos em meio aquoso e em meio de copolímeros de P-123 e F-127.

A autoagregação via empilhamento molecular de fenotiazínicos (azul de metileno e azul de ortotoluidina) em meio aquoso pode ser monitorado via técnicas eletroquímicas, o qual permite visualizar o crescimento de agregados pequenos até a formação de estruturas supramoleculares, através do efeito da concentração sobre o coeficiente de difusão dos fenotiazínicos. Compostos de inclusão (entre ferroceno e ciclodextrinas) foram empregados para confirmar os resultados obtidos para os fenotiazínicos. A variação da concentração do complexo de inclusão não modificou significativamente seu coeficiente de difusão, devido à elevada solubilidade das ciclodextrinas no meio aquoso, validando os resultados encontrados para os fenotiazínicos.

O Azul de ortotoluidina (AO), foi utilizado para avaliar e compreender o mecanismo de ligação com copolímeros de P-123 e F-127. O AO incorporado nas micelas de copolímeros apresentaram maior reversibilidade e estabilidade eletroquímica. A forma reduzida do AO interagiu mais efetivamente com P-123. O coeficiente de difusão aparente do AO em meio de copolímeros pode ser descrito como a contribuição de quatro parcelas. A ligação do AO aos copolímeros é mais efetiva quando o mesmo é formulado, empregando o método de dispersão sólida, do que quando se faz apenas uma adição direta do AO sobre uma solução de copolímeros.

Com relação à TMC, métodos óticos e de espalhamento de luz são muito empregados na literatura. Contudo, empregou-se o AO como sonda eletroquímica para determinar a TMC do P-123 e F-127 através da variação de algumas propriedades eletroquímicas em função da temperatura, tendo uma excelente concordância com valores da literatura. A termodinâmica de ligação entre o AO e os copolímeros, mostram um comportamento peculiar dos sistemas, onde abaixo da TMC a espontaneidade é conduzida pela entropia e acima da TMC pela entalpia.

A investigação do efeito da temperatura sobre os sistemas AO/copolímeros foi realizada empregando-se técnicas óticas e de espalhamento de luz. Os resultados ajudaram a elucidar o mecanismo de ligação do AO com os copolímeros abaixo e acima da TMC corroborando com resultados eletroquímicos. Adicionalmente, os valores de TMC encontrados pelos métodos óticos e de espalhamento de luz, concordaram com os determinados pelas técnicas eletroquímicas.

**Palavras chave:** Fenotiazínicos, copolímeros, coeficiente de difusão e eletroquímica.

## Abstract

The study of molecular dynamics for species in solution provides valuable information for understanding the macroscopic properties of systems. In this work, electrochemical studies are carried out providing valuable information on the behavior of species in solution. Electrochemical techniques have been very little used, despite having a big number of advantages, such as low cost of equipment and materials. Electrochemical techniques consolidated and provided new information on the studied systems, which are phenothiazines in aqueous medium and copolymers (P-123 and F-127).

The self-aggregation phenothiazines via molecular stacking (methylene blue and toluidine blue) in aqueous medium can be monitored via electrochemical techniques, which allows us you to monitor the growth of smaller aggregates until the formation of supramolecular structures through the phenothiazines diffusion coefficient effect with the concentration. Inclusion compounds between ferrocene and cyclodextrins. were used to confirm the results obtained for phenothiazine, where there was a decrease in diffusion coefficient with the concentration increase. Varying the concentration of inclusion complex did not significantly modify its diffusion coefficient due to the high solubility of cyclodextrins in the aqueous medium, validating the results for the phenothiazines.

The toluidine blue (TB), which is a potential drug was used to evaluate and understand the mechanism of biding with P-123 and F-127 copolymer. Such copolymers can be used in pharmaceutical formulations for medicaments production. The TB incorporated into copolymers micelles showed higher electrochemical reversibility and stability. The reduced form of the TB interacted more effectively with P-123. The TB apparent diffusion coefficient in copolymers can be described as four input portions. The biding between TB and copolymers is more effective when it is formulated, using the solid dispersion method, than when only makes direct addition of TB over a copolymer solution.

With respect to TMC, optical methods and light scattering are widely employed in the literature. However, TB was employed as electrochemical probe was possible to determine the TMC of the P-123 and F-127 by varying some electrochemical properties according to temperature, having excellent agreement with literature values. The binding thermodynamics between the TB and copolymers, show a peculiar behavior of

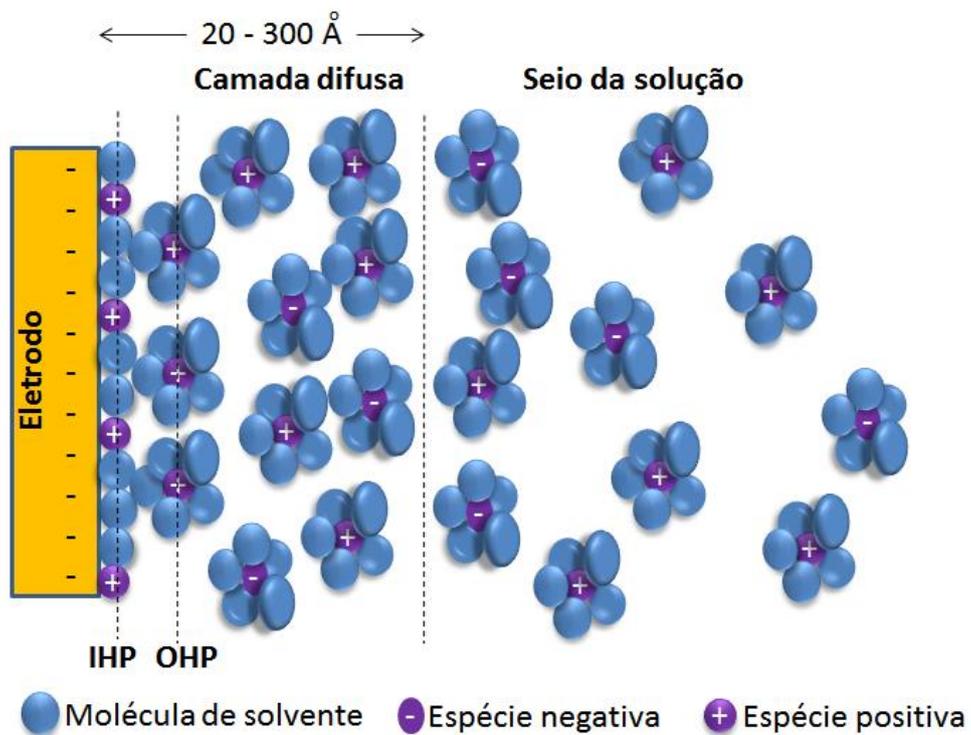
systems where below the TMC the spontaneity is driven by entropy and above, by enthalpy.

The temperature effect on TB/copolymers systems were investigation carried out employing optical and light scattering techniques. The results helped to elucidate the binding mechanism TB with the copolymers above and below the TMC corroborating with electrochemical results. Additionally, TMC values found by optical and light scattering methods, agreed to determined by electrochemical techniques.

**Keywords:** Phenothiazines, copolymers, diffusion coefficient and electrochemistry.

# CAPÍTULO 1

## Introdução Geral



O estudo da dinâmica molecular de espécies em solução tem sido de fundamental importância na compreensão de sistemas em meio aquoso e coloidal. Tais estudos ajudam a compreender interações específicas entre as moléculas e permite prever seu comportamento nestes meios. Parâmetros como autoagregação molecular, coeficiente de difusão, raio hidrodinâmico, comportamento termodinâmico e entre outros, que expressão um comportamento molecular, tem sido cada vez mais importantes e necessários para uma compreensão mais sólida de fenômenos a nível molecular e, por conseguinte, das suas propriedades macroscópicas na natureza.

Várias técnicas são empregadas para se avaliar tais parâmetros, como por exemplo, Espectroscopia de UV-Vis, RLS, DLS, Fluorescência, RMN, FTIR entre outras. Contudo, técnicas eletroquímicas têm sido pouco exploradas para elucidar mecanismos de interação de moléculas em solução, e quando empregada, na maioria dos casos, tem-se um baixo nível de discussão dos fenômenos. Desta forma, um conjunto de técnicas voltamétricas de análises, conhecido pela denominação abrangente de técnicas eletroanalíticas, está sendo cada vez mais utilizada em áreas do conhecimento tão distinta como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química, com o objetivo de se obter informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias (Brainina 1987).

Dentre as várias vantagens destas técnicas estão, curto tempo na realização das análises, baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, se comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a baixa sensibilidade que as técnicas eletroquímicas apresentam em relação à presença de interferentes, fizeram com que elas sejam cada vez mais intensamente utilizadas. Sua crescente importância levou ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis às espécies em estudo, algumas inclusive com limites de detecção tão baixos que já podem ser comparados aos das técnicas tradicionais utilizadas na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e em alimentos, tais como cromatografia, fluorescência, técnicas espectroscópicas em geral e entre outras (Brett and Oliveira-Brett 2011).

Os fenotiazínicos, em geral, são compostos orgânicos heterocíclicos da classe dos fenotiazínicos e apresentam mecanismo redox conhecido na literatura (Ong, Toorisaka et al. 2005, Hoffmann, Dias et al. 2007). Podem atuar na inativação de microorganismos pela formação de oxigênio radicalar e já são empregados em medicamentos de uso clínico como antidepressivos, antihistamínicos e antipsicóticos,

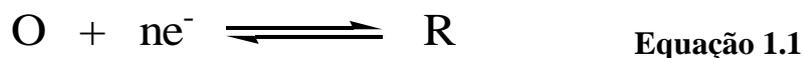
neste ultimo caso, usado desde a década de 1950 (Sudeshna and Parimal 2010, Ohlow and Moosmann 2011).

Fenotiazínicos como o azul de ortotoluidina (AO) e azul de metileno (AM) possuem baixa toxicidade, fazendo com que sejam ingrediente interessante em formulações farmacêuticas e um candidato para ser aplicado em terapias para câncer (Perussi 2007, Peloi, Biondo et al. 2011, Al-Majmaie, Alattar et al. 2012). Além disso, muitos fenotiazínicos são empregados na nanotecnologia, células fotovoltaicas, sensor, nanofotônica, e nanoeletrônica (Shetty, Zhang et al. 1996, Schenning and Meijer 2005, Chen, Lohr et al. 2009). Contudo, a autoagregação molecular do AO pode modificar suas propriedades físico-químicas e fotoquímicas e inviabilizar a aplicação do mesmo nas diversas áreas citadas. Desta forma, no presente trabalho o AO e AM, foram escolhidos como moléculas sondas, devido as suas propriedades foto-físicas e especialmente eletroquímicas favoráveis, para avaliar a autoagregação molecular e formação de macromoléculas de copolímeros do tipo tribloco, que não apresentam atividade ótica nem eletroquímica, o que dificulta seu estudo a nível molecular sem sonda.

Os copolímeros triblocos do tipo PEO-PPO-PEO são macromoléculas classificadas como agentes tensoativos não iônicos. Suas aplicações são amplas no setor industrial (Schmolka 1977), como a produção de tintas (Winnik, Breton et al. 1992, Winnik, Davidson et al. 1992) e na medicina, sendo que neste último caso empregado no biotransporte e liberação controlada de fármacos em formulações para aplicação *in vivo* (Kabanov, Batrakova et al. 1992). Os copolímeros diferem dos surfactantes tradicionais em sua estrutura complexa de copolímero e por serem termosensíveis e por conta disto apresentam vantagens em suas aplicações. Assim, para os copolímeros formarem micelas, além de alcançar a concentração micelar crítica (CMC) é necessário atingir a temperatura micelar crítica (TMC) (Alexandridis and Alan Hatton 1995). Logo, o P-123 e F-127 foram eleitos para investigar a autoagregação de moléculas de copolímeros, assim como os parâmetros termodinâmicos de ligação dos mesmos, empregando-se técnicas eletroquímicas voltamétricas e o azul de ortotoluidina como sonda.

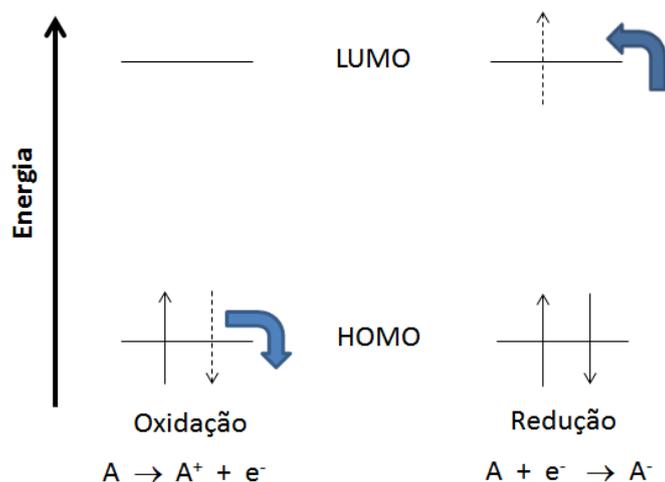
## ***1.1 Conceitos fundamentais da voltametria***

A voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho (ET) e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial. Nesta técnica, ajusta-se o potencial (E) e mede a corrente resultante (i), ou seja, tem-se corrente em função do potencial ( $i = f(E)$ ). Assim, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no ET ao se aplicar um potencial entre o mesmo e um eletrodo auxiliar. O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma, que pode ser realizado empregando-se diferentes métodos, sendo que a magnitude da corrente é obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, Equação 1.1. Esta corrente, por sua vez, pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente com a quantidade de analito no seio da solução (Skoog, Holler et al. 2002).



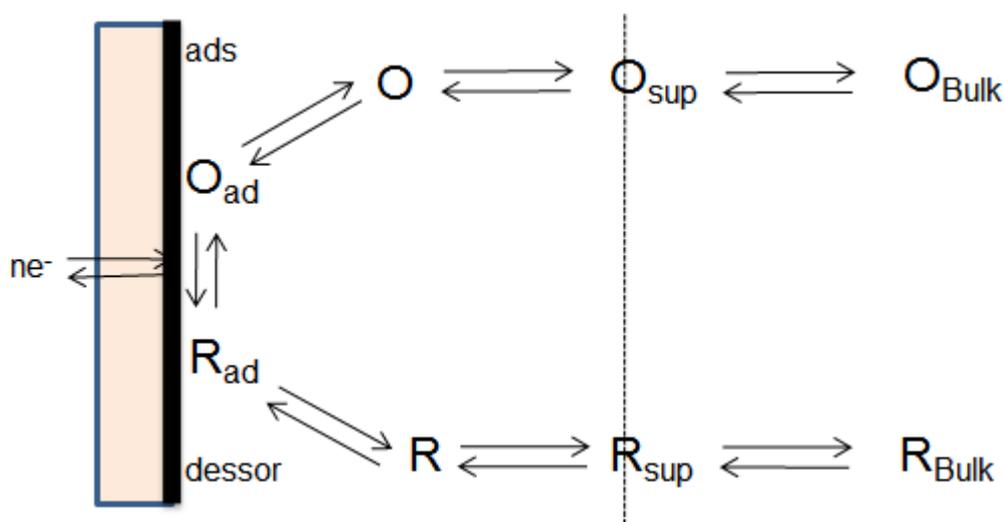
sendo O a espécie oxidada e R é a espécie reduzida.

Uma reação eletroquímica, como a observada na Equação 1.1, ocorre na superfície do eletrodo e a transferência de elétrons entre o ET e analito ocorre entre os orbitais HOMO e LUMO do analito e os orbitais moleculares (níveis de Fermi) do eletrodo. O orbital de maior energia ocupado (HOMO) é particularmente importante quando uma oxidação esta envolvida. O orbital de maior energia desocupado (LUMO) é particularmente importante quando uma redução esta envolvida (Brett 1996), como pode ser visualizado na Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Níveis de energia de uma espécie genérica A sofrendo oxidação ou redução na superfície do ET. Adaptado de Gosser (Gosser 1993).

As espécies oxidadas (O) e reduzidas (R) serão geradas na superfície do ET, que atrai predominantemente espécies carregadas positivamente ou negativamente, que podem ou não reagir na sua superfície. Espécies neutras também interagem com o eletrodo via adsorção. Logo, a reação redox é composta por uma série de etapas e para se descrever qualquer processo redox deve ser considerado primeiro, o transporte das espécies até a superfície do eletrodo e segundo, a reação que ocorre no eletrodo. Assim a corrente ou a velocidade da reação redox é governada por processos como: *i*) transferência de massa (transferência de massa do seio da solução para a interface eletrodo/superfície); *ii*) transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo); *iii*) reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons que podem por sua vez ser homogêneos (protonação, dimerização, etc) ou heterogêneos (decomposições catalíticas, adsorção, desorção, cristalização). A Figura 1.2 mostra um exemplo da etapa *i* e *ii*, que é a situação mais simples.



**Figura 1.2.** Representação do conjunto de etapas que resulta na medida voltamétrica.

É indispensável que o transporte de massa seja um processo contínuo, pois, caso contrário, a concentração da espécie eletroativa de interesse na superfície do ET irá decrescer rapidamente, inviabilizando a relação com a concentração do analito no corpo da solução. Existem três diferentes formas pela qual o transporte de massa pode correr no meio, migração, convecção e difusão.

Em experimentos empregando voltametria, as condições experimentais são ajustadas para que o transporte por migração (movimento de íons através da solução causada pela atração ou repulsão entre as espécies iônicas em solução e o ET) e convecção (movimentação das espécies causadas por perturbação mecânica do fluxo da solução) sejam minimizados. No caso da migração, o uso de excesso de eletrólito, 50 a 100 vezes maior que a concentração da espécie eletroativa de interesse, não reativo na solução, minimiza a propagação de um campo elétrico devido a formação de gradiente de cargas. Já o transporte por convecção, é minimizado cessando o distúrbio mecânico da solução (agitação mecânica e borbulhamento de gás) antes de se aplicar o potencial de trabalho. Assim, o transporte de massa é feito basicamente por difusão, que é a movimentação espontânea da espécie química devido à formação de um gradiente de concentração do analito de interesse. Por exemplo, considerando a reação redox (Equação 1) no sentido direto, à medida que a espécie oxidada ( $O_{ad}$ ) começa a ser reduzida, há um decréscimo da concentração de  $O$  na superfície ( $O_{sup}$ ) do ET, e espontaneamente surgirá um fluxo de  $O$  do seio da solução ( $O_{Bulk}$ ) para a interface eletrodo/solução devido a criação do gradiente de concentração, como mostra a Figura 1.2.

A transferência de carga e conseqüentemente os processos redox ocorrem na interface eletrodo/solução gerando corrente elétrica. A corrente total é constituída de duas componentes: corrente faradaica relativa a processo redox da espécie em estudo na superfície do ET; e a corrente capacitiva, que é a corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução. Devido à formação desta dupla camada, a interface eletrodo/solução se torna uma região bem distinta do seio da solução.

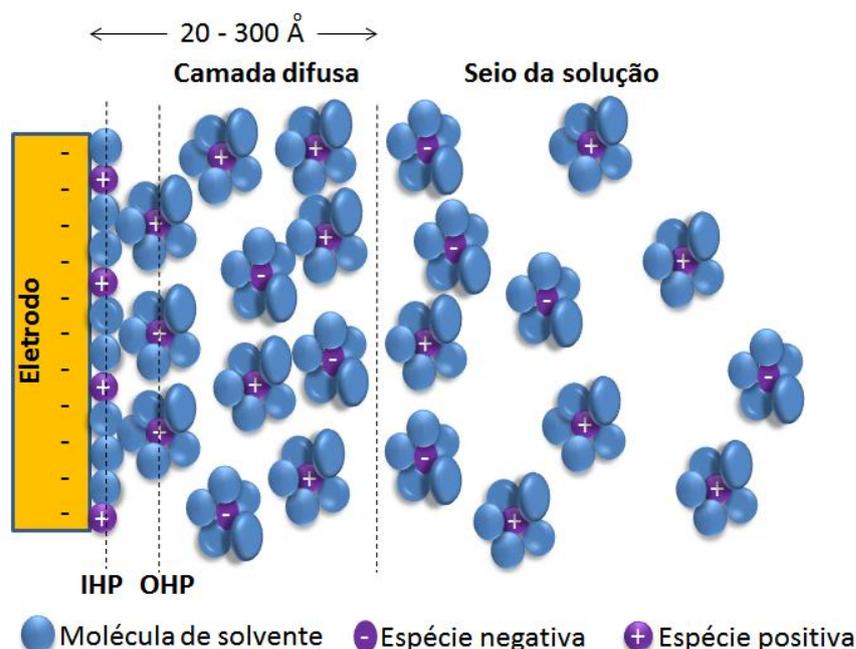
### ***1.2 Modelos de dupla camada elétrica***

Alguns modelos de dupla camada foram desenvolvidos para compreender melhor a interface eletrodo/solução. São estes: modelos de Helmholtz, Gouy Chapman, Stern, Grahame, Bockris, Devanathan e Muller. Todos estes modelos levam em consideração predominantemente as interações de natureza eletrostática. Começando com o modelo de Helmholtz em 1879 (Helmholtz 1853), considerado o primeiro modelo, este se aplica apenas a interações na superfície do ET, formando uma dupla camada compacta, não se estendendo para o seio da solução. Este modelo assume também que a concentração de eletrólito e o potencial aplicado não afetam o valor da capacidade da dupla camada. Em 1910 Gouy-Chapman (Gouy 1910) consideraram que tanto o potencial aplicado quanto a concentração do eletrólito influenciavam o valor da capacidade da dupla camada. Desta forma, a dupla camada não seria compacta, como na descrição do modelo de Helmholtz, mas de espessura variável, estando os íons livres para se moverem, sendo chamada assim de dupla camada difusa.

Tempos depois, em 1924, Stern combinou o modelo de Helmholtz com o modelo de Gouy-Chapman. Stern considerou que a dupla camada era formada por uma camada compacta de íons na superfície do eletrodo, seguida por uma camada difusa, estendendo-se para o interior da solução (Stern 1924). Stern introduz o conceito de plano de transição entre duas zonas, denominado de plano exterior de Helmholtz (OHP), que é uma linha imaginária onde passa através dos centros dos íons solvatados e não especificamente adsorvidos, que se encontram na superfície do eletrodo. Dos três modelos já descritos, Stern é o mais completo, no entanto ainda não explica todos os fenômenos. Em 1947, Grahame desenvolve um modelo que é constituído por três regiões (Grahame 1947). A diferença deste modelo para o modelo de Stern, é que Grahame considera adsorção específica, ou seja, um íon especificamente adsorvido

perde a sua solvatação aproximando-se ainda mais da superfície do ET, além disso, pode ter a mesma carga ou carga oposta a da superfície do eletrodo, e em ambos os casos a ligação é forte. Grahame introduz o conceito do plano interior de Helmholtz (IHP), que é uma linha imaginária que passa no centro dos íons, sem camada de solvatação, adsorvidos na superfície do eletrodo. Em ambos os modelos, de Stern e Grahame, o potencial varia linearmente com a distância de IHP até o OHP, e em seguida, exponencialmente até a camada difusa.

Mais recentemente, Bockris, Devanathan e Muller (Devanathan and OIM 1963) levaram em consideração a interação eletrostática de solventes dipolares, como por exemplo, a água, com a superfície do eletrodo, pois têm uma concentração muito maior do solvente em relação ao soluto. Por exemplo, a água pura tem a concentração de  $55,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Bockris, Devanathan e Muller mostram que há uma predominância de moléculas de solvente na superfície do eletrodo em relação ao analito (soluto). As moléculas de solvente na superfície do eletrodo estão com seus dipolos orientados de acordo com a carga do ET, formando uma camada juntamente com as moléculas de analito especificamente adsorvidos. Assim, considerando o ET como um íon gigante, as moléculas do solvente formam a sua primeira camada de hidratação juntamente com moléculas de analito. O IHP é o plano que passa através do centro dos dipolos das moléculas de solvente e os analitos especificamente adsorvidos. De modo semelhante, o OHP refere-se à adsorção dos analitos solvatados que poderiam ser identificados como uma segunda camada de solvatação, e finalmente tem-se a camada difusa. Desta forma, de Helmholtz à Brokris *et al* o modelo da dupla camada foi desenvolvido e pode ser representado pelo Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Representação da dupla camada elétrica dos modelos de Helmholtz, Gouy-Chapman, Stern, Grahame, e Bockris, Devanathan e Muller.

De acordo com a representação acima, observa-se que quando um ET é imerso numa solução carregada positiva ou negativamente, este irá alterar a camada da solução imediatamente vizinha à superfície do ET. Assim, ocorrerá uma orientação de moléculas de solvente e analito sobre a superfície do ET, criando uma contra camada elétrica, onde a carga total e a densidade de carga seriam iguais a do ET, porém com sinal oposto, mantendo a neutralidade do sistema. Esta interface formada por duas lâminas de sinais opostos é denominada de dupla camada elétrica, sendo bastante compacta, ou seja, as moléculas do solvente e analito na camada adjacente não possuem mobilidade, pois estão especificamente adsorvidas no eletrodo formando o IHP. Após esta região, moléculas solvatadas do analito estão presentes, contudo, devido ao seu raio de hidratação não conseguem atingir a superfície do ET, formando o OHP. Moléculas que estão nesta região, assim como as que estão na camada difusa, sofrem atração de longa distância com o ET. Na camada difusa, a concentração do analito é proporcional à concentração de analito no seio da solução. Moléculas no seio da solução não sofrem atração eletrostática com o ET.

Normalmente, a transferência de carga entre analito e ET se dá quando o analito atinge a camada difusa na região do OHP, mas em alguns casos, onde ocorre adsorção

específica, o analito pode chegar até o IHP, camada compacta, substituindo moléculas do solvente e adsorvendo especificamente ao ET.

### ***1.3 Corrente faradaica e leis de Fick***

A corrente observada na interação do analito com o ET (oxiredução) é a faradaica, pois segue a lei de Faraday. Neste caso, a corrente é proporcional à concentração de analito ativo no seio da solução. O outro tipo de corrente, a corrente capacitiva, não é proporcional à concentração do analito e nem obedece à lei de Faraday (não-faradaica), é gerada devido à presença de um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, aumentando a carga da dupla camada elétrica que é uma corrente transiente causada por mudanças na superfície do eletrodo e da solução.

O potencial aplicado no ET atua como a força motriz para a reação eletroquímica. O controle do potencial do ET possibilita que espécies presente na solução sejam oxidadas ou reduzidas na superfície do ET. Na medida em que o potencial se torna mais negativo, o ET se torna uma fonte de elétrons favorecendo a redução das espécies na interface solução/eletrodo. No caso de um potencial mais positivo a oxidação das espécies será favorecida. Por esta razão, quando se faz uma varredura de potencial no sentido negativo usa-se a denominação de varredura catódica, enquanto que uma varredura de potencial no sentido positivo é a varredura anódica (A. J. Bard 1980).

A corrente faradaica,  $i$ , proveniente da oxirredução do analito na superfície do eletrodo é dada pela Equação 1.2.

$$i = zF \frac{dn}{dt} \quad \text{Equação 1.2}$$

sendo  $z$  um número inteiro de sinal e magnitude da carga iônica da espécie eletroativa,  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $dn/dt$  é a taxa de variação de mols da espécie eletroativa. Se considerarmos a taxa de variação  $dn/dt$  como o produto entre o fluxo de espécies eletroativas ( $J$ ) e a área da seção reta ( $A$ ), tem-se que a corrente instantânea pode ser descrita pela Equação 1.3.

$$i = zFAJ \quad \text{Equação 1.3}$$

Como vimos, as espécies ativas chegam ao ET primariamente por difusão, pois outras formas de transporte de massa são propositalmente limitadas. Nesse caso,  $J$  é dependente do tempo e é descrito pela primeira lei de Fick, que descreve  $J$  como o produto entre o coeficiente de difusão,  $D$ , multiplicado pela variação de concentração na interface eletrodo/solução (onde a distância,  $x$ , entre a superfície do ET e a solução é zero), Equação 1.4.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad \text{Equação 1.4}$$

sendo  $\partial c/\partial x$  a taxa de variação da concentração do analito na superfície do eletrodo com o distância  $x$ , considerando o sistema unidimensional. Os valores do coeficiente de difusão em solução aquosa varia entre  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$   $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  e pode ser determinado empregando-se métodos eletroquímicos. Alternativamente, as relações de Stokes-Einstein podem ser usadas para calcular o coeficiente de difusão também. Assim, as relações acima, mostram que a corrente é limitada por difusão ou está sob o controle difusional.

A difusão de espécies no meio, devido ao gradiente de concentração, causa uma variação da concentração da espécie com o tempo, que pode ser equacionada pela segunda lei de Fick, para um sistema unidimensional, Equação 1.5.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \text{Equação 1.5}$$

$\partial c/\partial t$  é a taxa de variação da concentração do analito na superfície do eletrodo com o tempo.

Sendo que as espécies envolvidas no processo são iônicas (fluxo envolvendo transferência de carga), a corrente pode ser expressa pela Equação 1.6.

$$i = zFAD \frac{dc}{dt} \quad \text{Equação 1.6}$$

Similarmente, se o fluxo de espécies para o ET não envolve transferência de carga (transferência de cátions ou ânions), mas é adsorptivo, temos um processo heterogêneo cineticamente controlado. A adsorção é um processo heterogêneo e o fluxo

de espécies eletroativas pode ser descrito como uma etapa cinética de primeira ordem (Equação 1.7). Nesse caso, tem-se também uma relação onde a corrente é proporcional à concentração da espécie de interesse.

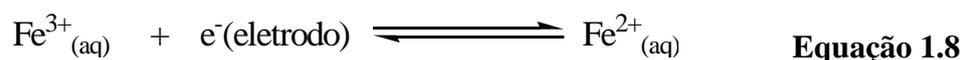
$$i = zFAk_h c \quad \text{Equação 1.7}$$

sendo  $k_h$  a constante de velocidade heterogênea, descrita em muitos casos como  $k^\circ$ .

A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada, está relacionada com o tipo e a qualidade das informações quantitativas e qualitativas que se quer obter, a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o ET (Brett 1996). Maiores detalhes sobre alguns diferentes modos de aquisição serão descritos mais a diante.

#### 1.4 Teoria de Butler-Volmer

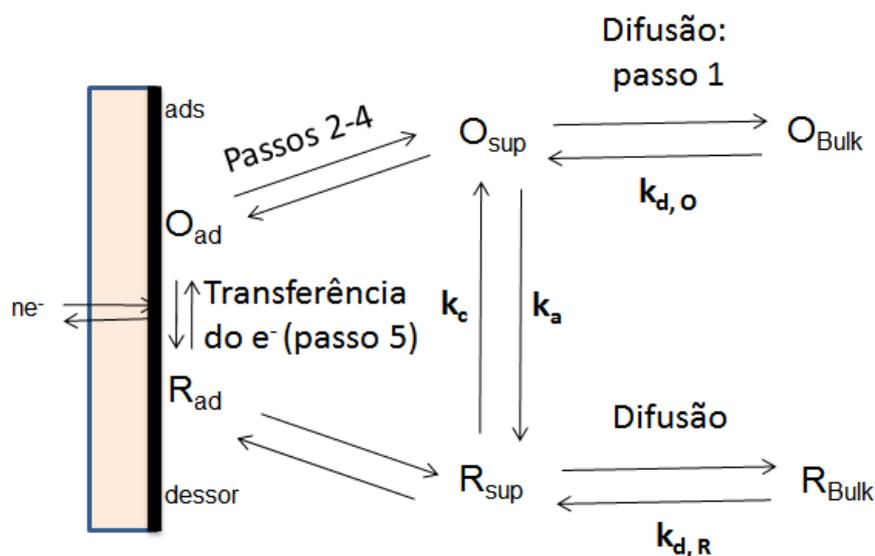
Butler-Volmer desenvolveram uma teoria capaz de quantificar processos cinéticos que ocorrem na superfície de um ET, podendo assim elucidar os mecanismos de reação do eletrodo que envolve o processo redox da espécie eletroativa. Considerando um processo simples em equilíbrio de transformação de  $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})/\text{Fe}^{2+}$ :



O mecanismo da reação acima consiste nos seguintes passos (Vetter 2013):

1. Difusão das espécies para onde a reação ocorre (descrito por um coeficiente de transferência de massa,  $k_d$ ).
2. Rearranjo da atmosfera iônica ( $10^{-8}$  s), descrito pelo princípio de Frank-Condon (processos adiabáticos).
3. Reorientação dos dipolos dos solventes ( $10^{-11}$  s).
4. Alteração nas distâncias entre os íons centrais e os ligados ( $10^{-14}$  s).
5. Transferência do elétron ET/analito ( $10^{-16}$  s).
6. Relaxação no sentido inverso.

Na Figura 1.4, segue uma ilustração dos passos mais importantes.



**Figura 1.4.** Representação do conjunto de etapas que resulta na medida voltamétrica.

Os passos 2-5 estão incluídos na constante de velocidade,  $k_a$  ou  $k_c$ , e inclui adsorção de reagente na superfície do ET, que na sequência será dessorvido. Os passos 2-4 podem ser vistos como um pré-equilíbrio antes da transferência do elétron. Durante a própria transferência do elétron, todas as posições dos átomos estão congeladas, obedecendo ao princípio de Frank-Condon (processos adiabáticos).

Para chegar ao modelo cinético de reações na superfície de eletrodo proposto por Butler-Volmer, deve-se iniciar com a expressão de Arrhenius que relaciona entalpia de ativação ( $\Delta H^*$ ) com a constante de velocidade,  $k$ , Equação 1.9.

$$k = Ae^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \quad \text{Equação 1.9}$$

sendo  $A$  o fator pré-exponencial. Numa reação de transferência de elétrons, o arranjo da atmosfera iônica é um passo fundamental, e assim é útil incluir a entropia de ativação ( $\Delta S^*$ ). A reorientação e o rearranjo dão origem a uma separação entre os níveis de energia, fazendo com que a energia do complexo ativado seja diferente em relação ao estado inicial. Assim, o fator pré-exponencial pode ser descrito pela Equação 1.10:

$$A = A'e^{-\frac{\Delta S^*}{R}} \quad \text{Equação 1.10}$$

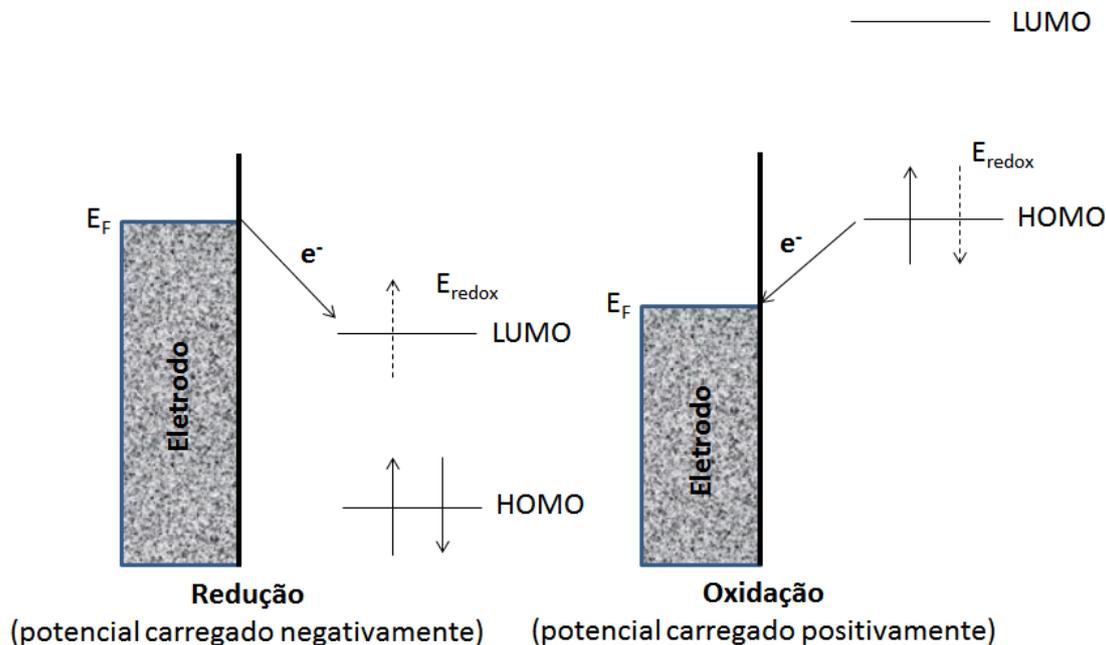
Sendo assim,  $k$  pode ser reescrito como a Equação abaixo:

$$k = A'e^{-\left[\frac{\Delta H^* - T\Delta S^*}{RT}\right]} = A'e^{-\left[\frac{\Delta G^*}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.11}$$

sendo  $\Delta G^*$  a variação da energia livre de Gibbs de ativação. Vejamos agora como que o potencial aplicado ao ET reflete nos valores de  $\Delta G^*$ . Consideremos uma meia reação de primeira ordem ocorrendo num ET metálico inerte:

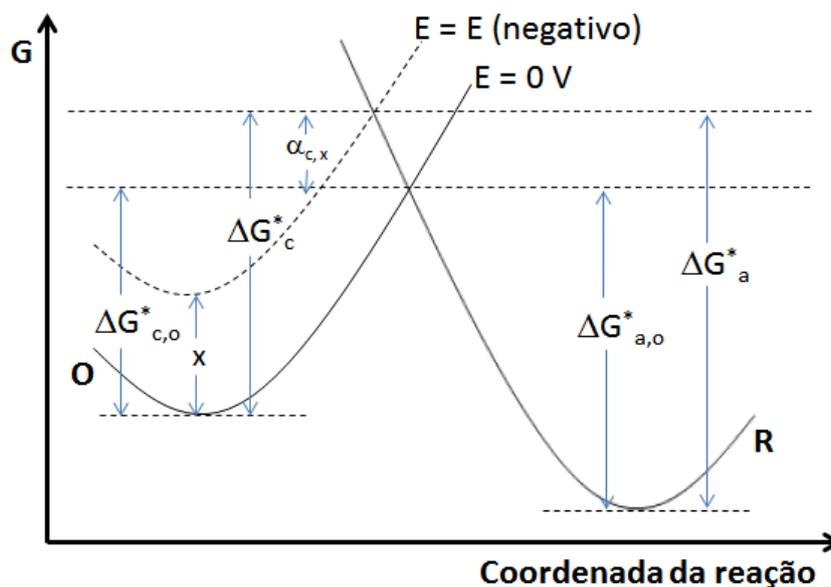


sendo ambas as espécies (O e R) solúveis. O par O/R tem uma energia que pode ser relacionada com o potencial do ET. Chama-se esta energia de  $E_{\text{redox}}$ . Aplicando um potencial no ET, influenciamos o nível eletrônico ocupado mais elevado no ET, que é denominado nível de Fermi ( $E_F$ ), onde os elétrons são sempre transferidos deste nível e para este nível, como pode ser visualizado na Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Transferência de elétrons de um ET metálico inerte. O potencial aplicado no mesmo altera o nível de energia mais elevado,  $E_F$ , facilitando a redução (esquerda) ou a oxidação (direita).

A Figura 1.5 mostra que o potencial aplicado pode mudar a direção de transferência de elétrons. O perfil de energia livre de Gibbs (G) para esta transferência é um perfil parabólico de reagentes (espécie oxidada) e produtos (espécie reduzida), observado na Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Efeito de uma variação no potencial aplicado ao eletrodo na redução de O para R.

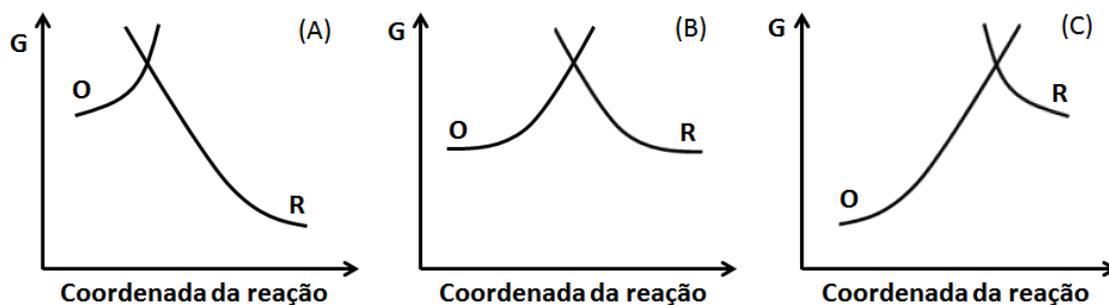
O ponto onde as curvas de energia livre de Gibbs se interceptam, tem-se a energia referente ao complexo ativado, ou seja, o estado de transição, cuja semelhança na estrutura das espécies vai depender da simetria das curvas, que também pode ser chamado de simetria da barreira energética. Para ocorrer a redução, o nível de Fermi se eleva acima do nível LUMO de modo que o ET fica carregado negativamente. Quando a espécie oxidada recebe o elétron, tem sua energia livre de Gibbs aumentada, e consequentemente, a simetria da barreira é quebrada, de modo que o complexo ativado se assemelhará mais a espécie oxidada. Assim, vemos uma maior variação da energia livre de Gibbs de ativação ( $\Delta G^*$ ) quando a espécie oxidada ganha um elétron. A variação de  $x$  na energia resultará numa variação de  $\alpha_c x$  na energia do complexo ativado. Então, para redução podemos escrever:

$$\Delta G_c^* = \Delta G_{c,o}^* + \alpha_c nFE \quad \text{Equação 1.12}$$

e de forma semelhante, para oxidação:

$$\Delta G_a^* = \Delta G_{a,o}^* - \alpha_a nFE \quad \text{Equação 1.13}$$

sendo E o potencial aplicado ao ET e  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica, sendo a medida da inclinação dos perfis de energia na zona do estado de transição e, portanto, da simetria da barreira. Os valores de  $\alpha_a$  e  $\alpha_c$  podem variar entre 0 e 1. Um valor de  $\alpha = 0,5$  significa que o complexo ativado está exatamente a meio caminho entre reagente e produto, tendo assim 50 % das características estruturais de ambas as espécies. Em casos onde  $\alpha < 0,5$ , a estrutura do complexo ativado é predominantemente a estrutura da espécie oxidada e a espécie reduzida tem menor energia livre. Quando  $\alpha > 0,5$ , a estrutura do complexo ativado é predominantemente a estrutura da espécie reduzida e a espécie oxidada apresenta menor energia livre, Figura 1.7 (A. J. Bard 1980, Brett 1996).



**Figura 1.7.** Simetrias das barreiras de ativação para os casos: **A)**  $\alpha < 0,5$ ; **B)**  $\alpha = 0,5$ ; **C)**  $\alpha > 0,5$ .

Substituindo  $\Delta G^*$  na equação de constante de velocidade de Arrhenius, temos para redução:

$$k_c = A' e^{-\left[\frac{\Delta G_{c,o}^*}{RT}\right]} e^{-\left[\frac{\alpha_c nFE}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.14}$$

para oxidação:

$$k_a = A' e^{-\left[\frac{\Delta G_{a,o}^*}{RT}\right]} e^{\left[\frac{\alpha_a nFE}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.15}$$

Estas Equações podem ser escritas do seguinte modo:

$$k_c = k_{c,o} e^{-\left[\frac{\alpha_c n F E}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.16}$$

$$k_a = k_{a,o} e^{\left[\frac{\alpha_a n F E}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.17}$$

Como a reação é de primeira ordem, no equilíbrio:

$$k_c [O]_{sup} = k_a [R]_{sup} \quad \text{Equação 1.18}$$

sendo  $[O]_{sup}$  e  $[R]_{sup}$  as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas nas proximidades da superfície do ET. Se  $[O]_{sup} = [R]_{sup}$ , o potencial é  $E^\circ$ , potencial formal, e:

$$k_c = k_a = k^o \quad \text{Equação 1.19}$$

sendo  $k^o$  a constante de velocidade padrão de superfície de eletrodo. Substituindo as Equações acima, temos:

$$k_c = k^o e^{-\left[\frac{\alpha_c n F (E - E^\circ)}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.20}$$

$$k_a = k^o e^{\left[\frac{\alpha_a n F (E - E^\circ)}{RT}\right]} \quad \text{Equação 1.21}$$

Tais Equações cinéticas acima foram formuladas pela primeira vez por Butler e Volmer (Butler 1924, Erdey-Gruz and Volmer 1930). A corrente observada para o controle cinético das reações redox na superfície do eletrodo, é proporcional a diferença entre a velocidade de oxidação e redução, e é dada por:

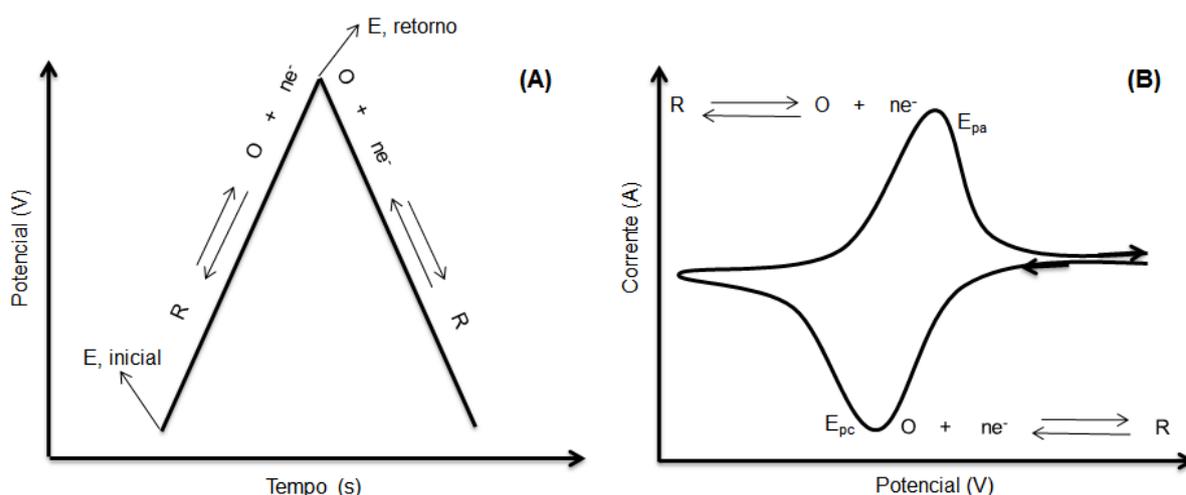
$$i = nFA(k_a [R]_{sup} - k_c [O]_{sup}) \quad \text{Equação 1.22}$$

sendo  $A$  a área do eletrodo.

### 1.5 Voltametria Cíclica (VC)

A VC é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (Wang 2006).

Inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais positivas (anódica) ocorre à oxidação do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico da oxidação, Figura 1.8B. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no ET, o que faz da VC uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos.



**Figura 1.8.** A) Sinal de excitação. B) Corrente resultante.

A Figura 1.8B é denominada de voltamograma cíclico e os seguintes parâmetros são extraídos deste voltamograma: potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), potencial de pico

anódico ( $E_{pa}$ ), potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ), corrente de pico catódico ( $i_{pc}$ ), corrente de pico anódico ( $i_{pa}$ ). O  $E_{1/2}$  pode ser determinado pela Equação 1.23:

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad \text{Equação 1.23}$$

A corrente de pico, para sistema reversíveis é descrito pela Equação de Randles-Sevcik, para eletrodos planares, Equação 1.24, (A. J. Bard 1980):

$$i_{pc} = 0,4463 \cdot \left(\frac{F^3}{RT}\right)^{1/2} n^{3/2} A D_{ap}^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 1.24}$$

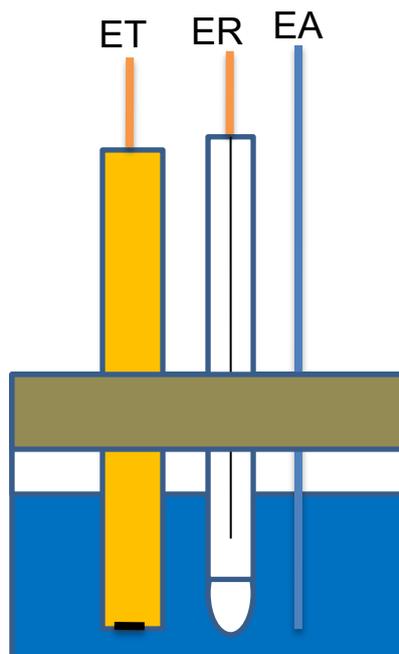
sendo  $i_{pc}$  a corrente de pico catódica (A),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (em Kelvin),  $A$  é a área do eletrodo ( $0,785 \text{ cm}^2$ ),  $n$  é o número de elétrons envolvido ( $n = 2$ ) no processo redox,  $D$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $C$  é a concentração ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).

Sendo assim, a Equação 1.24, que mostra  $i_p \propto v^{1/2}$ , é um dos critérios de reversibilidade do processo redox, outros critérios são:

- $E_p$  independente de  $v$ ;
- $\Delta E_p = 59/n$  (mV);
- $E_p = E_{1/2} \pm 0,0285/n$ .

Nos casos que os critérios acima não são obedecidos o processo redox pode ser quase reversível ou irreversível. Adicionalmente, a reversibilidade de carga pode ser verificada quando  $|i_{pa}/i_{pc}| = 1$ , em qualquer  $v$ .

As celas eletroquímicas utilizadas em VC podem ser compostas por três eletrodos, sendo estes, eletrodo de trabalho, de referência e contra eletrodo, como mostrado na Figura 1.9.



**Figura 1.9.** Esquema da cela eletroquímica empregada nos experimentos deste trabalho. ET = eletrodo de trabalho, ER = eletrodo de referência e EA = eletrodo auxiliar.

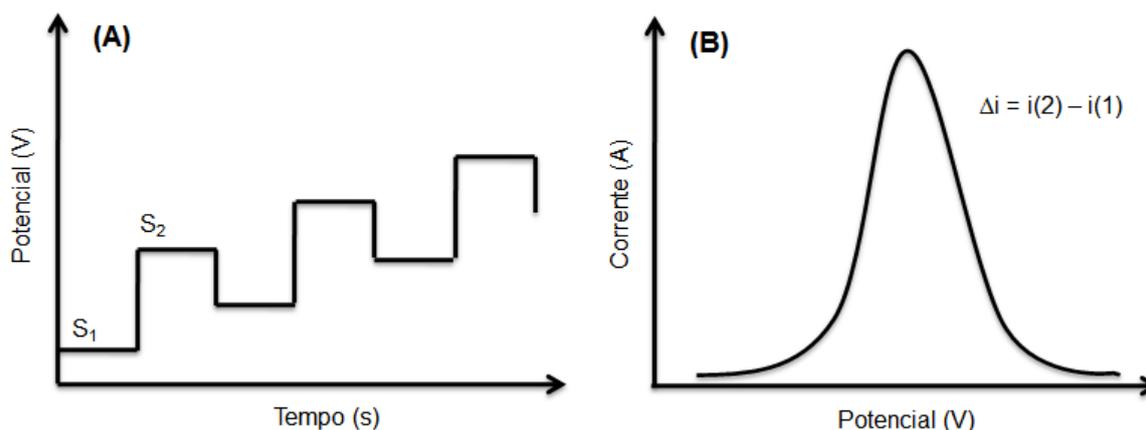
A técnica de VC pode ser empregada em várias aplicações como: reversibilidade do processo redox, estabilidade da espécie eletroativa, determinação do número de elétrons envolvido no processo redox, potencial formal das espécies, estimativa de parâmetros cinéticos, estimativa de constante formação e ligação, estimativa do coeficiente de difusão e elucidação de mecanismo de reação (A. J. Bard 1980).

### ***1.6 Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)***

As técnicas de pulso são baseadas na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. As características da corrente medida estão relacionadas tanto com a largura do pulso quanto com o degrau de potencial que é aplicado no ET para promover o processo faradaico (Osteryoung and Osteryoung 1985).

Nas técnicas de pulso, a perturbação do potencial do eletrodo não é uma função linear do tempo do experimento, sendo que a sistemática para a variação de potencial segue uma sequência de pulsos de potenciais, cujas respostas de corrente obtidas dependem de como estes pulsos são aplicados. Exatamente a diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial é que define as características básicas da técnica de pulso (Osteryoung and Osteryoung 1985).

Na VPD, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, a corrente é medida antes da aplicação do pulso (S1) e outra ao final do pulso (S2), Figura 1.10A. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica e, então, graficadas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana, Figura 1.10B.



**Figura 1.10. A)** Sinal de excitação. **B)** Corrente resultante.

A corrente de pico é diretamente proporcional à concentração, de acordo com a Equação 1.25:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{(\pi t_m)^{1/2}} \left( \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Equação 1.25}$$

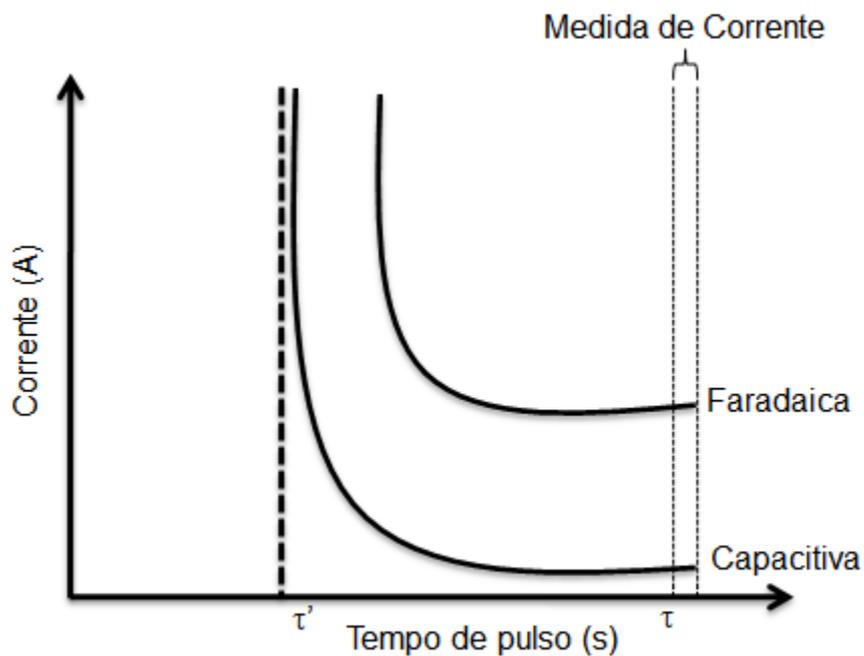
sendo  $i_p$  a corrente de pico (A),  $n$  é o número de elétrons envolvidos no processo redox,  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $A$  é a área do eletrodo em ( $\text{cm}^2$ ),  $t_m$  é o tempo entre a segunda e a primeira leitura – tempo de modulação (s),  $D$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) e  $\sigma$  é descrito pela Equação 1.26:

$$\sigma = e^{\left( \frac{nF \Delta E}{RT \cdot 2} \right)} \quad \text{Equação 1.26}$$

sendo  $\Delta E$  a amplitude do pulso (V).

Nas técnicas de pulso, em especial de pulso diferencial, a corrente capacitiva é proporcional a  $e^{-t/RC}$ , sendo  $t$  o tempo,  $R$  a resistência e  $C$  a capacitância da dupla

camada. A corrente faradaica é proporcional a  $t^{-1/2}$ , o decaimento da primeira ( $e^{-t/RC}$ ), após a aplicação do pulso de potencial, é mais rápido do que a última ( $a t^{-1/2}$ ). Assim, as medidas de corrente somente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter se minimizado. A Figura 1.11 apresenta a dependência das correntes faradaicas e capacitivas com relação ao tempo e o ponto onde a medida de corrente é realizada. Nas técnicas de pulso a corrente é medida em uma fração de tempo fixa chamado de período ( $\tau$ ) (de Souza, Machado et al. 2003).



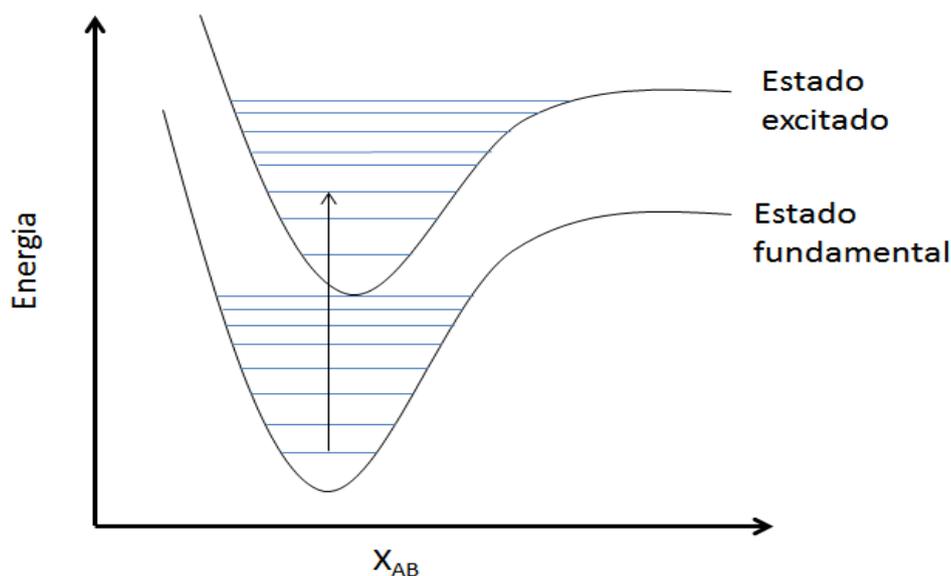
**Figura 1.11.** Variação da corrente faradaica e capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso.

Esta técnica é mais sensível do que a técnica de VC, isto porque ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido (pois a corrente capacitiva não depende da concentração da espécie em estudo). Esta correção de correntes possibilitada pelo método de VPD permite obter limites de detecção da ordem de  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

## 1.7 Espectroscopia de absorção

Absorção eletrônica consiste na transição eletrônica de um elétron do orbital molecular do estado fundamental para um orbital molecular desocupado de maior energia pela absorção de uma radiação eletromagnética específica. Quando a transição ocorre em orbitais mais externos, tem-se uma espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível. Existem vários tipos de transições possíveis, tais como:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  que ocorrem entre orbital HOMO (orbital molecular ocupado de mais alta energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (Lakowicz 1999).

Os níveis de energia de uma molécula podem ser representados com base no modelo de energia potencial de uma molécula diatômica (AB), onde a energia potencial dependerá da distância entre os núcleos nos átomos. Em cada estado eletrônico da molécula há um conjunto de níveis eletrônicos vibracionais e rotacionais permitidos, como mostra a Figura 1.12:



**Figura 1.12.** Níveis de energia de uma molécula diatômica simples.

Como uma consequência da transição eletrônica, a densidade de elétrons tende a aumentar em determinadas regiões da molécula e diminuir em outras. Os núcleos inicialmente em equilíbrio estacionário sofrem a ação de um novo campo de forças respondendo a este campo entrando em vibrações e oscilando. De acordo com o princípio de Frank-Condon, uma transição eletrônica ocorre com rapidez muito maior

do que os núcleos podem responder em virtude destes serem muito mais maciços do que os elétrons. Assim, as transições eletrônicas mais prováveis são aquelas cuja separação entre os núcleos seja a separação de equilíbrio. Assim, elas são originadas do centro do nível eletrônico fundamental para o nível do estado eletrônico excitado, verticalmente acima do fundamental, como mostrado na Figura 1.12 (Berardi 2010).

A quantidade de uma amostra em solução pode ser mensurada através da lei de Beer-Lambert, que relaciona a quantidade de luz absorvida numa amostra com a espessura do caminho percorrido pela luz na porta amostra e a concentração, de acordo com a Equação 1.27:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c l} \quad \text{Equação 1.27}$$

sendo  $I$  a intensidade de luz transmitida,  $I_0$  é a intensidade de luz de luz incidente,  $c$  é a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $l$  é a espessura do porta amostra (cm) e  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar ( $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ ), que é um parâmetro característico de cada molécula num dado solvente e comprimento de onda adequado. A razão  $I/I_0$  é a fração de luz incidente que é transmitida, e é chamada de transmitância (T). Assim, a absorbância (A) é dada por,

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad \text{Equação 1.28}$$

logo,

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equação 1.29}$$

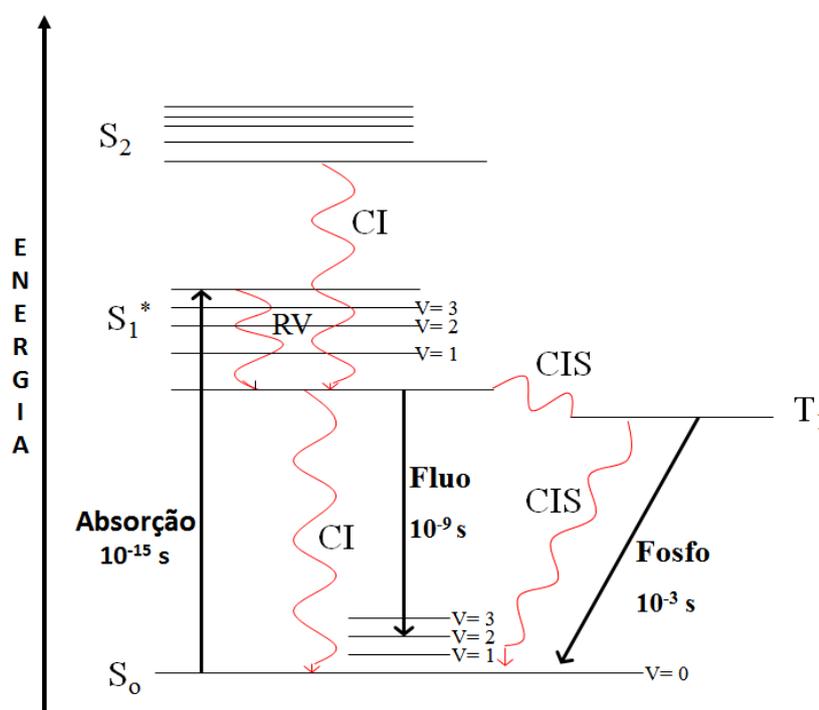
Desta forma, tem-se uma dependência linear da absorbância com a concentração da espécie absorvedora na amostra. O desvio da linearidade de um gráfico de  $A$  em função de  $c$  pode ser atribuída a formação de agregados (Lakowicz 1999).

### ***1.6 Espectroscopia de emissão de fluorescência***

A fluorescência é o resultado da emissão de radiação por uma molécula que absorveu radiação, ocorrendo uma relaxação do estado excitado para o estado fundamental. Moléculas quando excitadas podem perder energia por processos colisionais com moléculas de solvente ou delas mesma por processos de autoagregação.

Estes processos são denominados de processos não radioativos passando de níveis vibracionais de mais alta energia para níveis vibracionais de mais baixa energia. Quando a molécula se encontra no menor nível eletrônico do estado excitado, esta pode retornar para seu estado fundamental de duas formas: *i*) por processos não radioativos ou *ii*) por emissão de fluorescência, que é uma emissão radioativa com intervalo de tempo aproximadamente  $10^{-9}$  s.

A energia perdida por processos não radioativos contribuem para o aumento do movimento vibracional ou rotacional da molécula, promovendo uma mudança térmica no ambiente da molécula. Processos não radioativos como relaxação vibracional (RV), conversão interna (CI) e cruzamento intersistema (CIS) e outros processos de supressão, competem com a fluorescência. A radiação emitida pode ser por fluorescência, onde esta é interrompida no instante que cessa a radiação incidente, ou por fosforescência, que ocorre depois do CIS e cessa apenas depois de um longo intervalo de tempo após a excitação. Abaixo segue o diagrama de Jablonski (Figura 1.13) com os principais tipos de processos radioativos e não radioativos após a absorção de radiação (Lakowicz 1999).



**Figura 1.13.** Diagrama de Jablonski representando processos de absorção de radiação, processos não radioativos e radioativos.

Como ocorre perda de energia por processos não radioativos depois da molécula ter sido excitada, a emissão de fluorescência ocorre sempre com uma energia menor do que a energia que foi necessária para excitar a molécula. Desta forma, o espectro de emissão será sempre deslocado para região de maior comprimento de onda em relação ao espectro de absorção, de forma que, a diferença do comprimento de onda de excitação e emissão é denominada de deslocamento de Stokes (Lakowicz 1999).

### ***1.9 Anisotropia de fluorescência estática***

A radiação eletromagnética quando passa por um polarímetro ocorre à polarização da radiação, ou seja, uma radiação numa única direção específica. Esta radiação polarizada excita moléculas, que por sua vez, emitem radiação também polarizada, sendo que o grau de polarização pode ser descrito em termos de anisotropia de fluorescência estática ( $r$ ). A origem deste fenômeno reside na existência de momentos de absorção e emissão posicionados em direções específicas da estrutura do fluoróforo quando excitado. Em uma solução homogênea as moléculas (fluoróforos) tendem a se moverem aleatoriamente em todas as direções no meio. Quando expostos a uma radiação ou luz polarizada, apenas as moléculas que se encontram com o momento de dipolo de transição na mesma direção do vetor elétrico desta luz incidente são excitadas, de modo que a população do estado excitado é referente a moléculas com orientação definida e não aleatória (Lakowicz 1999).

A despolarização da emissão pode ser causada por vários fatores dependendo das características da amostra, sendo que a causa mais comum é a difusão rotacional das moléculas. Este movimento depende da viscosidade do meio, do tamanho do fluoróforo e do sistema onde ele está inserido. Moléculas fluorescentes que estão com alto grau de difusão rotacional apresentam baixa anisotropia, enquanto que moléculas que estão mais imobilizadas no meio, ou seja, com menor grau de difusão rotacional, apresentam anisotropia alta. Desta forma, fluoróforos em meios mais viscosos, ou grandes ou ainda inseridos numa estrutura supramolecular, apresentarão baixo grau de difusão rotacional o que resultará em alta anisotropia, em relação a este mesmo fluoróforo no meio aquoso, por exemplo. A Equação 1.30 é empregada para mensurar o valor de anisotropia de fluorescência ( $r$ ) (Lakowicz 1999).

$$r = \frac{(I_{VV} - GI_{HV})}{(I_{VV} + 2GI_{VH})} \quad \text{Equação 1.30}$$

sendo a posição do vetor é indicada por V (vertical) e H (horizontal) para excitação e emissão, respectivamente. O fator G é um fator de correção devido à diferença na eficiência de transmissão apresentada pelo monocromador da luz polarizada verticalmente e horizontalmente. Este é calculado pela razão  $I_{HV}/I_{HH}$  através de excitação horizontal da amostra. A anisotropia de fluorescência ( $r$ ) é um parâmetro adimensional que independe da intensidade total da amostra.

### **1.10 Espalhamento de luz ressonante (RLS)**

A técnica de RLS tem sua origem no espalhamento Rayleigh, que é o fenômeno da radiação eletromagnética depois de atingir a matéria por uma colisão elástica, cuja descrição tem sido feita principalmente por Pasternack (Pasternack, Bustamante et al. 1993). De acordo com a teoria de flutuação macroscópica, a lei de espalhamento Rayleigh é obedecida quando  $I \propto \lambda^{-4}$  (Miller 1978), sendo  $I$  intensidade de luz espalhada e  $\lambda$  comprimento de onda, para o espalhamento de luz de partículas moleculares 20 vezes menores que o comprimento de onda do feixe incidente. No entanto, se o comprimento de onda do feixe incidente é próximo da banda de absorção das partículas moleculares que existem na forma de agregados, haverá o desvio da lei do espalhamento Rayleigh e a intensidade de alguns comprimentos de onda irá aumentar rapidamente. Este fenômeno é chamado de espalhamento de luz ressonante (RLS) (Anglister and Steinberg 1983).

Pasternack descreveu, que o espalhamento de luz de uma secção transversal para uma espécie esférica é proporcional ao volume da esfera e a  $\lambda^{-4}$  ( $\alpha_r^2$  e  $\alpha_i^2$ ), sendo que  $\alpha_r$  e  $\alpha_i$  são a parte real e imaginária, respectivamente, de polarizabilidade do espalhador. Por outro lado, a secção transversal de absorção de luz e conseqüentemente a absorvidade molar é proporcional apenas a  $\alpha_i$ . (Pasternack, Schaefer *et al.* 1994),

No que diz respeito ao avanço e aplicações da técnica de RLS, Pasternack e colaboradores sugeriram que a técnica pode ser usada para determinar o tamanho e forma de agregados cromóforos da mesma forma que se faz em medidas tradicionais de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para se obter o tamanho e forma dos biopolímeros (Pasternack, Bustamante *et al.* 1993, Pasternack and Collings 1995). Huang *et al.*, verificaram que traços de ácidos nucleicos e proteínas em amostras práticas podem ser determinadas com boa sensibilidade (Huang, Li *et al.* 1996, Huang, Zhu *et al.* 1997). A

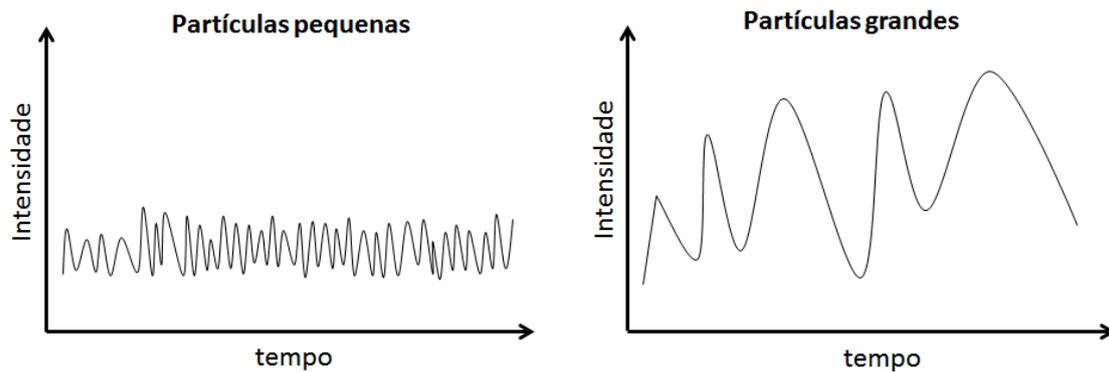
agregação de porfirinas na presença de proteínas (Huang, Li *et al.* 1998), a formação de hélices supra-helicais de ácidos nucleicos (Huang, Li *et al.* 1997) e a montagem de longo alcance de corantes orgânicos na superfície de ácidos nucleicos (Huang, Li *et al.* 1998) foram estudadas empregando RLS.

Assim, a técnica RLS é considerada um novo método analítico, que pode fornecer informações principalmente a respeito da existência e do tamanho de espécies autoagregadas (Faeder and Ladanyi 2000).

### ***1.11 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)***

O DLS mede a luz espalhada pelas partículas no meio, num comprimento de onda ligeiramente diferente do feixe incidente nestas partículas em um ângulo determinado. Isto acontece porque moléculas em movimento alteram o comprimento de onda da luz devido ao efeito *Doppler*, que é um fenômeno físico observado nas ondas eletromagnéticas, neste caso, refletidas por um objeto que está em movimento em relação a um observador. Se não há um movimento líquido resultante, as flutuações no número de moléculas espalhadoras resultam numa distribuição de comprimento de onda de luz espalhada. Neste caso, a distribuição é bastante estreita, e uma fonte de luz extremamente monocromática é necessária.

Esta técnica permite medir partículas de 1 a 5000 nm dependendo da amostra e da potência do laser, o método empregado é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Partículas em solução estão em constante movimento, denominado de movimento Browniano devido à agitação térmica do sistema. Este movimento provoca um padrão de speckle de movimento na intensidade de luz espalhada pelas partículas. Assim, ele pode ser detectado como uma variação na intensidade com o tempo, a partir de uma óptica e uma fotomultiplicadora adequada. Partículas grandes se movem mais lentamente do que as partículas pequenas, portanto a taxa de flutuação da luz espalhada por elas é também mais lenta, como pode ser visualizado na Figura 1.14. Na espectroscopia de correlação de fótons, a taxa de variação dessas flutuações é empregada para determinar a distribuição de tamanhos das partículas espalhadoras de luz (Berardi 2010).



**Figura 1.14.** Representação de medida de DLS por PCS em uma amostra com partículas grandes e outra com partículas pequenas. A intensidade de luz espalhada em medida em função do tempo.

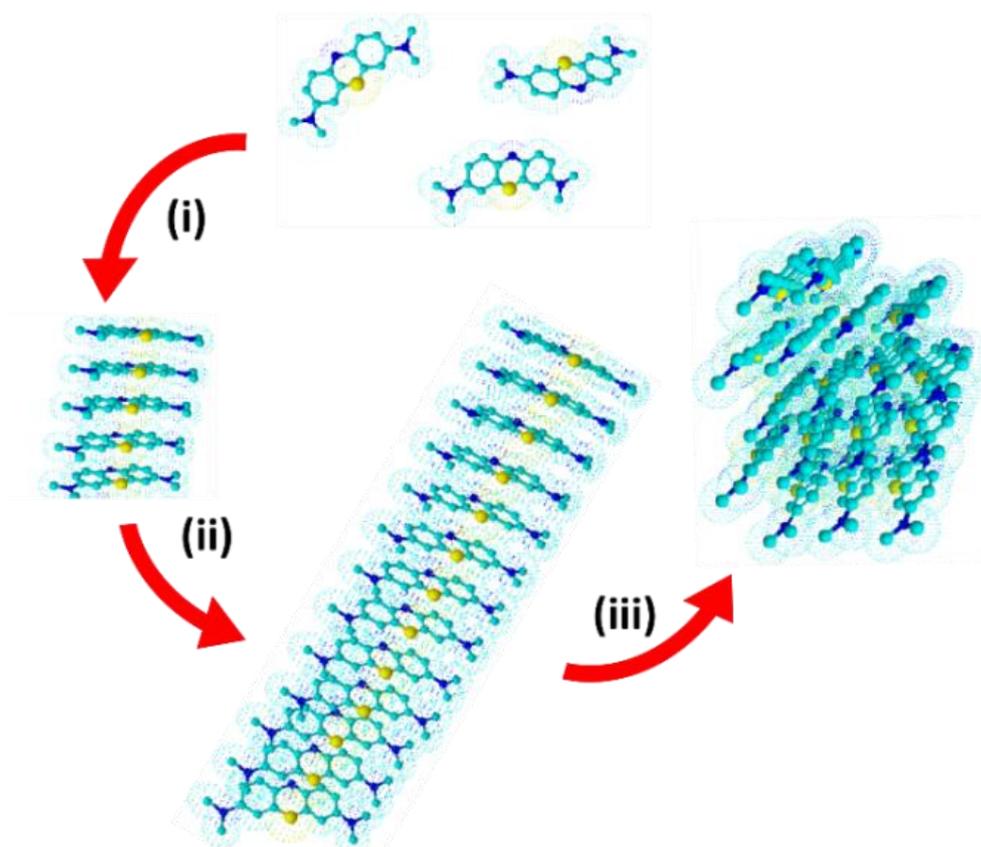
A análise das medidas pelo método PCS permite o cálculo do coeficiente de difusão translacional das partículas ( $D_o$ ) que estão em movimento Browniano, livres de interações com relação aos demais centros (regime de diluição infinita). Assim, o tamanho das partículas pode ser estimado a partir destes coeficientes, da temperatura e da viscosidade do meio empregando a equação de Stokes-Einstein, Equação 1.31.

$$D_o = \frac{kT}{6\pi\mu R_H} \quad \text{Equação 1.31}$$

sendo  $D_o$  o coeficiente de difusão da partícula ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $k$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (em Kelvin),  $\mu$  é a viscosidade do fluido (cP) e  $R_H$  é o raio hidrodinâmico da partícula (m).

# CAPÍTULO 2

Elucidación de Estructuras Unidimensionales  
Supramoleculares Formadas por Empilhamento  
 $\pi$ - $\pi$  de Fenotiazínicos Empleando Voltametría  
de Pulso Diferencial



## 2.1 INTRODUÇÃO

O comportamento dinâmico de espécies moleculares em solução tem um efeito direto sobre as suas propriedades químicas e físicas, principalmente nos casos em que as forças intermoleculares levam a forte sobreposição de orbitais, tais como uma autoagregação específica do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , que é comum em espécies poli-aromáticas (PAs) (Shetty, Zhang *et al.* 1996, Chen, Lohr *et al.* 2009, Lei, Guo *et al.* 2012). Desta forma, uma profunda compreensão deste processo torna-se crucial, para o uso de PAs em células fotovoltaicas orgânicas, sensores, nanofotônica e nanoelectronic (Schenning and Meijer 2005, Perez, Rogers *et al.* 2014, Zhu, Zheng *et al.* 2015). Além disso, o empilhamento molecular também é um processo muito relevante em química medicinal, onde a auto agregação de moléculas bioativas pode resultar na mudança em suas propriedades físicas, químicas, fotoquímicas e fotofísicas levando a uma variação das ações esperadas e, portanto, na inativação e conseqüentemente em graves efeitos colaterais aos pacientes (Hashmi, Hu *et al.* 2002, Barbosa, Itri *et al.* 2008).

O empilhamento molecular é um processo de auto agregação reversível, ou seja, um equilíbrio dinâmico sensível devido às interações intermoleculares entre solutos em relação às interações intermoleculares entre moléculas de soluto e solvente (Leiras, Freire *et al.* 2015, Shen, Jiang *et al.* 2015). A formação de dímeros, trímeros ou grandes agregados supramoleculares é um evento termodinâmico e pode ser desencadeada por vários tipos de perturbações do sistema, como alterações no pH, temperatura ou concentração da espécie (Mariani, Moldenhauer *et al.* 2016). Conseqüentemente, avaliar o comportamento dinâmico, tais como a avaliação da concentração agregacional crítica (CAC) e a aquisição de dados experimentais para a elucidação da orientação molecular no processo de autoagregação, são de extrema importância no desenvolvimento de novas drogas e na exploração de novas propriedades de agregados grandes e de sistemas supramoleculares, tendo em vista o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas em nanomateriais orgânicos (Nguyen, Martel *et al.* 2004, Kastler, Pisula *et al.* 2005, Mayerhöffer and Würthner 2012).

Atualmente, estudos experimentais de empilhamento molecular se baseiam principalmente em métodos espectroscópicos, como a absorção ou emissão eletrônica (Wang, Han *et al.* 2003, Chen, Stepanenko *et al.* 2007, Hagiwara, Akita *et al.* 2015). No entanto, em muitos casos, as variações do comportamento espectroscópico podem não ser simples de se interpretar no que diz respeito a sistemas supramoleculares. Há

também situações em que espécies isoladas ou agregadas não são fotoativas, ou seja, não apresentam propriedades óticas, inviabilizando o uso de métodos espectroscópicos no monitoramento de tais espécies (Siva, Nayaki *et al.* 2015). Adicionalmente, métodos espectroscópicos, de maneira geral, não fornecem informações adequadas sobre a estrutura geral e formato dos agregados (Metzroth, Hoffmann *et al.* 2011).

Alternativamente, para estudar moléculas autoagregadas têm-se as técnicas de espalhamento de luz, por exemplo, espalhamento de luz ressonância (RLS), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) (Chung, Tamaru *et al.* 2015, Mariani, Moldenhauer *et al.* 2016). No entanto, estas técnicas têm sido empregadas com mais frequência para investigar a formação de agregados grandes (Hashmi, Hu *et al.* 2002, Schenning and Meijer 2005, Perez, Rogers *et al.* 2014, Zhu, Zheng *et al.* 2015). Em tais técnicas, a resolução e detecção são fortemente limitadas pela concentração de soluto e elas não são apropriadas para monitorar pequenas variações sobre o comportamento dinâmico de moléculas em soluções em condições de baixa concentração (Barbosa, Itri *et al.* 2008).

O coeficiente de difusão pode fornecer indicações valiosas para desvendar a dinâmica molecular de espécies em processo de empilhamento (Marrink and Mark 2003, Macchioni, Ciancaleoni *et al.* 2008). O valor do coeficiente de difusão está relacionado com a resistência ao atrito da partícula em movimento em relação ao meio. Assim, a resistência depende de fatores intrínsecos das partículas, como o tamanho, forma e também a força da interação intermolecular com moléculas de solvente. Para casos ideais, diluição infinita, a Equação de Stokes-Einstein descreve coeficiente de difusão como sendo inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico da espécie (Edward 1970). Assim, espera-se que o coeficiente de difusão decresce em função do processo de empilhamento, devido o aumento do tamanho das partículas e consequentemente de seu raio hidrodinâmico.

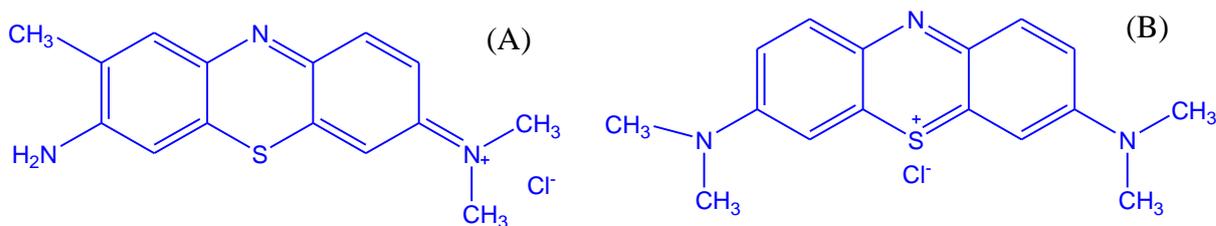
A fim de tornar o coeficiente de difusão uma propriedade quantitativa útil para estudo de empilhamento molecular, tal parâmetro tem sido determinado por métodos relativamente precisos (Valente, Nilsson *et al.* 2005, Nilsson, Cabaleiro-Lago *et al.* 2006). A técnica de RMN pulsada com gradiente de spin-eco, por exemplo, é uma técnica precisa e confiável para determinação de coeficiente de difusão de espécies no meio. No entanto, têm-se vários inconvenientes, tais como requisitos rigorosos para a análise da amostra, uma vez que exige a utilização de solventes deuterados, não apresenta sinal para amostras diluídas e o complexo e demorado tempo de instalação e

aquisição dos resultados em análise *in situ* (Hrabe, Kaur *et al.* 2007, Di Pietro, Palombo *et al.* 2014, Guang, Hopson *et al.* 2015).

Técnicas eletroquímicas também podem ser utilizadas para determinar o coeficiente de difusão de espécies no meio (Gogoi, Borah *et al.* 2015). A corrente observada no ET é limitada pela cinética de transferência de elétrons entre a espécie eletroativa e o eletrodo e pela transferência de massa de moléculas do seio da solução até a região eletroativa do ET. Neste último caso, descrito pelo coeficiente de difusão da espécie. Um método eletroquímico bem conhecido é a voltametria cíclica (VC), onde a aplicação da Equação de Randles-Seveik para processos redox reversíveis, pode ser empregada para calcular o coeficiente de difusão de espécies eletroativas (Henstridge, Laborda *et al.* 2012). Contudo, a influência de processos não faradaicos e a resistência da célula limita sensibilidade e confiabilidade do coeficiente de difusão calculado por este método especialmente para soluções diluídas. Contudo, uma determinação mais sensível do coeficiente de difusão pode ser feita usando voltametria de pulso diferencial (VPD) (Wang and Du 2004, Molina, Laborda *et al.* 2009).

A VPD é realizada pela aplicação pulso de potenciais, onde o sinal de corrente é a diferença da corrente depois e antes da aplicação do pulso. Este fato tende a eliminar efeitos de processos não-faradaicos, tornando assim a VPD uma técnica muito sensível e adequada para se extrair valores de coeficiente de difusão de soluções diluídas com maior confiabilidade em relação à VC. Desta forma, a VPD passa a ser uma técnica fascinante para o estudo de empilhamento molecular, a fim de compreender processos de autoagregação formando estruturas supramoleculares. O azul de ortotoluidina e azul de metileno são espécies poliaromáticas e podem sofrer autoagregação via empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , apresentando propriedades óticas e eletroquímicas.

O azul de ortotoluidina (AO) e o azul de metileno (AM) são compostos heterocíclicos da classe dos fenotiazínicos. Esta classe de compostos apresenta dois anéis fenil ligados entre um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre (Figura 2.1) formando um triciclo, relativamente hidrofóbico, podendo ou não ter carga positiva, e uma cadeia lateral geralmente hidrofílica.



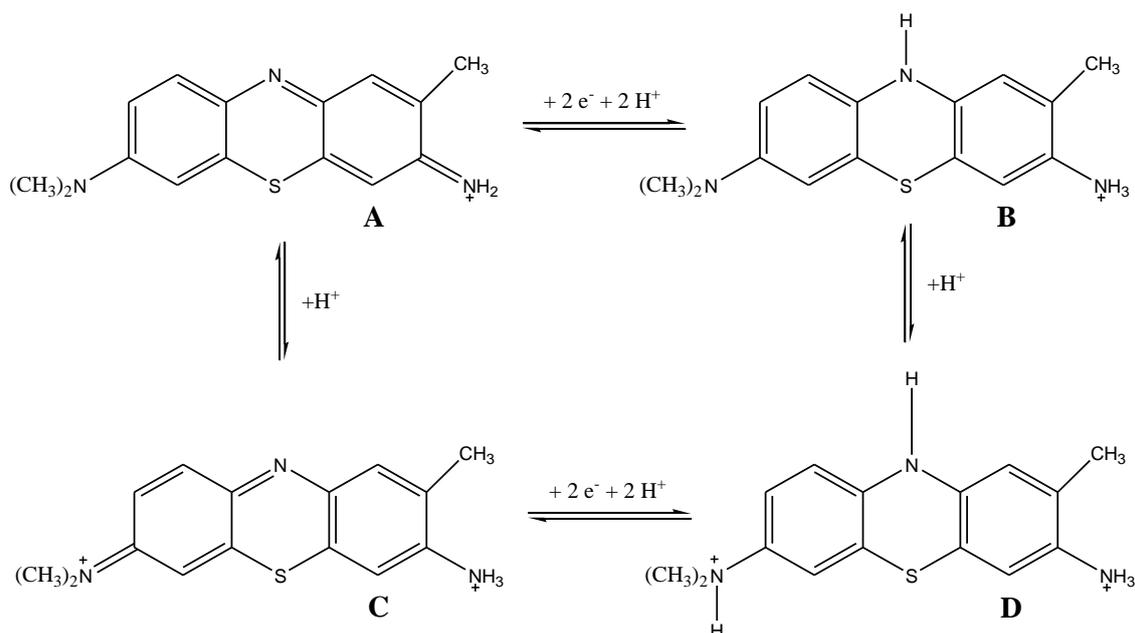
**Figura 2.1.** Estrutura molecular do AO (A) e AM (B).

Estes compostos apresentam características interessantes para várias aplicações, principalmente na área de nanomedicina, sendo empregados como fármacos, devido a sua facilidade em perder um elétron e formar um cátion radicalar (Paduszek and Kalinowski 1983). Os fenotiazínicos também podem atuar na inativação de microorganismos pela formação de oxigênio radicalar e já são empregados em medicamentos de uso clínico como antidepressivos, antihistamínicos e antipsicóticos, neste último caso, usado desde a década de 1950 (Sudeshna and Parimal 2010, Ohlow and Moosmann 2011). As ações farmacológicas dos medicamentos fenotiazínicos são largamente afetadas pela natureza dos substituintes. Com relação aos fenotiazínicos AO e AM, sua baixa toxicidade faz com que seja ingrediente interessante em formulações farmacêuticas e candidatos para serem aplicados em terapias para câncer. Em especial, estes possuem ótimas características para ser aplicada na terapia fotodinâmica, uma terapia alternativa para o tratamento de câncer (Perussi 2007, Peli, Biondo *et al.* 2011).

Pesquisas *in vivo* reportam a rápida incorporação celular e seletividade de Benzofenotiazínicos em células tumorais, sem danos a tecidos e vasculaturas periféricas (Cincotta, Foley *et al.* 1994). Com base nestas características o AO e AM (Figura 2.1) aparece como uma excelente alternativa para aplicações fotodinâmicas, sendo que este apresenta um rendimento quântico de oxigênio singlete relativamente bom, absorção na janela terapêutica, baixo rendimento quântico de fotobranqueamento, fácil acesso e baixo custo. Sua ação abrange desde fungos, bactérias, vírus e algumas linhagens de células neoplásicas (Sharma, Bansal *et al.* 2005, Donnelly, McCarron *et al.* 2007, Tsai, Chien *et al.* 2011, Al-Majmaie, Alattar *et al.* 2012, de Menezes, Rodrigues *et al.* 2014). Os fenotiazínicos também podem ser aplicados como inseticida, corante de pigmento, indicadores ácido-base (Aaron, Maafi *et al.* 1996) e na nanotecnologia como célula fotovoltaica, sensor, nanofônica, e nanoeletrônica (Shetty, Zhang *et al.* 1996, Schenning and Meijer 2005, Chen, Lohr *et al.* 2009).

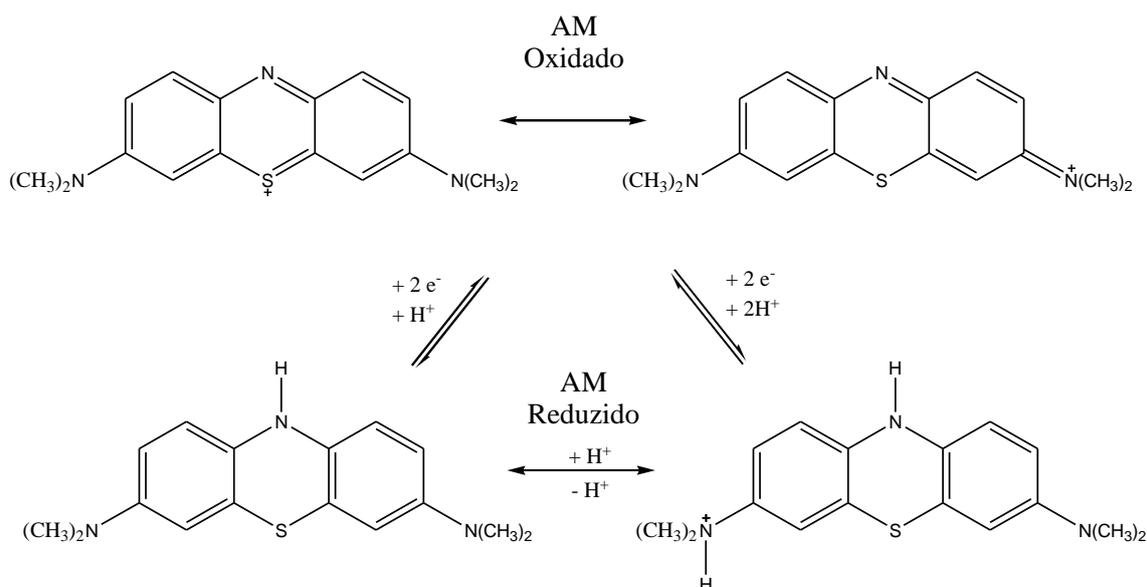
Os fenotiazínicos apresentam comportamento eletroquímico característico no meio aquoso, permitindo o uso de técnicas eletroquímicas para avaliação de efeitos de autoagregação via empilhamento molecular.

O mecanismo redox do AO e AM são conhecidos na literatura (Ong, Toorisaka *et al.* 2005, Hoffmann, Dias *et al.* 2007) e são relativamente simples, envolvendo a transferência de dois elétrons durante o processo e é dependente do pH (Figura 2.2). Para o AO, em pH superior a 5 prevalece as estruturas A e B e pH inferior a 5 prevalece o processo redox referente as estruturas C e D, como mostrado abaixo.



**Figura 2.2.** Formas estruturais no processo redox do AM em função do pH (Hoffmann, Dias *et al.* 2007).

Para o AM, em pH superior a 5,6 prevalece o equilíbrio da estrutura de ressonância do AM oxidado com a estrutura de ressonância do AM reduzido do lado esquerdo. Em pH inferior a 5,6 prevalece o equilíbrio da estrutura de ressonância do AM oxidado com a estrutura de ressonância do AM reduzido do lado direito, como mostrado abaixo.



**Figura 2.3.** Formas estruturais no processo redox do AO em função do pH (Ong, Toorisaka et al. 2005).

A simplicidade do processo redox do AO e AM assim como o conhecimento do mecanismo de transferência de elétrons e o número de elétrons envolvidos, torna estes fenotiazínicos bons compostos orgânicos eletroativos para serem empregados como sonda eletroquímica no estudo de formação de autoagregados via empilhamento  $\pi$ - $\pi$ .

Assim, neste Capítulo, foi realizada uma descrição detalhada das características eletroquímicas de AO e AM, avaliando inclusive fenômenos cinéticos que ocorrem na superfície do ET. Métodos óticos e eletroquímicos foram empregados para avaliar os processos agregacionais. Nos métodos eletroquímicos, parâmetros como coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico relativo ( $R_H^r$ ) foram avaliados para estudar o processo de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  de do AO e AM. Aplicou-se o coeficiente de difusão, estimado por VPD, para desenvolver o conceito da variação relativa do  $R_H^r$  com o intuito desvendar o crescimento molecular unidimensional. Através do  $R_H^r$  foi possível visualizar uma transição de fase do agregado supramolecular, saindo de uma estrutura unidimensional para uma estrutura tipo cluster, sendo observada pela primeira vez.

## 2.2 MATERIAIS E METODOLOGIA

### 2.2.1 Materiais

Os fenotiazínicos AO e AM foram obtidos da Nuclear, todos com grau de pureza acima de 97%. O cloreto de potássio (KCl) foi obtido da Merck com grau de pureza

acima de 98%. A água empregada para o preparo de todas as soluções estoques foi água Milli-Q.

## 2.2.2 Metodologia

### 2.2.2.1 Preparo das soluções

As soluções estoques de AO e AM foram preparadas com a introdução de KCl fornecendo uma concentração de  $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para ambos os fenotiazínicos e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para o KCl. A solução de AO e AM foram padronizada utilizando espectrofotômetro UV-Vis usando a lei de Beer e o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) em água que é  $3,04 \times 10^5$  e  $4,31 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  para o AO e AM (Braga 2014), respectivamente. As soluções estoques foram guardadas ao abrigo da luz. Antes do uso das soluções estoques, uma padronização foi realizada para certificar-se do valor correto da concentração.

### 2.2.2.2 Caracterização eletroquímica

Foi empregada a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VDP) como técnicas de caracterização eletroquímica. A célula eletroquímica constituiu de um eletrodo de trabalho (ET) de carbono vítreo, um eletrodo de referência de calomelano  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  saturado e um contra eletrodo de platina. Os voltamogramas foram obtidos empregando-se KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito suporte. Antes de realizar as medidas borbulhou-se  $\text{N}_2$  por 15 minutos na solução para remover  $\text{O}_2$  do meio aquoso. O eletrodo de trabalho foi limpo por polimento empregando-se alumina.

Através dos voltamogramas, foram extraídos os seguintes parâmetros: potencial catódico ( $E_{pc}$ ), potencial anódico ( $E_{pa}$ ), corrente de pico catódico ( $i_{pc}$ ), corrente de pico anódico ( $i_{pa}$ ) e potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ). Através dos voltamogramas foram analisadas as linearidades entre concentração e corrente do AO. A reversibilidade foi verificada variando a velocidade de varredura, avaliando o perfil do voltamograma e plotando um gráfico de corrente de pico ( $i_p$ ) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ), numa concentração constante dos fenotiazínicos. O coeficiente de transferência eletrônica ( $\alpha$ ) foi calculado plotando um gráfico de potencial de pico ( $E_p$ ) versus  $\ln v$ , Equação de Laviron (Laviron 1979) (Equação 2.1):

$$E_{pc} = E^{\circ} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left( \frac{RTk_s}{\alpha nF} \right) - \frac{RT}{\alpha nF} \ln v \quad \text{Equação 2.1}$$

sendo  $E_{pc}$  o potencial de pico catódico (V),  $E^{\circ}$  é o potencial formal (V),  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (K),  $n$  é o numero de elétrons envolvido no processo redox,  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ),  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica,  $k_s$  constante de velocidade padrão da reação de superfície ( $\text{cm s}^{-1}$ ). Os valores de  $E^{\circ}$  podem ser determinados através do plot de  $E_{pc}$  versus  $v$  pela extrapolação da reta onde  $v = 0$  (coeficiente linear).

A reversibilidade do sistema foi avaliada empregando a Equação de Randles-Sevcik, Equação 2.2 (A. J. Bard 1980) fazendo o plot de  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$ .

$$i_{pc} = 0,4463 \cdot \left( \frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A D_{ap}^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 2.2}$$

sendo  $i_{pc}$  a corrente de pico catódica (A),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (em Kelvin),  $A$  é a área do eletrodo ( $0,785 \text{ cm}^2$ ),  $n$  é o número de elétrons envolvido ( $n = 2$ ) no processo redox,  $D$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $C$  é a concentração ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).

### 2.2.2.3 Estimativa dos coeficientes de difusão

Para estimativa do coeficiente de difusão empregando-se a técnica de VPD, variou-se o tempo de modulação ( $t_m$ ) para a obtenção dos voltamogramas, onde plotou-se um gráfico de  $i_{pc}$  versus  $(t_m)^{-1/2}$ , onde através da reta pode-se extrair o coeficiente angular e empregando a Equação 2.3 para VPD (A. J. Bard 1980, Brett 1996), estimou-se os valores de  $D_{ap}$ .

$$i_{pc} = \frac{nFAD_{ap}^{1/2}C}{(\pi t_m)^{1/2}} \left( \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Equação 2.3}$$

sendo  $\pi = 3,14$ ,  $t_m$  é o tempo entre a segunda e a primeira leitura de corrente (0,1 s),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $A$  é a área do eletrodo ( $0,785 \text{ cm}^2$ ),  $n$  é o

número de elétrons envolvido ( $n = 2$ ) no processo redox,  $D_{ap}$  é o coeficiente de difusão aparente ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) e  $\sigma$  é dado pela Equação 2.4 abaixo:

$$\sigma = e^{\left(\frac{nF \Delta E}{RT \cdot 2}\right)} \quad \text{Equação 2.4}$$

sendo  $\Delta E$  a amplitude do pulso (V).

#### 2.2.2.4 Espectroscopia UV-Visível

Para estas medidas foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis DU800 com controlador de temperatura de alto desempenho do tipo peltier da Beckman/Coulter Electronics. Foram adicionados alíquotas da solução estoque dos fenotiazínicos numa cubeta de poliestireno de caminho ótico de 1,0 cm contendo solução aquosa de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> totalizando 2,0 mL e a concentração desejada. Para as soluções mais concentradas, o volume de 2,0 mL foi transferido para uma cubeta de vidro de caminho ótico de 0,1 cm, para evitar problemas de filtro interno. Os gráficos de absorvância *versus* comprimento de onda foram registrados.

#### 2.2.2.5 Espectroscopia de fluorescência e RLS

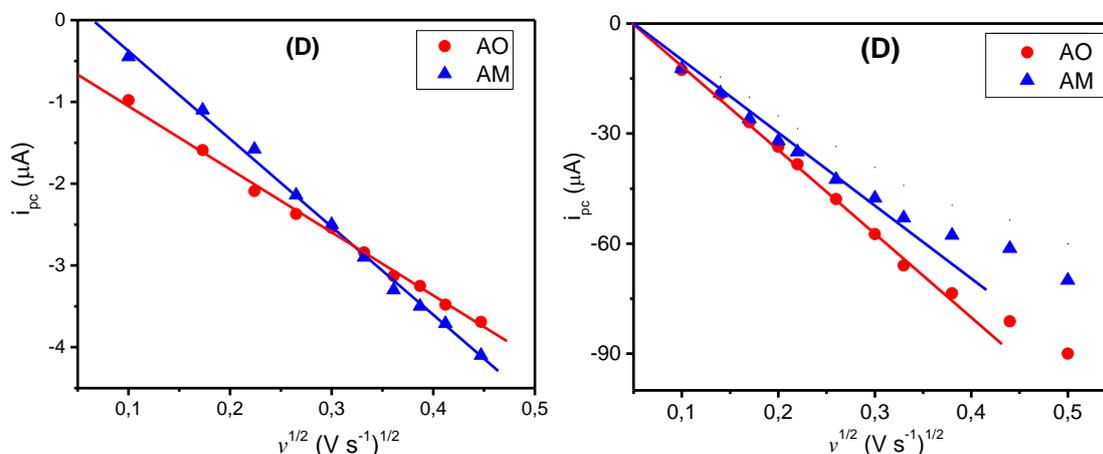
Nas medidas de emissão de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian/Agilent Technologies com sistema Peltier para controle eletrônico de temperatura. Foram adicionados alíquotas da solução estoque dos fenotiazínicos numa cubeta de poliestireno de caminho ótico de 1,0 cm contendo solução aquosa de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> totalizando 2,0 mL e a concentração desejada. O comprimento de onda de excitação foi de 560 nm para ambos os fenotiazínicos. No caso das medidas de RLS, foi utilizado o modo síncrono com delta de 5 nm.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Avaliação do efeito de adsorção dos fenotiazínicos

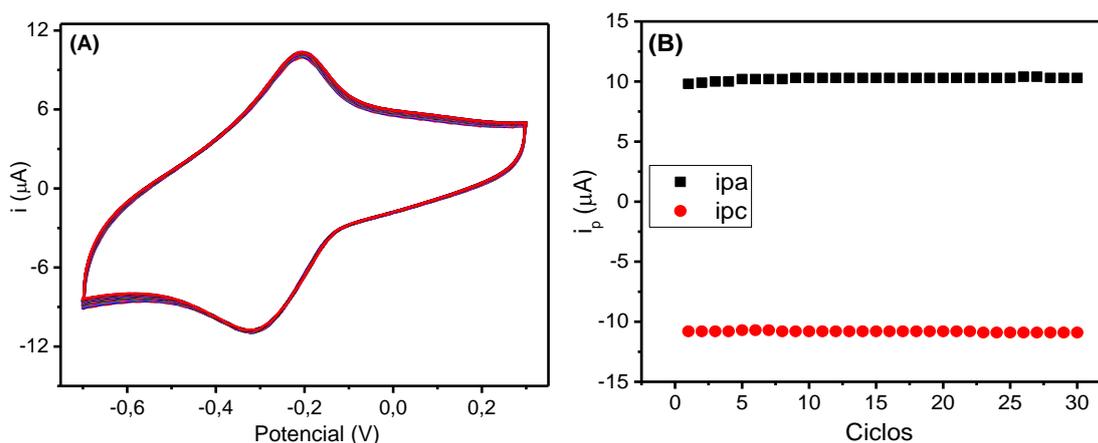
No presente estudo, efeitos de adsorção não são desejados para avaliar processos de transferência de massa e carga. Tais efeitos podem afetar a interpretação dos resultados. Desta forma, experimentos preliminares foram realizados para avaliar os efeitos de adsorção dos fenotiazínicos na superfície do ET (carbono vítreo).

Variando a velocidade de varredura pelo método de VC e fazendo-se um gráfico de  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$ , é possível verificar se o processo redox é controlado por difusão. A linearidade deste gráfico indica que o processo redox é reversível e controlado por difusão. (A. J. Bard 1980). Na Figura 2.4A, baixa concentração de fenotiazínico, verifica-se uma boa linearidade em toda a faixa de velocidade de varredura, indicando que o processo redox é reversível e controlado por difusão nestas condições. Na Figura 2.4B, alta concentração de fenotiazínico, verifica-se que a linearidade se mantém apenas em baixas velocidades de varredura. A quebra da linearidade, aproximadamente em  $90 \text{ mV s}^{-1}$ , indica que o processo redox perde a reversibilidade e que pode estar sendo controlado por fenômenos de adsorção. Por esta razão, os experimentos de variação da concentração foram conduzidos em  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Assim, como nesta velocidade de varredura o ponto está inserido na região linear, Figura 2.4, o processo redox é controlado pela difusão da espécie e não pela quantidade de espécie adsorvida no ET. Sendo assim, a etapa de difusão é a limitante no processo redox que ocorre na superfície do eletrodo. Uma discussão mais detalhada sobre reversibilidade será feita na seção 2.4.3.



**Figura 2.4.** Plot  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$ . **A)** Baixa concentração de fenotiazínico ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). **B)** Alta concentração de fenotiazínico ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

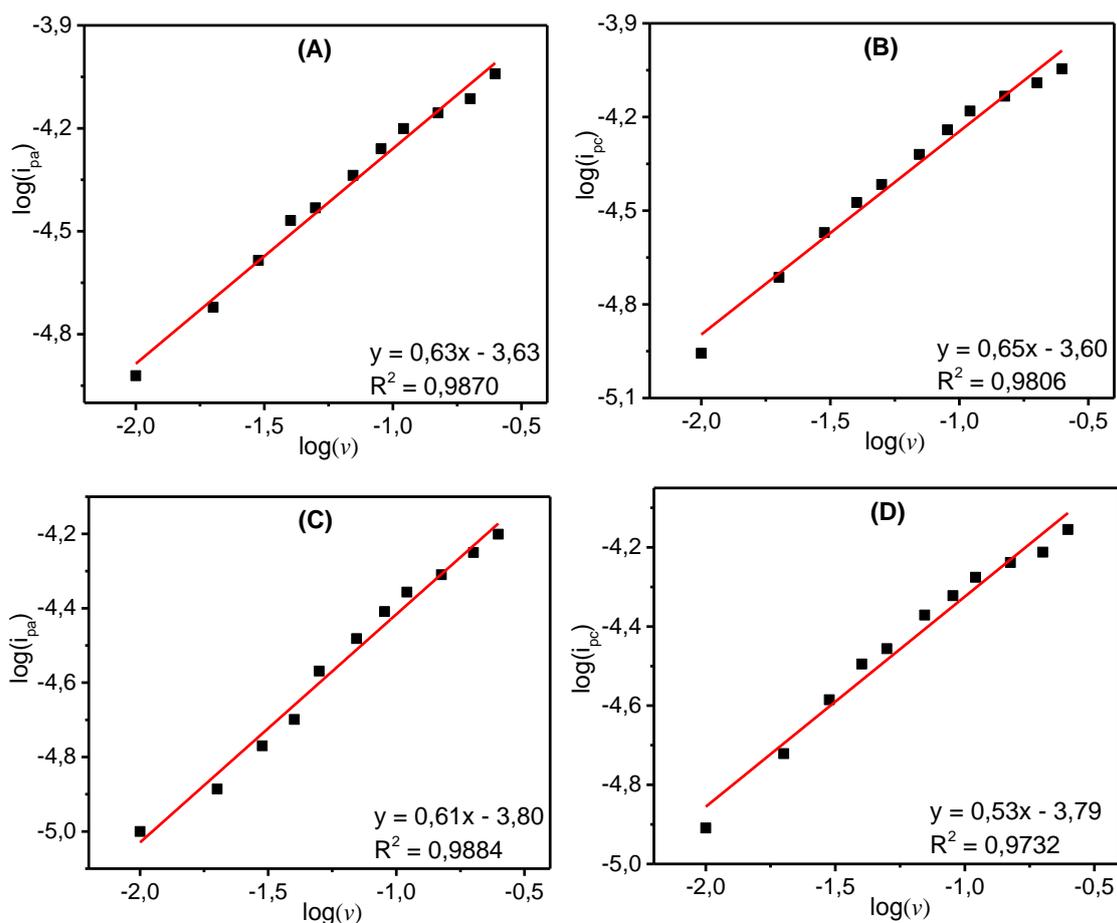
Um processo de adsorção dos fenotiazínicos, possivelmente verificaria uma alteração na corrente com o aumento do número de ciclos, indicando maior concentração local devido à adsorção, ou observaríamos uma redução na corrente, mostrando uma passivação do eletrodo. Contudo, não se observou uma variação significativa na corrente nem no potencial, como pode ser observado na Figura 2.5.



**Figura 2.5.** VC do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** Vários ciclos. **B)**  $i_p$  em função do número de ciclos.

Este resultado sugere que o processo de adsorção de moléculas de fenotiazínicos na superfície do eletrodo de carbono vítreo não é significativo, a ponto de mudar as propriedades eletroquímicas dos fenotiazínicos, como por exemplo, processos transferência de massa e carga avaliadas neste trabalho em função da formação de autoagregados. Por exemplo, Borguet observou uma redução drástica na corrente com o processo de adsorção de moléculas de porfirina (Ye, He *et al.* 2006) enquanto que Chandrashekar verificou um aumento na corrente do azul de bromotimol no processo de adsorção (Chandrashekar, Swamy *et al.* 2009). Adicionalmente, processos de adsorção tendem a alterar as energias dos estados redox, e, portanto, alterar a resposta eletroquímica das moléculas (Ni and Anson 1985, Hutchison, Postlethwaite *et al.* 1997).

Efeitos de adsorção podem ser avaliados através do gráfico  $\log(i_p)$  em função  $\log(v)$ , Figura 2.6, onde valores de coeficiente angular próximos de 0,5 e 1,0 indicam que o mecanismo redox é dominado pela difusão e adsorção, respectivamente (Kamyabi and Shafiee 2012, Tasdemir, Ece *et al.* 2012).

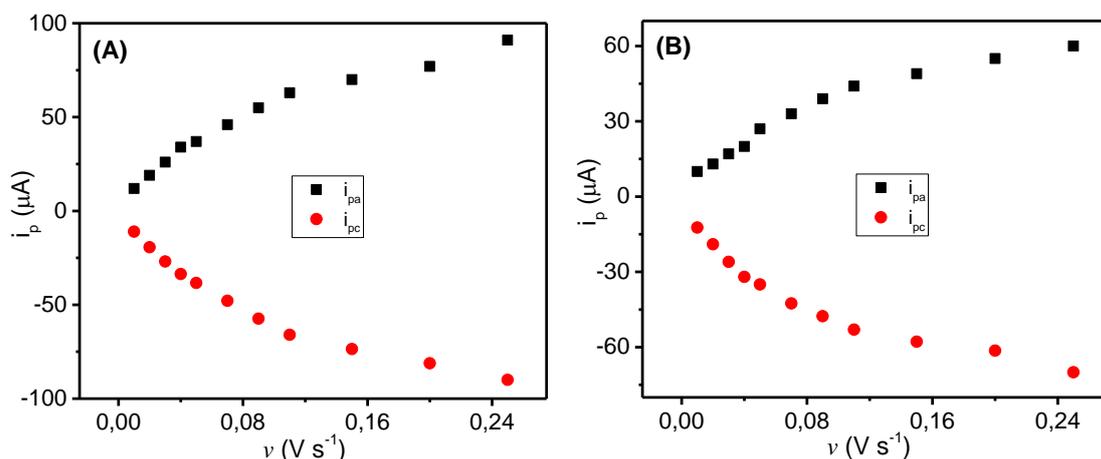


**Figura 2.6.** Plot  $\log(i)$  versus  $\log(v)$ . **A)** Referente ao pico anódico para o AO. **B)** Referente ao pico catódico para o AO. **C)** Referente ao pico anódico para o AM. **D)** Referente ao pico catódico para o AM.

Verifica-se que em todos os gráficos o coeficiente angular se aproximou mais de 0,5, sugerindo que o processo dominante no mecanismo redox é a difusão. Adicionalmente, a avaliação da corrente de pico (Chen, Stepanenko *et al.*) em função da velocidade de varredura ( $v$ ), Figura 2.7, também fornece informações sobre efeitos de adsorção. É conhecido que a dependência linear entre  $i_p$  e  $v$ , como mostrado na Equação 2.5, indica influência significativa de processos de adsorção (A. J. Bard 1980, Brett 1996, Kissinger and Heineman 1996, Erdogan, Taşdemir *et al.* 2011).

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} \cdot v \quad \text{Equação 2.5}$$

no qual  $i_p$  é a corrente de pico (A),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (em Kelvin),  $A$  é a área do eletrodo ( $0,785 \text{ cm}^2$ ),  $n$  é o número de elétrons envolvido ( $n = 2$ ) no processo redox,  $\Gamma$  é a concentração da espécie adsorvida no eletrodo ( $\text{mol cm}^{-2}$ ) e  $\nu$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).



**Figura 2.7.** Plot  $i_p$  versus  $\nu$ . **A)** Para o AO. **B)** Para o AM.

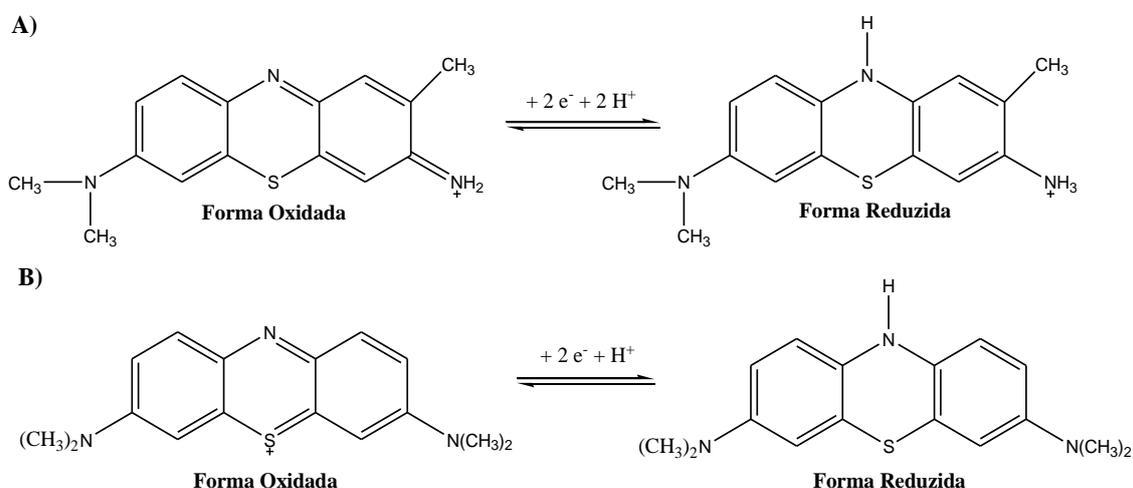
Na Figura 2.7 é possível observar uma dependência não linear entre corrente e velocidade de varredura, sugerindo que nos sistemas estudados processos de adsorção não devem influenciar significativamente nos mecanismos de transferência de massa e carga.

Empregando-se a Equação 2.5 e os coeficientes angulares das Figuras 2.7A e B, calculou-se a concentração aproximada de fenotiazínicos adsorvidos no ET ( $\Gamma$ ). Desta forma, encontraram-se as concentrações de  $1,09 \times 10^{-10}$  e  $7,49 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$  para o AO e AM, respectivamente. Tais valores são insignificantes mesmo nas condições de menores concentrações dos fenotiazínicos. Assim, no presente trabalho processos de adsorção foram desprezados tendo em vista sua insignificante influência.

#### 2.4.2 Caracterização eletroquímica do AO e AM em meio aquoso

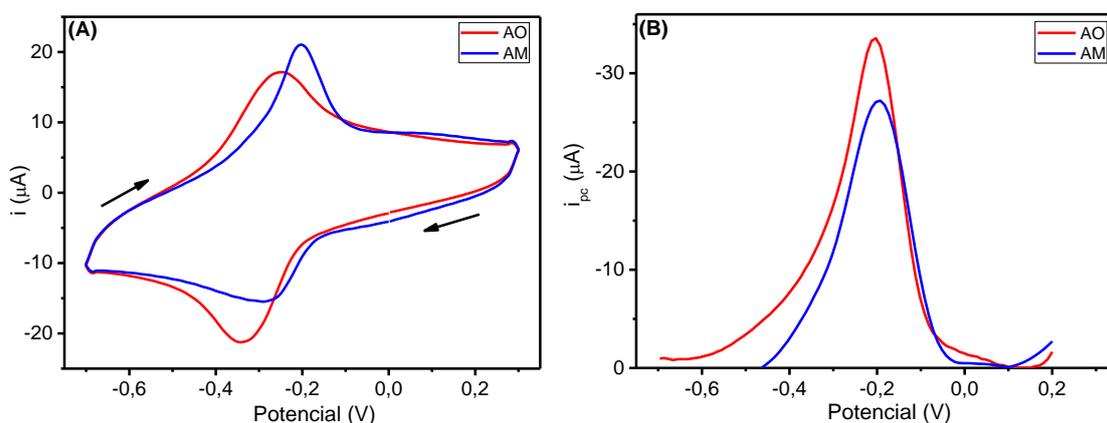
Em geral, os fenotiazínicos apresentam um processo redox com picos relativamente bem definidos, onde o processo redox é atribuído à região central do heterocíclico da molécula e envolve a transferência de dois elétrons ( $n = 2$ ). Tal característica torna os fenotiazínicos bons compostos para serem empregados como

sondas eletroquímicas. Abaixo segue o equilíbrio redox do AO e AM nas condições experimentais trabalhadas.



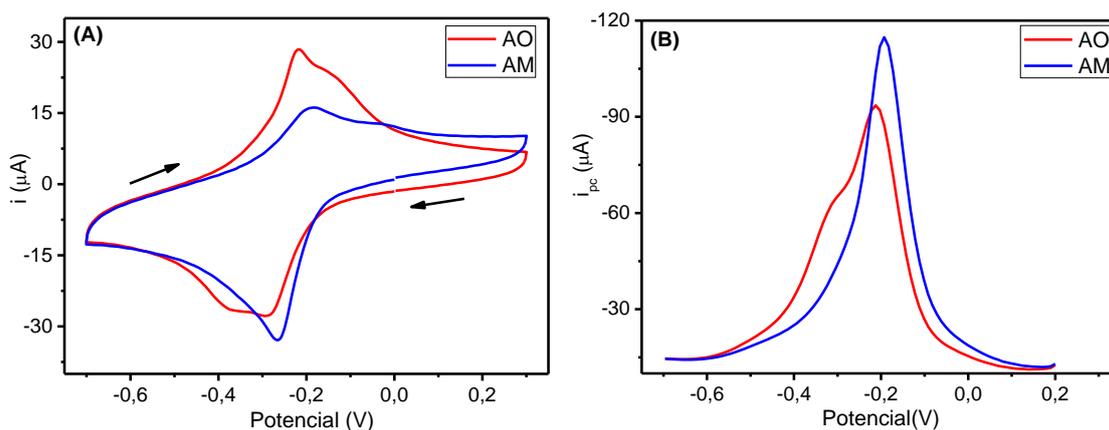
**Figura 2.8.** A) Equilíbrio redox do AO em  $\text{pH} > 5$ . B) Equilíbrio redox do AM em  $\text{pH} > 5,6$  (Hoffmann, Dias *et al.* 2007, Ong, Toorisaka *et al.* 2005).

Em todos os experimentos envolvendo fenotiazínicos o  $\text{pH}$  permaneceu entre 6,0 e 6,3. É importante ressaltar que em ambos os equilíbrios a forma reduzida tende a ser mais hidrofílica do que a forma oxidada, devido a maior capacidade de fazer ligações de hidrogênio em meio aquoso. O VC mostra que o AO e AM apresentam processos redox aparentemente reversíveis em meio aquoso na concentração de  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ , Figura 2.9.



**Figura 2.9.** Eletroquímica dos fenotiazínicos ( $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso,  $\text{KCl}$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . A) VC. B) VPD.

Comparando a técnica de VC e VPD observa-se uma maior sensibilidade para a técnica de VPD devido principalmente aos menores efeitos de corrente capacitiva, fornecendo picos catódicos mais intensos, Figura 2.9B. Este fato permite analisar com maior precisão a quantidade de espécies eletroativas no meio. Assim, a Figura 2.9B sugere uma maior quantidade de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho na seguinte ordem crescente  $AM < AO$ . O maior valor de corrente catódica ( $i_{pc}$ ) para o AO está relacionado com dois fatores: *i*) maior transferência de massa, o que implica em maior coeficiente de difusão, de moléculas do seio da solução até a região eletroativa do ET e *ii*) maior transferência de carga, o que implica em maior velocidade com que moléculas de AO transferem elétrons para o ET. A influência destes dois fatores serão discutidos mais adiante. Fazendo-se os mesmos voltamogramas, porém em concentrações mais elevadas ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) verifica-se uma mudança no perfil dos mesmos, devido ao aparecimento de ombros adicionais, Figura 2.10.



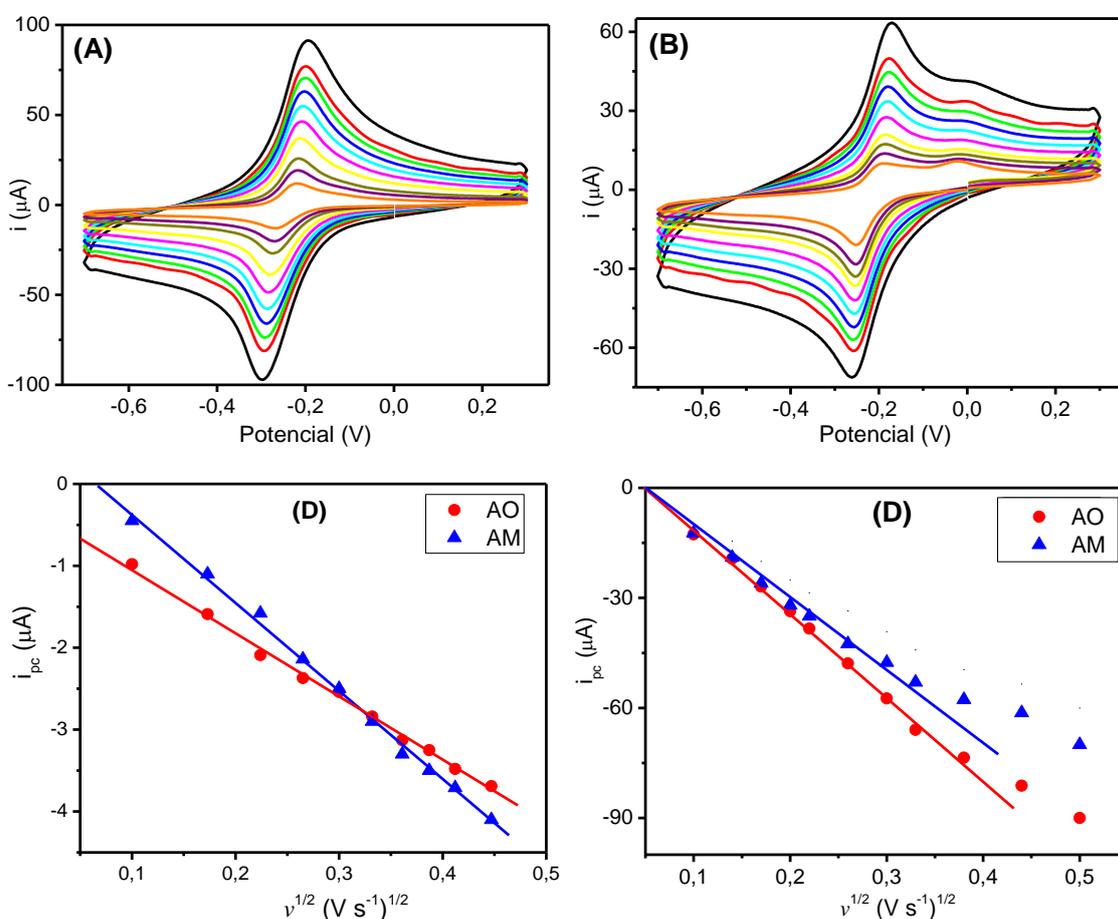
**Figura 2.10.** Eletroquímica dos fenotiazínicos ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso, KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** VC. **B)** VPD.

Os ombros adicionais, observados na Figura 2.10, podem estar relacionados a processos redox de espécies autoagregadas no meio aquoso. Tal resultado, não significa que na concentração de  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 2.9) não existe autoagregados de fenotiazínicos no meio aquoso, mesmo porque a literatura reporta que tais espécies podem estar presentes no meio aquoso na forma de dímeros a partir de  $8 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Braga 2014). Contudo, mostra que apenas em altas concentrações de fenotiazínico as técnicas de VC e VPD podem visualizar processos de autoagregação molecular.

Nas duas concentrações, 150 e 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$  é possível observar uma diferença no potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) sendo -290 e -240 mV para o AO e AM, respectivamente, para a concentração de 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A diferença de 50 mV para no potencial, indica que o AM sofre o processo redox mais facilmente. Este fato está relacionado com o maior número de grupos metilênicos ligados ao anel heterocíclico, que aumentam a densidade de elétrons no mesmo por efeito indutivo doador de elétrons. Adicionalmente, verifica-se que a redução do AM é facilitada e a oxidação é dificultada em relação ao AO, sugerindo que o efeito indutivo doador de elétrons dos grupos metilênicos estabilizam mais a forma reduzida do AM.

### 2.4.3 Estudo da reversibilidade

Para avaliar melhor a reversibilidade eletroquímica do AO e AM, verificou-se o comportamento da corrente em função da velocidade de varredura. Para isso, aplicou-se a Equação 2.2 de Randles-Sevcik para processos reversíveis (A. J. Bard 1980) fazendo o plot de  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$ , Figura 2.11C e D.



**Figura 2.11.** VC dos fenotiazínicos ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso, KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), variando a velocidade de varredura ( $10 - 200 \text{ mV s}^{-1}$ ) e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** AO; **B)** AM; **C)** Plot de  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$  ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e **D)** Plot de  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$  ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

O plot de  $i_{pc}$  versus  $v^{1/2}$  foi realizado em duas concentrações, sendo  $6$  e  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ , para verificar o efeito da presença de autoagregados na reversibilidade eletroquímica dos fenotiazínicos. Em baixa concentração (Figura 2.11C), onde supostamente não há presença de agregados, percebe-se uma boa linearidade, indicando que o processo redox é reversível e controlado por difusão em toda a faixa de velocidade de varredura estudado. Contudo, em alta concentração (Figura 2.11D), verifica-se um desvio da linearidade nas proximidades de  $90 \text{ mV s}^{-1}$ , indicando que para ambos os compostos o processo é reversível e controlado por difusão apenas em baixas velocidades de varredura. Estes resultados sugerem que a formação de autoagregados tende a reduzir a reversibilidade do processo redox dos fenotiazínicos. Além disso, é plausível mencionar que o desvio da linearidade é mais acentuado para o AM, pois por ser relativamente mais hidrofóbico que o AO, tem maior tendência em formar mais autoagregados tornando o processo redox menos reversível, especialmente acima de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

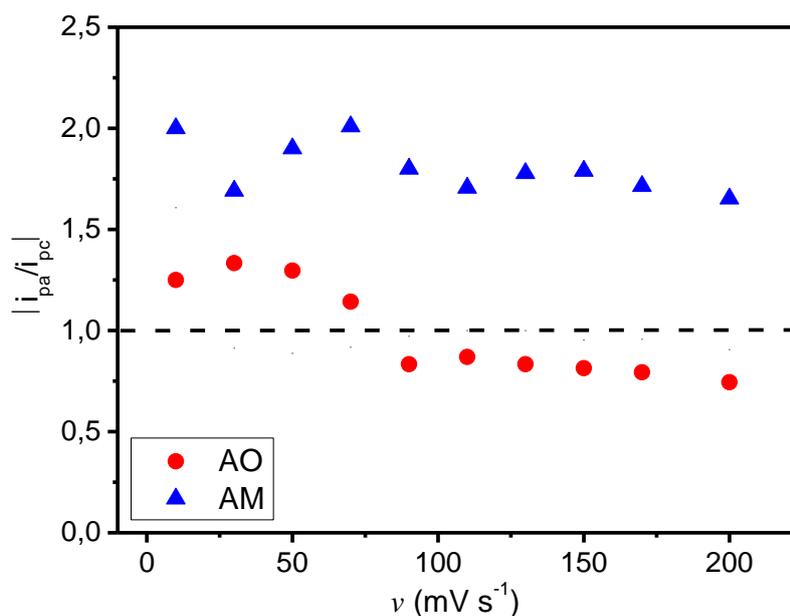
A Tabela 2.1 mostra que em todas as velocidades tem-se uma maior facilidade de ocorrer o processo redox para o AM, ou seja, a análise feita anteriormente, com relação aos valores de  $E_{1/2}$ , é válida para todas as velocidades de varredura estudada.

Os parâmetros  $n\Delta E$  e  $|i_{pa}/i_{pc}|$  também ajudam a entender a reversibilidade do processo, sendo que  $n\Delta E = 59 \text{ mV}$  indica reversibilidade do processo redox e  $|i_{pa}/i_{pc}| = 1,0$  indica reversibilidade de carga (A. J. Bard 1980, Brett 1996). Com relação aos valores de  $n\Delta E$ , observa-se que em baixas velocidades os valores estão próximos de  $59 \text{ mV}$  para ambos os compostos, no entanto, tende a aumentar com aumento da velocidade de varredura. Este resultado indica que os processos redox na superfície do ET são muito rápidos (Chakraborty, Ahmed *et al.* 2010) e confirma que o processo redox é reversível em baixas velocidades de varredura sendo mais reversível para o AO. Adicionalmente, verifica-se que os valores  $n\Delta E$  são maiores para o AM na maioria das velocidades de varreduras. As diferenças nos valores de  $n\Delta E$  indicam diferentes barreiras termodinâmicas no estado de transição (A. J. Bard 1980), de forma que, menores valores para o AO sugere menor barreira em relação ao AM.

**Tabela 2.1.** Parâmetros eletroquímicos ( $E_p$ ,  $E_{1/2}$ ,  $n\Delta E_p$  e  $i_{pa}/i_{pc}$ ) dos fenotiazínicos ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio aquoso e em várias  $\nu$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$\nu$ ( $\text{mV s}^{-1}$ )		$E_{pa}$ (mV)	$E_{pc}$ (mV)	$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ (mV)	$n( E_{pc}  -  E_{pa} )$ (mV)	$ i_{pa}/i_{pc} $
10	AO	-262	-315	-289	53	1,25
	AM	-250	-299	-275	49	2,00
30	AO	-262	-315	-289	53	1,33
	AM	-250	-306	-278	56	1,69
70	AO	-262	-350	-306	88	1,14
	AM	-250	-340	-295	90	2,01
90	AO	-262	-350	-306	88	0,833
	AM	-250	-351	-301	101	1,80
130	AO	-262	-380	-321	118	0,833
	AM	-250	-361	-306	111	1,78
150	AO	-262	-380	-321	118	0,814
	AM	-250	-377	-312	127	1,79

Com relação aos valores de  $|i_{pa}/i_{pc}|$ , que avalia a reversibilidade de carga, graficou-se o mesmo em função da velocidade de varredura para compreender melhor o comportamento, Figura 2.12.

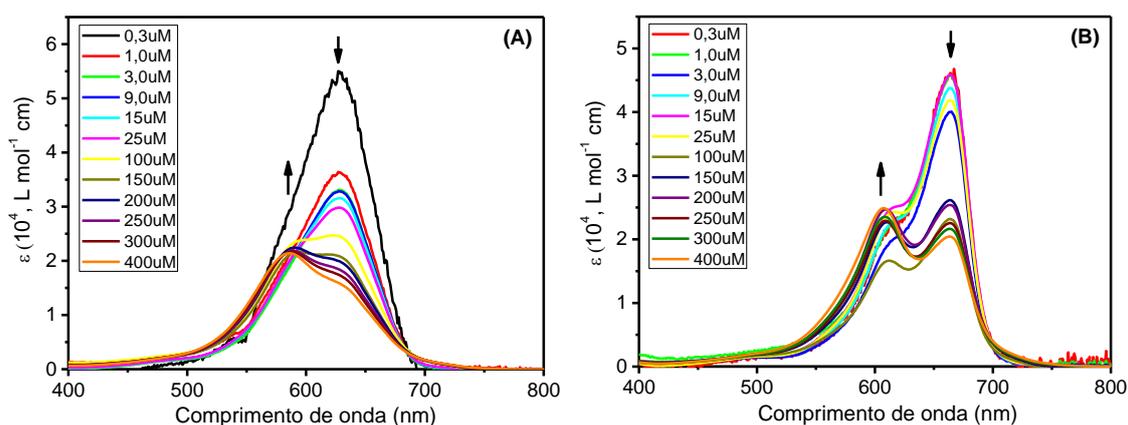


**Figura 2.12.** Modulo da razão entre as correntes de picos ( $|i_{pa}/i_{pc}|$ ) versus velocidade de varredura, para os fenotiazínicos ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Observa-se na Figura 2.12, que mesmo nas condições de baixa concentração, os fenotiazínicos não exibem uma reversibilidade carga perfeita ( $|i_{pa}/i_{pc}| = 1$ ). Contudo, verifica-se que os valores de  $|i_{pa}/i_{pc}|$  estão mais próximos da unidade para o AO, indicando novamente que o AO apresenta uma maior reversibilidade de carga. Desta forma, vemos que reversibilidade de carga segue a tendência contrária a hidrofobicidade, ou seja, quanto menos hidrofóbico mais reversível.

#### 2.4.4 Estudo da autoagregação do AO e AM em meio aquoso

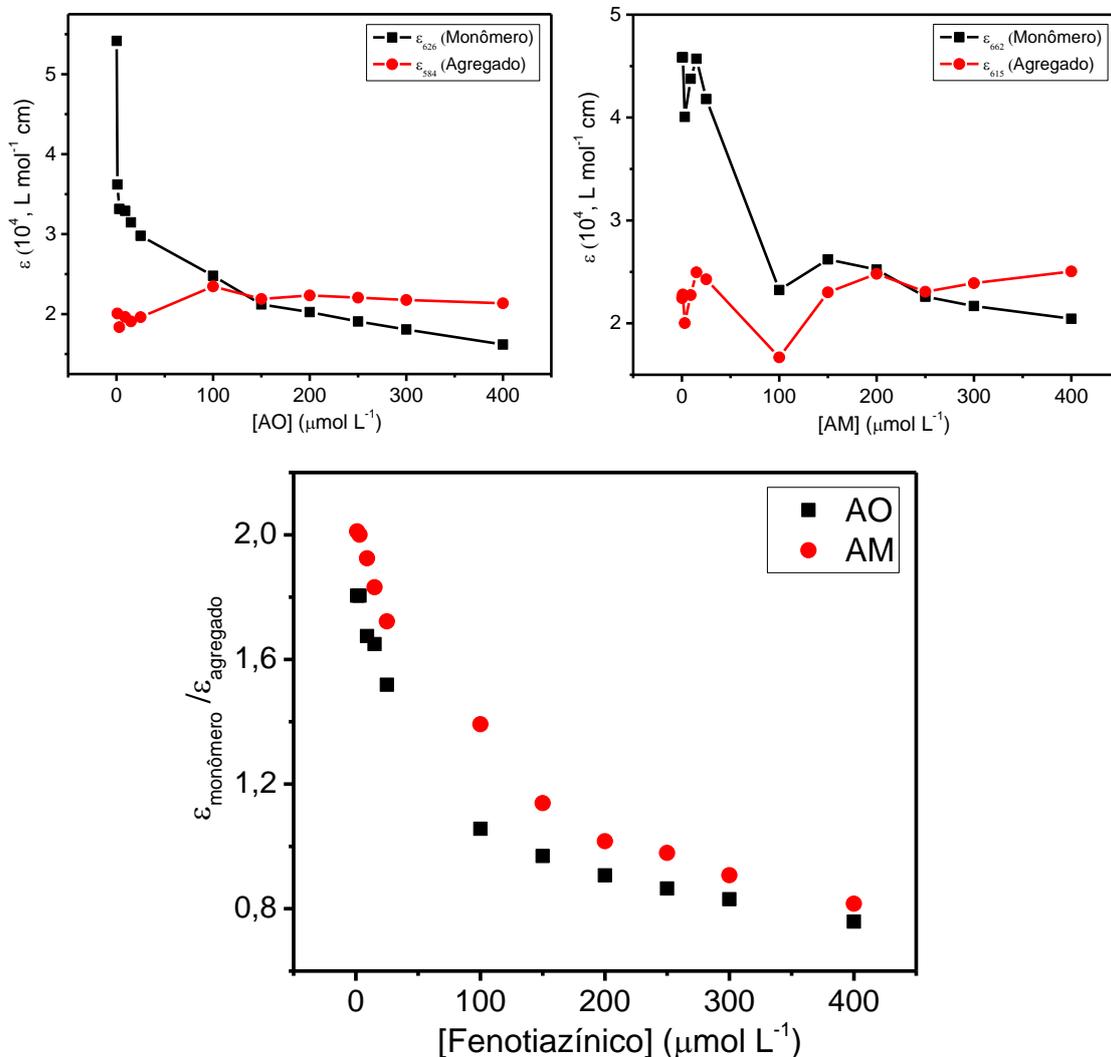
Como é conhecido, moléculas de fenotiazínicos tendem a se autoagregarem em solução aquosa. Tal agregação gera um empilhamento molecular que é favorecido tanto por forças de van de Waals quanto pela polarizabilidade destas moléculas. Inicialmente os estudos de autoagregação foram conduzidos empregando as técnicas óticas tradicionais. Tais técnicas permitem monitorar as moléculas na forma monoméricas e autoagregadas. Abaixo segue os espectros de absorvidade molar em função do comprimento de onda para os fenotiazínicos.



**Figura 2.13.** Espectros de absorvidade molar em função do comprimento de onda a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. **A)** AO e **B)** AM.

Verifica-se a presença das bandas de monômeros  $626$  e  $662$  nm para o AO e AM, respectivamente e bandas características de agregados  $584$  e  $615$  nm para o AO e AM, respectivamente. Em ambos os espectros, observa-se uma redução do pico

referente a monômero e um aumento do pico referente a agregado com o aumento da concentração. Para compreender tais mudanças, construíram-se gráficos de absorvidade molar em função da concentração, Figura 2.14.

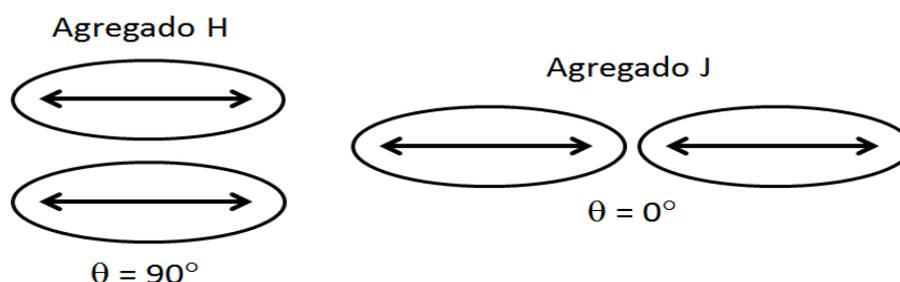


**Figura 2.14.** Absorvidade molar e razão das absorvidades molares em função da concentração de fenotiazínico.

Verifica-se que a absorvidade molar dos monômeros diminui, mas não na mesma proporção do aumento da absorvidade molar dos agregados. A razão das absorvidades molares (monômero/agregado) mostra dois regimes de variação, que é atribuído ao processo de autoagregação.

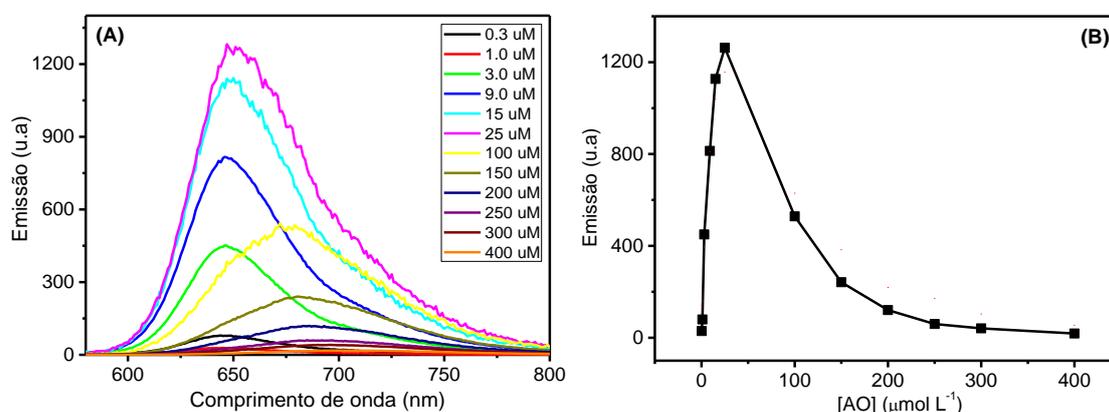
De acordo com a teoria de éxciton, dois modelos de empilhamento molecular de cromóforos são possíveis no processo de autoagregação (Kasha, Rawls *et al.* 1965). No modelo 1 (agregado H), moléculas de cromóforo estão empilhadas paralelamente

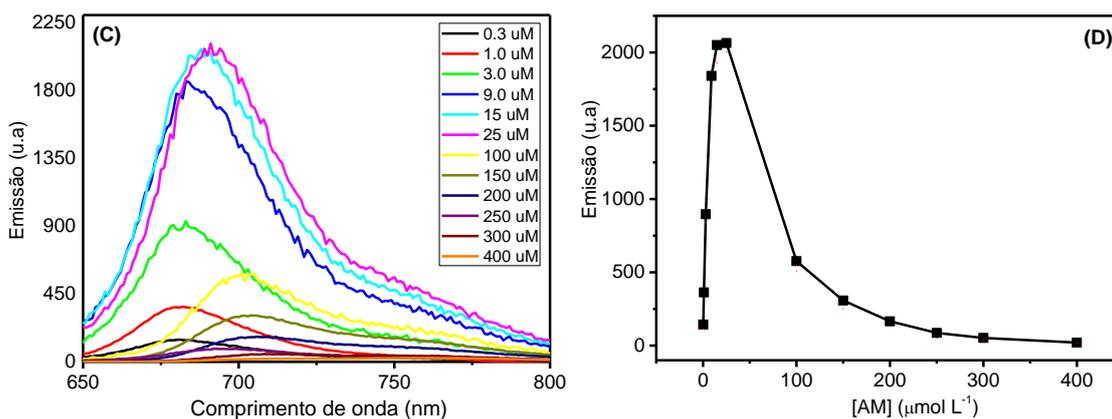
(*twisted sandwich-like*) enquanto que no modelo 2 (agregado J), moléculas de cromóforo estão alinhadas no mesmo plano (*oblique head-to-tail*). Desta forma, num sistema real, o agregado H e J são possíveis. No entanto, a literatura tem reportado que cromóforos catiónicos planares tende a apresentarem majoritariamente agregados do tipo H em meio aquoso, devido às elevadas forças de van der Waals e dipolo-dipolo que ocorrem em curta distância no processo de empilhamento molecular (Ghanadzadeh, Zeini *et al.* 2008). Assim, atribuiremos daqui em diante que o processo de empilhamento conduz a formação de uma estrutura supramolecular do tipo *twisted sandwich-like* (Figura 2.15). Os autoagregados do tipo H são observados quando o ângulo ( $\theta$ ) entre a direção dos momentos dipolares e a linha que une os centros moleculares aproxima-se de  $90^\circ$ . Enquanto para autoagregados do tipo J,  $\theta$  aproxima-se de  $0^\circ$  (Figura 2.15) (Kasha, Rawls *et al.* 1965).



**Figura 2.15.** Representação de autoagregados (dímeros) baseado na teoria do éxiton (Kasha, Rawls *et al.* 1965).

A fim de se obter maiores informações sobre o processo de empilhamento molecular, realizaram-se estudos de emissão da fluorescência e espalhamento de luz ressonante, Figura 2.16.

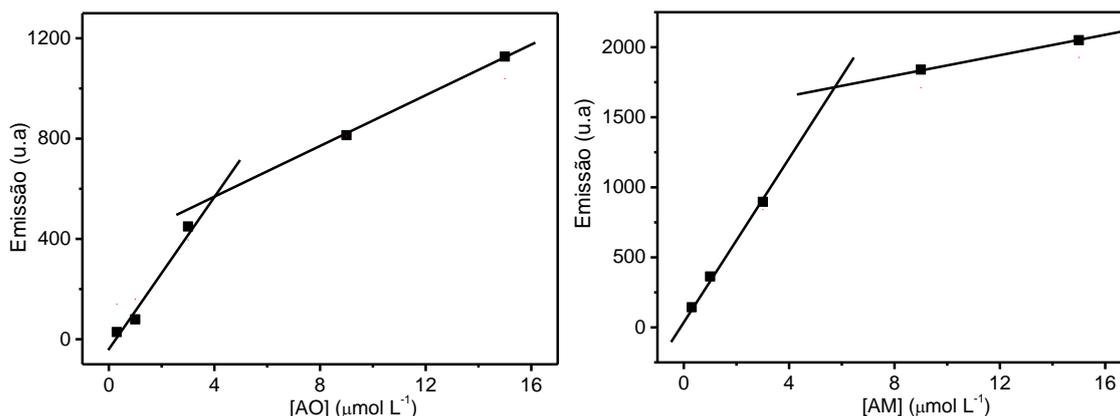




**Figura 2.16.** Espectros de emissão de fluorescência em função da concentração,  $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm}$ ,  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. A emissão foi coletada no pico de máxima emissão. **A)** e **B)** Referente ao AO. **C)** e **D)** Referente ao AM.

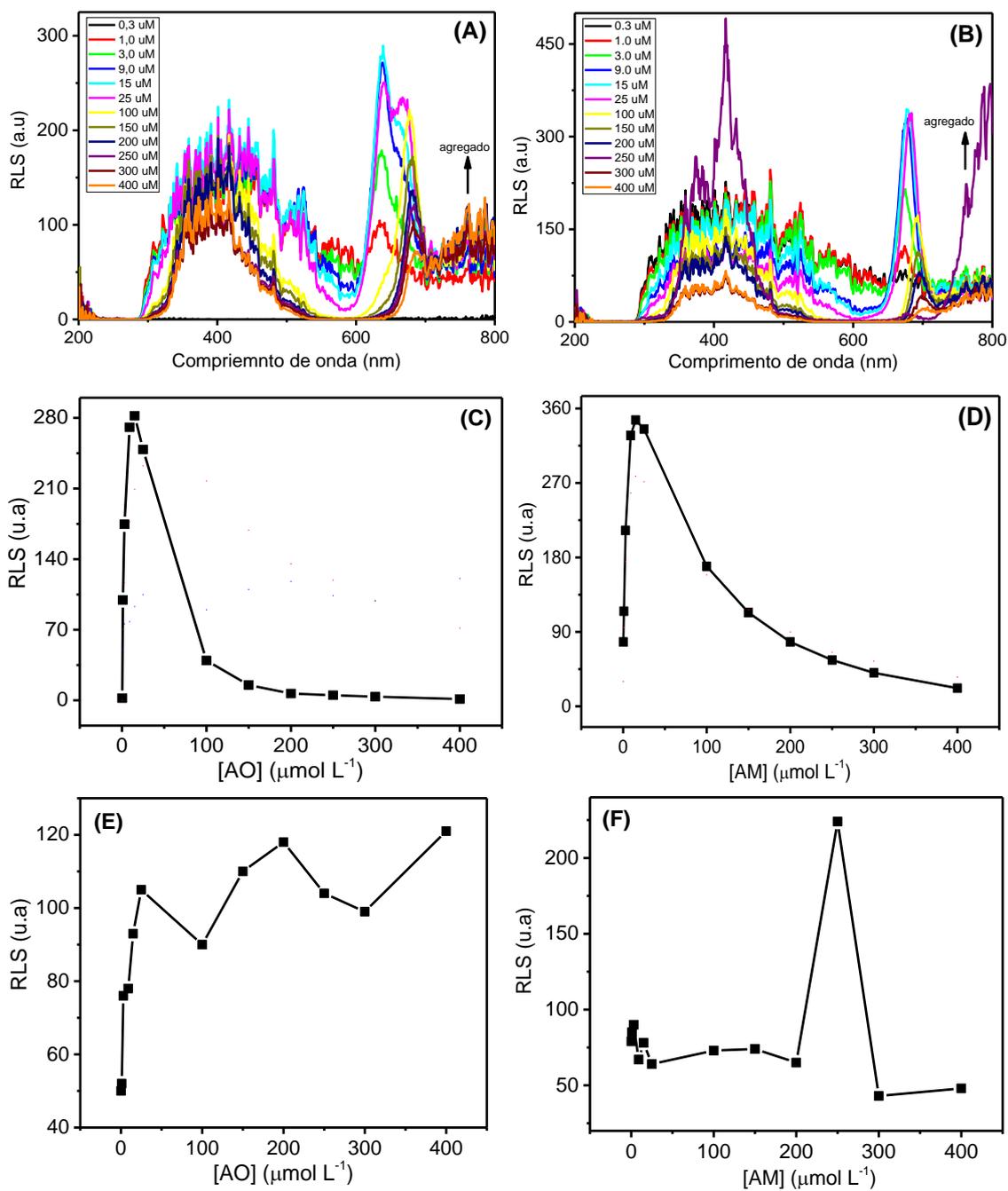
Nas Figuras 2.16A e C, verifica-se um deslocamento batocrômico do pico de máxima emissão indicando a desativação dos estados excitados com o aumento da concentração de fenotiazínicos. Nas Figuras 2.16B e D, observa-se inicialmente um aumento da emissão com o aumento da concentração de fenotiazínicos até  $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , onde depois desta concentração a emissão tende a reduzir drasticamente até uma região de menor variação com o aumento da concentração de fenotiazínico. Esta drástica redução da emissão esta relacionado principalmente ao empilhamento molecular, que causa desativação do estado excitado por processos colisionais (não radioativos). Na região onde a emissão varia muito pouco com o aumento da concentração dos fenotiazínicos, fica evidente que o empilhamento molecular gera uma estrutura supramolecular que emite pouca fluorescência. Isto é perfeitamente factível, sabendo que estruturas supramoleculares causam um grande número de colisões entre as moléculas empacotadas que interagem fortemente por forças de van der Waals e dipolo-dipolo.

Ampliando a região de baixa concentração, verifica-se um desvio da linearidade nas proximidades das concentrações de  $4 \text{ e } 6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para o AO e AM, respectivamente, Figura 2.17. Este desvio pode estar relacionado com a formação de autoagregados de fenotiazínicos e efeito de filtro interno, que é a reabsorção de luz pelas moléculas devido à alta concentração (Yazdani, Irandoust *et al.* 2012).



**Figura 2.17.** Espectros de emissão de fluorescência em função da concentração do AO e AM,  $\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$ ,  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

A existência de agregados e o processo de empilhamento molecular, também foram investigados empregando-se medidas de espalhamento de luz ressonante (RLS) no modo sincrônico com delta de 5 nm. Verifica-se para ambos os casos uma emissão residual em 637 nm com um ombro em 670 nm, Figura 2.18A e B. Tal emissão residual de fluorescência é comprovada pelas Figuras 2.17B e D, que mostram o mesmo perfil dos espectros de emissão mostrados nas Figuras 2.18C e D. O ombro observado está relacionado com uma diferente espécie emissora provavelmente um autoagregado. Os espectros de RLS também mostram um sinal de espalhamento característico de agregados em 760 nm. Próximo da concentração onde se observou o desvio da linearidade, verifica-se um aumento no espalhamento com o aumento da concentração de fenotiazínico, principalmente para o AO, Figura 2.18E. Este resultado indica que o desvio da linearidade observado pode realmente estar relacionado com a formação de autoagregados. Para o AM o sinal de RLS é aproximadamente constante com a concentração, com exceção de uma concentração onde se observa um elevado sinal de RLS, Figura 2.18F. Assim para o AM os resultados de RLS não foram conclusivos.

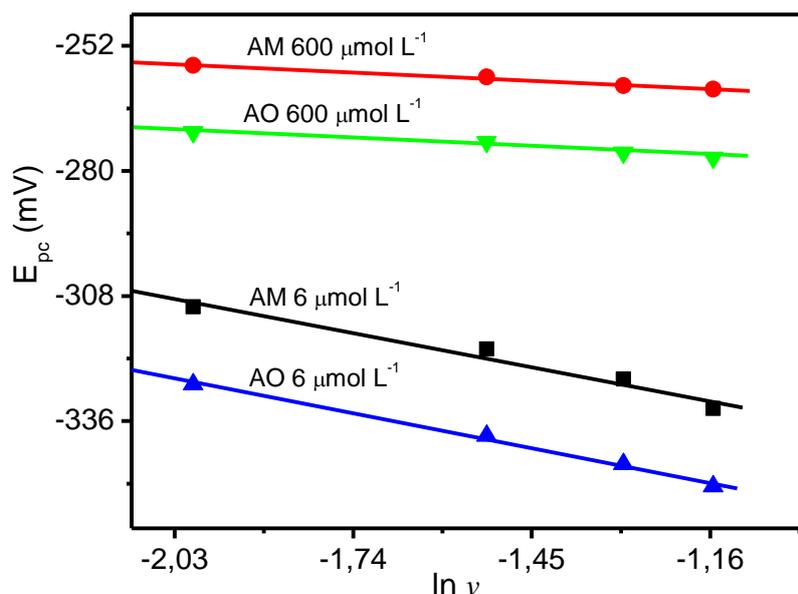


**Figura 2.18.** Espectros de RLS em função da concentração de fenotiazínicos em água,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$  (AO),  $\lambda_{\text{em}} = 640 \text{ nm}$  (AM),  $\lambda_{\text{RLS}} = 760 \text{ nm}$  (fenotiazínicos) e  $\Delta = 5 \text{ nm}$ . (A), (C) e (E) para o AO e (B), (D) e (F) para o AM.

As técnicas eletroquímicas foram empregadas, a fim de ajudar a elucidar o mecanismo de autoagregação via empilhamento molecular que ocorre com os fenotiazínicos com o aumento da concentração. Assim, parâmetros cinéticos e coeficiente de difusão foram estimados.

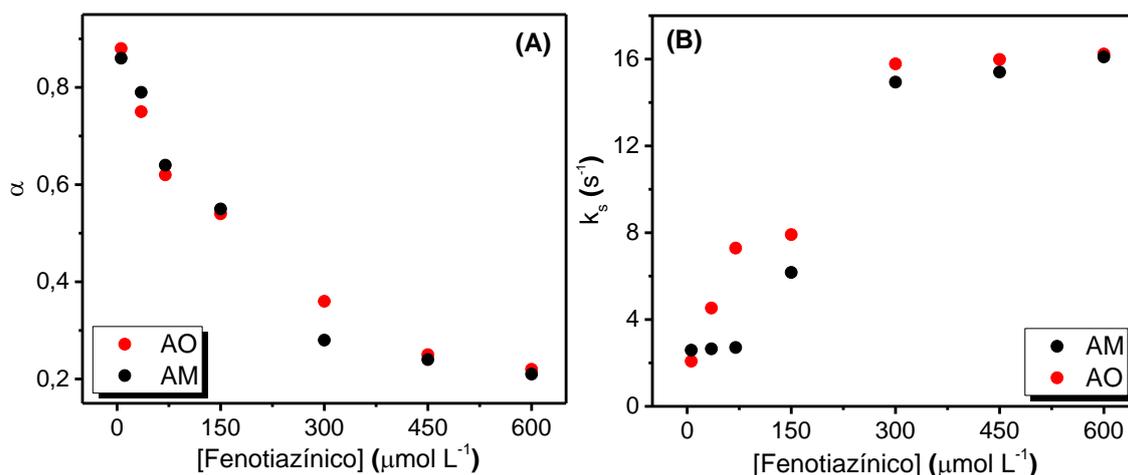
#### 2.4.5 Estimativas dos parâmetros cinéticos: coeficientes de transferência de elétrons ( $\alpha$ ) e constantes de velocidades de reação da superfície ( $k_s$ )

Com o intuito de compreender o efeito da autoagregação nos parâmetros cinéticos da reação redox na superfície do ET, estimaram-se os valores de  $\alpha$  e  $k_s$  empregando-se a Equação de Laviron (Equação 2.1) fazendo-se  $E_p$  versus  $\ln v$ , Figura 2.19, que é uma Equação derivada do modelo empírico de Tafel e teórico de Butler-Volmer (A. J. Bard 1980).



**Figura 2.19.** Plot de  $E_{pc}$  versus  $\ln v$  para o AO e AM em meio aquoso a 30,0 °C.

Para estimar os parâmetros cinéticos, trabalhou-se apenas na região de menor reversibilidade, ou seja, em altas velocidades de varredura (110 a 300  $\text{mV s}^{-1}$ ), pois é a região mais adequada para se aplicar a Equação de Laviron (Laviron 1979), como mostra a Figura 2.19. Os valores de  $\alpha$  e  $k_s$ , encontrados pelo plot  $E_{pc}$  versus  $\ln v$ , foram graficados em função da concentração e se encontram na Figura 2.20.



**Figura 2.20.** A) Plot de  $\alpha$  versus [fenotiazínico]. B) Plot de  $k_s$  versus [fenotiazínico].

Os valores de  $\alpha$ , que variam de 0 a 1, representam a medida de simetria da barreira de ativação entre reagentes e produtos, de acordo com o modelo de Butler-Volmer. Valores de  $\alpha < 0,5$ , a estrutura do complexo ativado tem maior semelhança à estrutura da espécie oxidada. Neste caso, a espécie reduzida tem menor energia livre. Quando  $\alpha > 0,5$ , a estrutura do complexo ativado tem maior semelhança à estrutura da espécie reduzida, enquanto a espécie oxidada apresenta menor energia livre, Figura 1.7 (A. J. Bard 1980, Brett 1996).

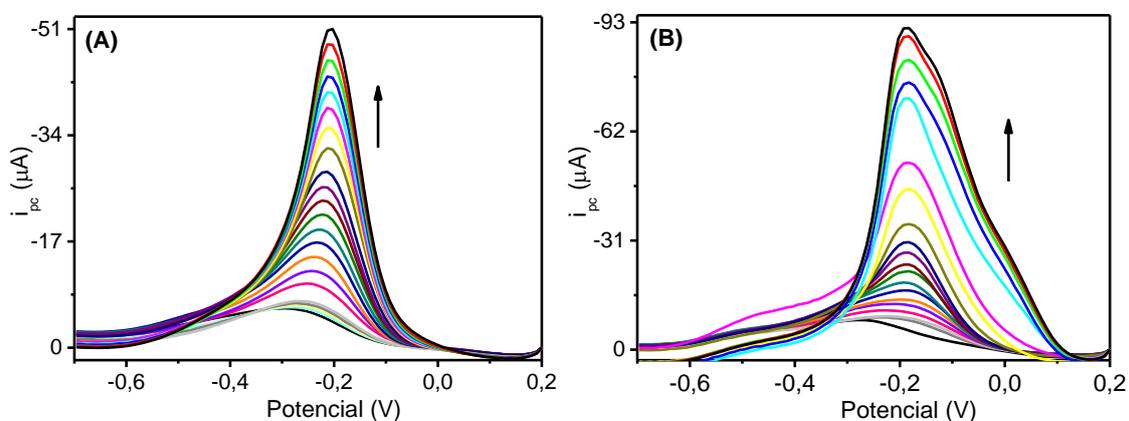
Os valores de  $k_s$  representam a constante de velocidade heterogêneo do processo redox que ocorre entre o AO e o ET. O termo heterogêneo é usado pelo fato da transferência eletrônica ocorrer de uma molécula em solução para o ET que é sólido (A. J. Bard 1980).

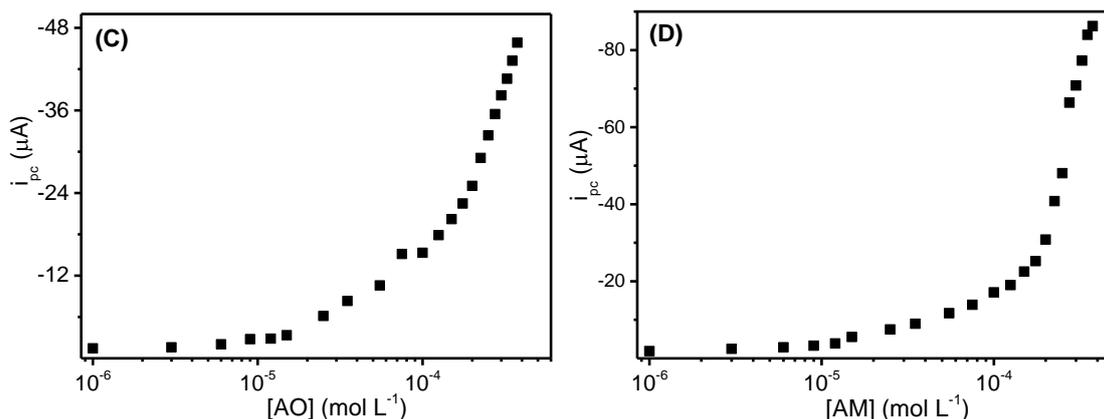
Na Figura 2.20A, observa-se que a estabilização da forma oxidada e reduzida, assim como a estrutura do complexo ativado no processo redox é dependente da concentração de fenotiazínico e conseqüentemente da formação de autoagregados no meio. Observa-se que a forma reduzida é menos estabilizada até aproximadamente 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , acima desta concentração a forma reduzida é mais estabilizada, ou seja, o aumento da concentração tende a desestabilizar a forma oxidada e estabilizar a forma reduzida. A explicação deste fenômeno pode estar relacionada com o aumento das forças de van de Waals e dipolo-dipolo que atuam a curta distância, estabilizando mais a forma reduzida (forma mais hidrofílica), como é o caso do empilhamento molecular que ocorre entre as moléculas de fenotiazínicos com o aumento da concentração.

A Figura 2.20B confirma que a velocidade de transferência de elétrons entre a espécie eletroativa e o ET é proporcional a concentração da espécie. Contudo, verificam-se dois regimes de variação de  $k_s$  em função da concentração, ou seja,  $k_s$  apresenta maior variação em baixas concentrações em relação a altas concentrações. Este resultado mostra que o empilhamento molecular (região de alta concentração), torna a dependência da velocidade de transferência de elétrons em função da concentração menos efetiva. Comparativamente, o AO apresenta maiores valores de  $k_s$  praticamente em todas as concentrações, indicando que a transferência de elétrons entre o AO e o ET é mais rápida, provavelmente devido a sua menor hidrofobicidade. Adicionalmente, a grandeza nos valores de  $k_s$  indicam que o equilíbrio redox dos fenotiazínicos na superfície do ET é rapidamente alcançado e que não há reações paralelas ou acopladas.

#### 2.4.6 Estimativas dos coeficientes de difusão

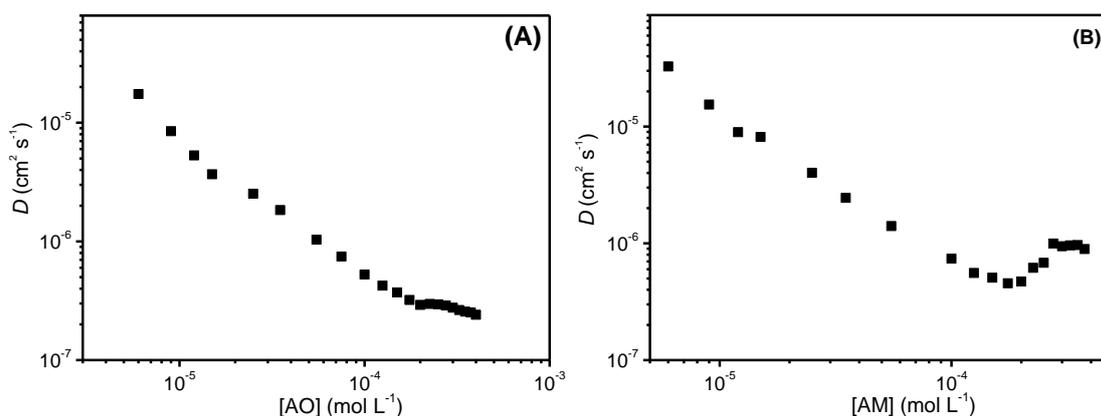
Antes de estimar o coeficiente de difusão, obtiveram-se os VPD em várias concentrações de fenotiazínicos, Figura 2.21A e B. Observa-se um aumento da corrente catódica ( $i_{pc}$ ) em função do aumento da concentração, Figura 2.21C e D. No entanto, este aumento não é linear na região de concentração estudada, sendo possível verificar, para os dois compostos, um ponto de inflexão. O comportamento não linear da corrente em função da concentração pode ser atribuído à variação na cinética de transferência de elétrons, como observado anteriormente. Entretanto, também pode ser atribuído à variação do coeficiente de difusão das espécies com o aumento da concentração.





**Figura 2.21.** VPD em meio aquoso,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0^\circ\text{C}$  para o AO (A) e AM (B) a diferentes concentrações aumentando de  $0,3 - 400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e plot de  $i_{pc}$  em função da concentração para a AO (C) e AM (D).

Uma vez que a autoagregação por empilhamento molecular afetam dois parâmetros diferentes que influenciam na corrente de pico, a análise de tal fenômeno através da corrente de pico torna-se difícil e ambígua. No entanto, uma vez que os experimento foram realizados de forma controlada, os coeficientes de difusão ( $D$ ) podem ser determinados utilizando  $i_{pc}$  da VPD. Neste método, tem-se a minimização de efeitos capacitivos tornando assim uma técnica mais confiável do que VC. Os valores dos coeficientes de difusão foram calculados usando a Equação característica da técnica de VPD, Equação 2.3 (Brett 1996). Assim, realizaram-se os gráficos de  $D$  em função das concentrações de fenotiazínicos, Figura 2.21.



**Figura 2.22.** Coeficiente de difusão ( $D$ ) dos fenotiazínicos em função da concentração em meio aquoso,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0^\circ\text{C}$ . A) AO e B) AM.

Verifica-se na Figura 2.22, uma redução no  $D$  com o aumento da concentração de fenotiazínicos. Esta redução é mais drástica em baixas concentrações e menos pronunciada em altas concentrações. Em baixas concentrações, aproximadamente  $10^{-6}$  e  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, os  $D$  estão ao redor de  $10^{-5}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> que é característico de espécies com pequeno volume molecular. Aumentando a concentração para acima de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, os  $D$  diminuem para  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, valores normalmente associados a espécies com grande volume molecular tais como polímeros sintéticos e proteínas em meio aquoso.

De acordo com a equação de Stokes-Einstein (Equação 1.31),  $D$  é proporcional à temperatura absoluta e inversamente proporcional ao coeficiente de atrito, que também pode ser chamado como o coeficiente de arrasto. Em temperatura constante, o  $D$  só muda em função da variação no coeficiente de atrito. Portanto, pode-se fazer uma relação direta na variação do  $D$  em função da concentração de fenotiazínico como dependente do tamanho/forma da espécie em solução, uma vez que as alterações nas forças de interação entre as espécies em função do processo de empilhamento podem ser negligenciadas.

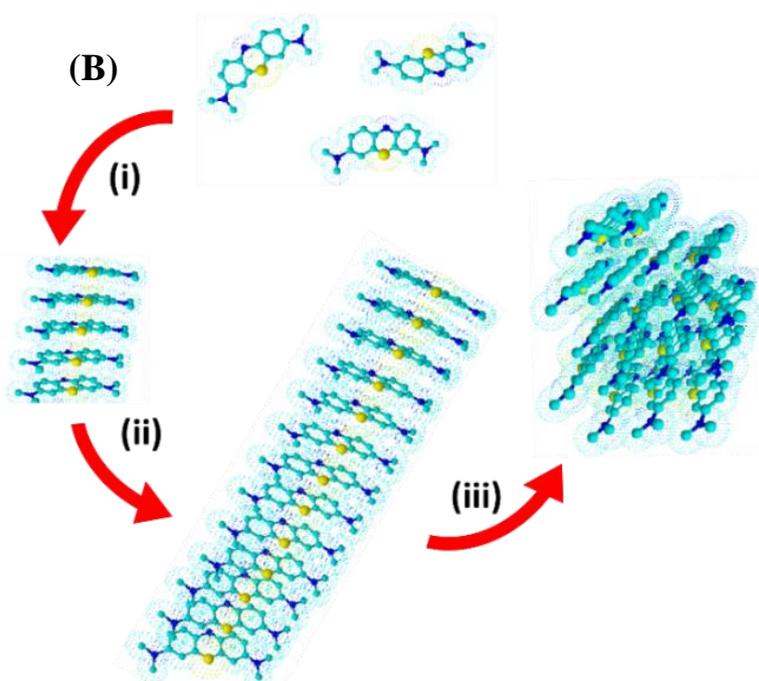
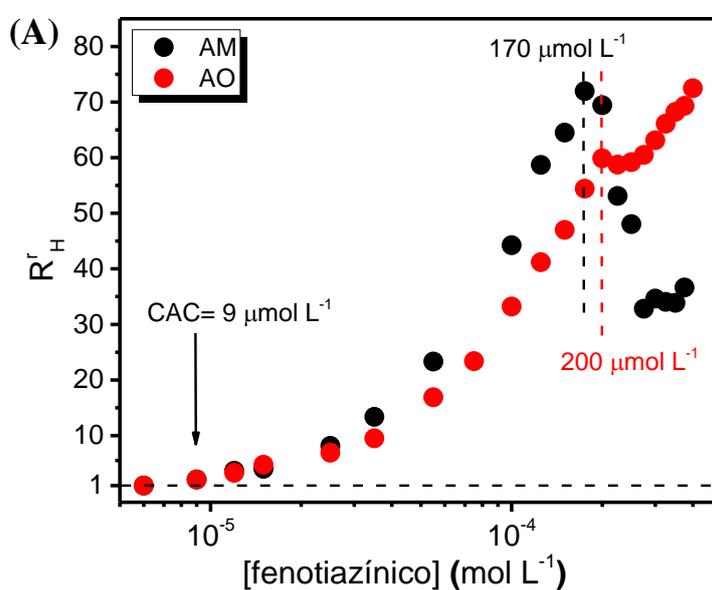
Assim, em baixas concentrações, o processo de empilhamento alterara significativamente o tamanho das espécies que se difundem no meio, observando-se uma acentuada variação no coeficiente de difusão nesta região. Por exemplo, a formação de dímeros a partir dos monômeros, dobra o tamanho da espécie em movimento, enquanto que a formação de trímeros a partir de um dímero tem-se um aumento de 50% do tamanho da espécie. Em maiores concentrações, o crescimento molecular via empilhamento dos fenotiazínicos, ocasionam em variações menos significativas na difusão e consequentemente no tamanho dos agregados. Então, nesta região de concentração, tal crescimento conduz a pequenas variações relativas no tamanho dos agregados.

De maneira geral, a redução do coeficiente de difusão sugere a formação de autoagregados de diferentes tamanhos se empilhando no meio aquoso. Para se obter uma melhor percepção dos efeitos de empilhamento molecular, com relação ao tamanho dos agregados, é factível analisar em termos de raio hidrodinâmico relativo ( $R_H^r$ ). Assim, os valores de  $R_H^r$  foram determinados pela Equação 2.6

$$R_H^r = \frac{R_H}{R_H^0} = \frac{D_0}{D} \quad \text{Equação 2.6}$$

sendo que  $D_o$  é o coeficiente de difusão da espécie na primeira concentração empregada ( $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), onde supostamente não há agregados como observados nos resultados óticos. Este termo atua como um parâmetro padrão interno.

Então, neste caso, o primeiro ponto medido esta abaixo da concentração agregacional crítica (Macchioni, Ciancaleoni *et al.*), tendo em vista as moléculas isoladas empregadas como referência para a variação do  $D$ . Desta forma, a utilização dos valores relativos de raio fornece uma melhor visão da variação do tamanho hidrodinâmico dos agregados em função da concentração das espécies, como pode ser observado na Figura 2.23A.



**Figura 2.23.** A) Valores de raio hidrodinâmico relativo ( $R_H^r$ ) em função da concentração de fenotiazínicos. B) Representação esquemática do processo de auto agregação com *i*) representando o processo de agregação inicial representada na CAC, em seguida, *ii*) crescimento unidimensional do agregado via empilhamento molecular e *iii*) um colapso do empilhamento unidimensional dos agregados através de uma transição de fase formando grupos de agregados mais compactos.

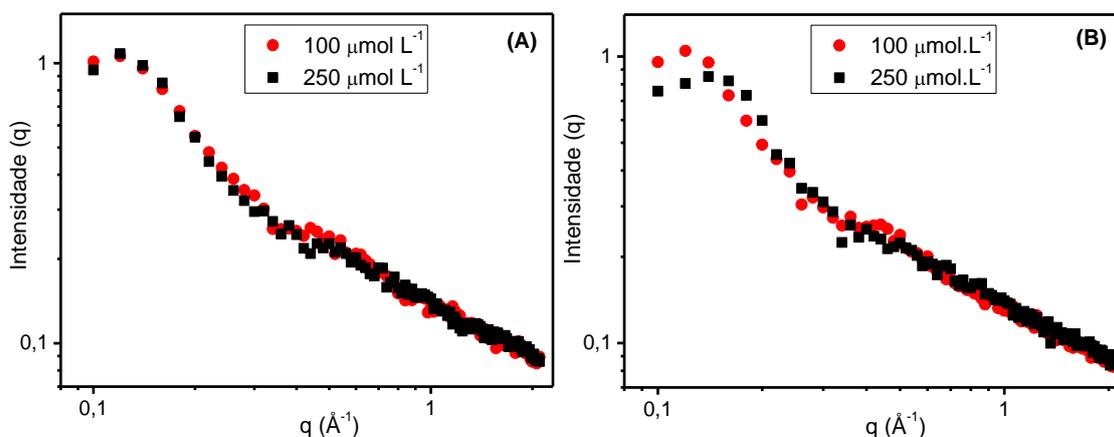
Verifica-se na Figura 2.23A que os valores de  $R_H^r$  começam a aumentar acima de  $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , para ambos os compostos, indicando o começo do processo de autoagregação, ou seja, uma CAC. Este valor está em concordância aos valores encontrados na literatura empregando-se técnicas óticas sendo  $10$  e  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o AO e AM, respectivamente. Desta forma, pode-se afirmar que medidas de  $R_H^r$  em função da concentração, empregando VPD, pode fornecer um método confiável para determinação de CAC de espécies eletroativas no meio.

O processo de empilhamento molecular leva a um crescimento do agregado, e conseqüentemente, em um aumento nos valores de  $R_H^r$  com o aumento da concentração para ambos os compostos até numa concentração onde se observa uma súbita diminuição de  $R_H^r$ , Figura 2.23A. No entanto, a concentração onde ocorre esta diminuição não é o mesmo. A mudança no padrão de variação do  $R_H^r$  em função da concentração de fenotiazínicos indica uma mudança no processo de crescimento do autoagregado e uma redução severa do volume hidrodinâmico dos mesmos. A mudança súbita nos valores de  $R_H^r$  com o aumento da concentração de fenotiazinas pode ser explicada pelas alterações na anisometria do agregado, ou seja, passando de uma estrutura com menor anisometria para uma estrutura com maior anisometria, Figura 2.23B. O processo de empilhamento a baixa concentração, leva a um crescimento unidimensional do agregado em solução, devido às interações direcionais dos orbitais  $\pi$  delocalizados. No entanto, os dados sugerem que esta estrutura empilhada unidimensionalmente é submetida a uma transição de fase para atingir uma forma mais condensada em solução. A transição de forma, com o aumento do tamanho do agregado, está representado na Figura 2.23B.

A curva do  $R_H^r$  indica que em baixa concentração, moléculas livres tendem a formar agregados de maior anisometria via empilhamento  $\pi$ - $\pi$ . Em seguida, ao aumentar a concentração, ocorre um crescimento unidimensional que segue a mesma tendência

anisométrica apenas num curto intervalo de concentração. Seria de esperar que a estabilidade das estruturas unidimensionais mudasse em função do seu tamanho. Assim, quando um valor máximo de tamanho é atingido, a estabilidade do sistema unidimensional já não é estruturalmente mais estável. Neste ponto, o agregado unidimensional é submetido a um processo de rearranjo (colapso) para formar agregados mais estáveis, tipo cluster, que têm menor anisometria. A transição de fase é observada em 170 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AM e AO, respectivamente. Os valores máximos de  $R_H^r$  alcançado pelos sistemas antes da mudança de comportamento é 60 para o AO e 72 para o AM. Este resultado sugere que o AM tende a formar agregados unidimensionais maiores, o que pode ser explicado pela maior hidrofobicidade do AM em relação ao AO.

Com a finalidade de comprovar o colapso da estrutura unidimensional, realizaram-se medidas de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS), numa concentração abaixo ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e outra acima ( $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) da região de colapso, Figura 2.24.



**Figura 2.24.** SAXS para os fenotiazínicos em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** AO e **B)** AM.

A Figura 2.24A e B mostram um discreto, mas consistente aumento na intensidade de espalhamento nas proximidades de  $0,35 \text{ \AA}^{-1}$  para a concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em ambos os compostos. Este resultado indica uma maior intensidade de espalhamento ocasionado pela estrutura unidimensional dos autoagregado, em relação ao cluster, cujo formato implica em menor intensidade de espalhamento. Assim, os resultados de SAXS concordam com a maior anisometria das estruturas previstas abaixo

de 170 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AM e AO, respectivamente, como apontado pelos dados de VPD.

## 2.5 CONCLUSÃO PARCIAL

A atividade eletroquímica bem definida dos fenotiazínicos AO e AM, composto por um único processo redox atribuída a um processo de transferência de dois elétrons, referente ao grupo tiazina, proporcionou a oportunidade de avaliar a dinâmica molecular de moléculas em solução aquosa. A VC é usada para caracterizar as propriedades eletroquímicas gerais do AO e AM. As diferenças moleculares entre AO e AM, resultam em diferenças na reversibilidade eletroquímica, sendo que o AO apresentou-se como sistema mais reversível.

A autoagregação dos fenotiazínicos afeta as propriedades eletroquímicas de modo geral, tais como reversibilidade, transferência de massa (relacionado ao  $D$ ) e transferência de carga (relacionado à  $k_s$ ). O empilhamento molecular tende a estabilizar a forma oxidada dos fenotiazínicos, que é a forma mais hidrofóbica.

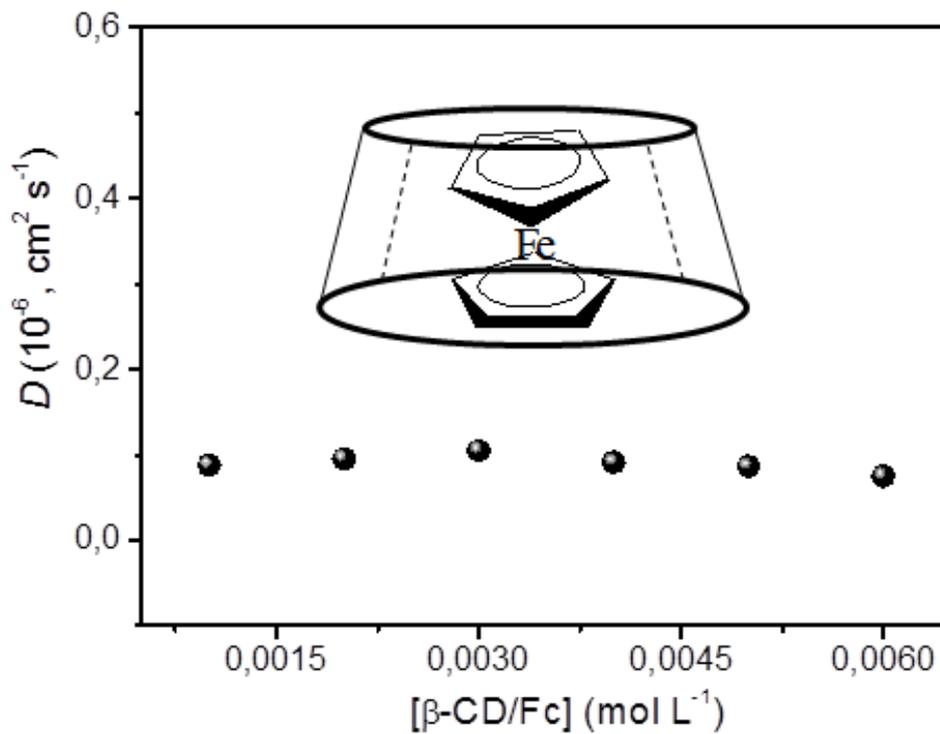
A técnica de VPD é relativamente sensível para investigar processo de autoagregação molecular até mesmo em soluções diluída de AO e AM. O coeficiente de difusão calculado pela técnica de VPD, diminuir significativamente de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Uma melhor compreensão do processo agregacional dos fenotiazínicos são obtidos na análise do  $R_H^r$  em função da concentração da espécie. A concentração agregacional crítica (CAC) é observada nas proximidades de 9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  tanto para AO quanto para AM. Portanto, em concentrações superiores a 9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  moléculas de AO ou AM tendem a formar agregados moleculares em solução aquosa. O tamanho dos agregados cresce com o aumento da concentração. O perfil de crescimento sugere que o processo de crescimento inicial segue um processo de crescimento unidimensional via empilhamento  $\pi$ - $\pi$ . Na região de a 170 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o AM e AO, respectivamente, ocorre um colapso da estrutura unidimensional, com baixa anisometria, para uma estrutura com alta anisometria, tipo cluster. Estruturas autoagregadas num empilhamento  $\pi$ - $\pi$  unidimensional abrange apenas uma curta faixa de concentração.

A utilização de VPD para investigar dinâmica molecular de espécies eletroativas em solução, mostrou-se capaz de ser uma técnica poderosa, mesmo em soluções

diluídas. As forças intermoleculares específicas podem ser exploradas para criar estruturas de automontagem em solução, mas, no caso dos fenotiazínicos estudados, as condições devem ser cuidadosamente avaliadas devido aos limites de estabilidade estruturais dos sistemas.

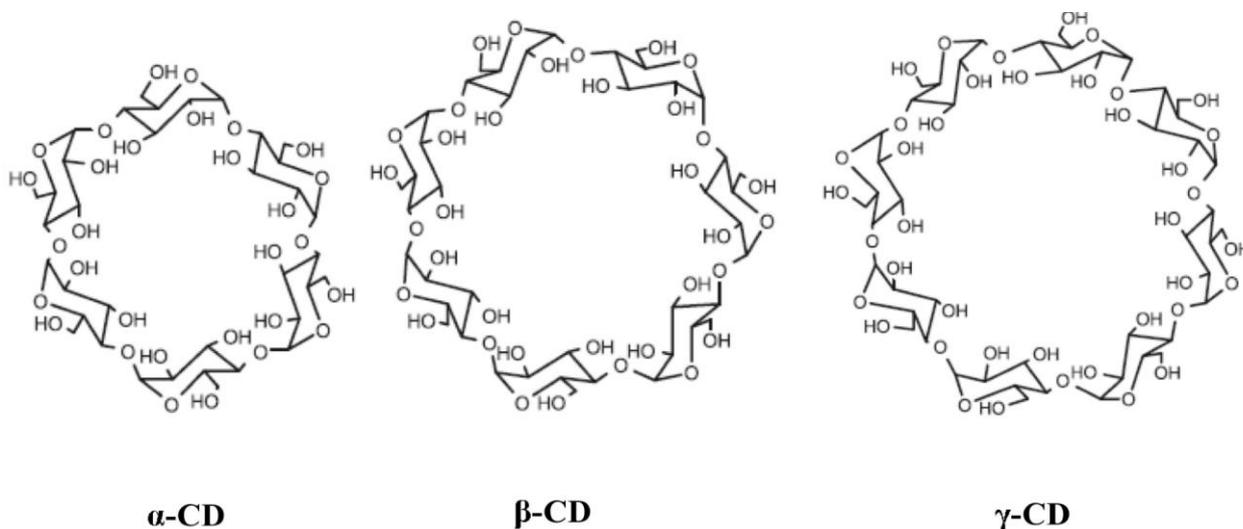
# CAPITULO 3

Avaliação do Coeficiente de Difusão de  
Compostos de Inclusão Formados entre  
Ciclodextrinas e Ferroceno



### 3.1 INTRODUÇÃO

Ciclodextrinas (CDs) é uma classe de moléculas hospedeiras naturais, obtidas a partir da degradação enzimática do amido (Singh, Bharti et al. 2010). São constituídos por unidades de D-glucopirranose, que unidas originam estruturas cíclicas em formato de cone. As CDs obtidas com maior rendimento, conhecidas como naturais, contem seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD), respectivamente, Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Estruturas químicas das CDs.

A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. Estas características tornam as CDs carreadores em potencial de fármacos. Sendo assim, a formação de complexos de inclusão com várias moléculas hospede orgânica ou inorgânica, é uma das características mais importantes das CDs. A formação do complexo de inclusão dependerá do tamanho da molécula hospede e do diâmetro da cavidade da CD empregada como hospedeira. O diâmetro da cavidade e a solubilidade de todas as CDs estão apresentados na Tabela 3.1 (Buschmann and Schollmeyer 2002, Singh, Bharti *et al.* 2010).

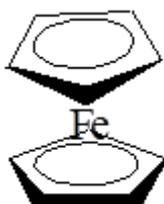
**Tabela 3.1.** Algumas propriedades e dimensões das três CDs mais comuns (Miranda, Martins et al. 2011).

<b>Tipo de CD</b>	<b>Diâmetro interno (<math>10^{-10}</math> m)</b>	<b>Diâmetro externo (<math>10^{-10}</math> m)</b>	<b>Solubilidade em água (g/100 mL)</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>
<b><math>\alpha</math>-CD</b>	4,7 – 5,3	13,7	14,5	972
<b><math>\beta</math>-CD</b>	6,0 – 6,5	15,3	1,85	1135
<b><math>\gamma</math>-CD</b>	7,5 – 8,3	16,9	23,2	1297

Observa-se na Tabela 3.1 que as ciclodextrinas possuem uma faixa de diâmetros determinados e fixos, de forma que complexos de inclusão 1:1 estáveis (Popescu and Grigoriu 2012) são formados com moléculas cujo diâmetro é menor que o diâmetro da cavidade.

Como as CDs não são eletroativas, para medir seu coeficiente de difusão, deve-se introduzir em sua cavidade hidrofóbica uma molécula eletroativa com potencial redox bem definido e tamanho apropriado como molécula sonda para investigar as propriedades eletroquímicas e estimar o coeficiente de difusão em meio aquoso. Uma molécula cujo potencial redox é bem definido e forma um complexo de inclusão 1:1 com a  $\beta$ -CD e a  $\gamma$ -CD, com excelente estabilidade em meio aquoso, é o ferroceno (Peng, Feng *et al.* 2014). Então, empregou-se o ferroceno para formar compostos de inclusão e estimar o coeficiente de difusão das CDs. A formação de compostos de inclusão do tipo 1:1 esta condicionado pela afinidade hospede/hospedeiro e tamanho da molécula hospede. Por exemplo, dependendo das condições experimentais, não há formação de complexo de inclusão do tipo 1:1 entre fenotiazínico e CDs (Raj and Ramaraj 1996, Zhang, Shuang *et al.* 2003),

O ferroceno (Fc) é um composto organometálico cuja fórmula é  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ . É um exemplo de metalloceno, uma classe de compostos organometálicos, e consiste de dois anéis ciclopentadienil presos a lados opostos de um átomo central de metal. Tais compostos são também conhecidos com compostos sanduíche, como mostra a Figura 3.2.

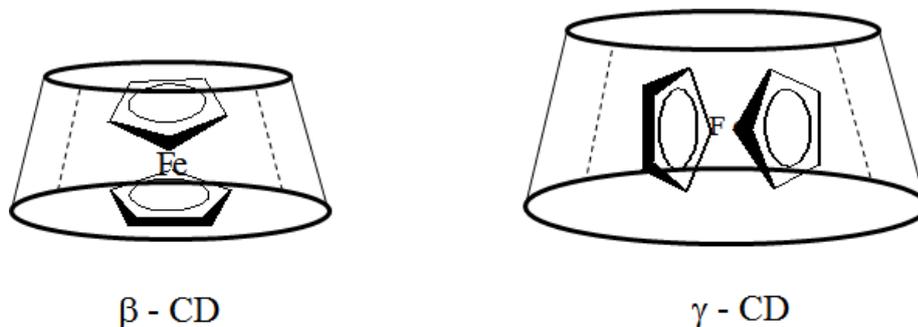


**Figura 3.2.** Estrutura molecular do ferroceno ( $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2]$ ) – composto sanduíche.

O átomo de ferro no ferroceno é normalmente apresentado com  $\text{Nox} +2$ , comprovado por espectroscopia Mössbauer. Em cada anel ciclopentadienil (Cp) é alocada uma única carga negativa, levando a seis o números de elétrons  $\pi$  em cada anel, e assim os tornando aromáticos. Estes doze elétrons (seis de cada anel) são então compartilhados com o metal por meio de ligação covalente háptica, que, quando combinada aos seis elétrons d no  $\text{Fe}^{2+}$ , resulta no complexo com configuração de 18 elétrons (Seiler and Dunitz 1982).

A falta de ligações individuais entre os átomos de carbono do anel Cp e o íon  $\text{Fe}^{2+}$  resulta em os anéis Cp girarem livremente ao redor do eixo  $\text{Cp}_{(\text{centróide})}\text{-Fe-Cp}_{(\text{centróide})}$ , como observado por ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica de tunelamento (Abel, Long *et al.* 1991).

O Fc exibe processo redox reversível e o número de elétrons transferidos no processo redox é bem definido (Barrado, Couto *et al.* 2014). Além disso, os dois anéis Cp tornam o complexo como um todo relativamente hidrofóbico, ou seja, insolúvel em meio aquoso. Desta forma, como cavidade das CDs é hidrofóbica, em meio aquoso, o Fc tende a migrar espontaneamente para o interior das CDs, interagindo e ligando-se fortemente com sua cavidade, formando complexos de inclusão relativamente estáveis (Figura 3.3) do tipo 1:1 com a  $\beta$ -CD e a  $\gamma$ -CD (Zhang, Chen *et al.* 2011, Peng, Feng *et al.* 2014).



**Figura 3.3.** Representação dos compostos de inclusão entre ferroceno e as ciclodextrinas.

Visando mostrar que o coeficiente de difusão, estimado por métodos eletroquímicos, depende do tamanho da espécie no meio e que o tamanho da espécie depende da concentração, no caso dos fenotiazínicos, devido ao processo de autoagregação, realizou-se estudos com as CDs. As CDs possuem elevada solubilidade em água (Tabela 3.2) e não sofrem processo de autoagregação em larga faixa de concentração. Sendo assim, não se observaria uma variação no coeficiente de difusão com o aumento da concentração das CDs. Este fato contribui para validar o método de monitoramento do empilhamento molecular pela análise do coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico via método eletroquímico, proposto no Capítulo 2.

Portanto, neste Capítulo realizou-se uma caracterização eletroquímica dos compostos de inclusão  $\beta$ -CD/Fc e  $\gamma$ -CD/Fc em meio aquoso e determinou-se o coeficiente de difusão. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da concentração sobre o coeficiente de difusão e comparou-se com os resultados encontrados para os fenotiazínicos, discutidos no Capítulo 2. Tal comparação propiciou evidências para reforçar a proposta de monitoramento de autoagregados via voltametria de pulso diferencial, discutida no Capítulo 2.

## **3.2 MATERIAIS E METODOLOGIA**

### **3.2.1 Materiais**

O cloreto de potássio (KCl) foi obtido da Merck com grau de pureza acima de 98%. As ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) e o ferroceno foram obtidos da Aldrich, com grau de pureza acima de 99%. A água empregada para o preparo de todas as soluções de trabalho foi água Milli-Q. O etanol empregado para o preparo dos compostos de inclusão e solução de ferroceno foi de grau PA.

### **3.2.2 Metodologia**

#### **3.2.2.1 Preparo das soluções e composto de inclusão**

A solução estoque de ferroceno foi preparada com a introdução de KCl fornecendo uma concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de ferroceno e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para o KCl. A solução estoque de ferroceno é a própria solução de trabalho e foi preparado dissolvendo-se o ferroceno numa mistura de água/etanol 40% (v/v). As soluções estoques foram guardadas ao abrigo da luz. O processo encapsulamento (formação do composto de inclusão) foi empregado o método da dispersão sólida (Zhang, Jackson et

al. 1996, van Nostrum 2004), sendo que a agitação na etapa de hidratação foi realizada a temperatura ambiente. Assim, as soluções dos compostos de inclusão apresentaram concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para as ciclodextrinas e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para o ferroceno.

### 3.2.2.2 Caracterização eletroquímica e estimativa do coeficiente de difusão

Foi empregada a voltametria cíclica (VC) como técnicas de caracterização eletroquímica. A célula eletroquímica constituiu de um eletrodo de trabalho (ET) de carbono vítreo, um eletrodo de referência de calomelano Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> saturado e um contra eletrodo de platina. Os voltamogramas foram obtidos empregando-se KCl na concentração de 0,1 mol/L como eletrólito suporte. Antes de realizar as medidas borbulhou-se N<sub>2</sub> por 15 minutos na solução para remover O<sub>2</sub> do meio aquoso. O eletrodo de trabalho foi limpo por polimento empregando-se alumina.

Através dos voltamogramas, foram extraídos os parâmetros de potencial catódico ( $E_{pc}$ ), potencial anódico ( $E_{pa}$ ), corrente de pico catódico ( $i_{pc}$ ), corrente de pico anódico ( $i_{pa}$ ) e potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ). Através dos voltamogramas foram analisadas as linearidades entre concentração e corrente do AO. A reversibilidade foi verificada variando a velocidade de varredura, avaliando o perfil do voltamograma e plotando um gráfico de corrente de pico ( $i_p$ ) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ), numa concentração constante dos ferroceno e CD.

A reversibilidade foi avaliada empregando a Equação de Randles-Sevcik, Equação 2.2, (A. J. Bard 1980) fazendo  $i_p$  versus  $v^{1/2}$ .

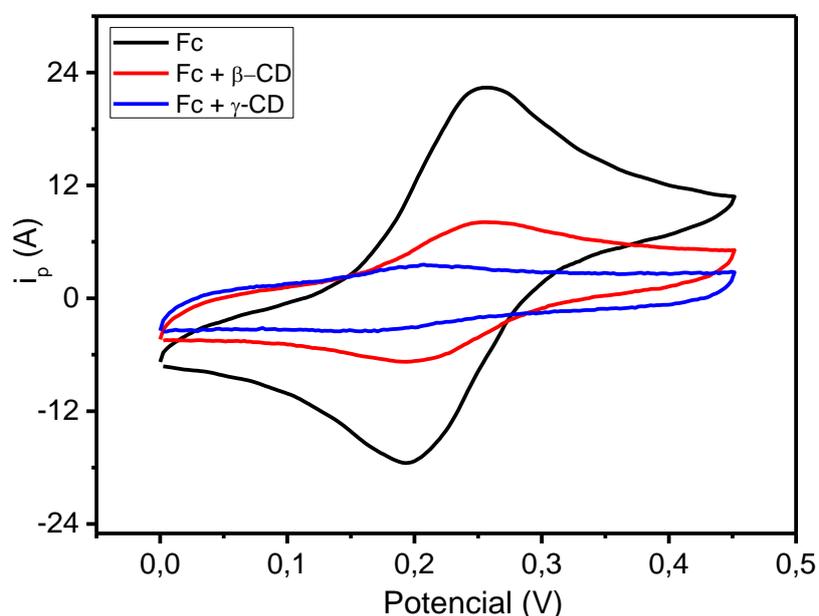
Empregando a técnica de VPD, foi empregada para estimar o coeficiente de difusão aparente ( $D_{ap}$ ). Para isso, variou-se o tempo de modulação ( $t_m$ ) para a obtenção dos voltamogramas, onde plotou-se um gráfico de  $i_p$  versus  $(t_m)^{-1/2}$ , onde através da reta pode-se extrair o coeficiente angular e empregando a Equação 2.3 para VPD (A. J. Bard 1980, Brett 1996), estimou-se os valores de  $D_{ap}$ .

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Caracterização eletroquímica e reversibilidade

Os sistemas foram caracterizados empregando-se a VC, Figura 3.4. Verifica-se uma drástica mudança na corrente de pico do Fc sozinho em comparação aos sistemas

contendo Fc e CDs. Esta redução na corrente indica a formação de compostos de inclusão 1:1 de  $\beta$ -CD/Fc e  $\gamma$ -CD/Fc. Avaliando de maneira detalhada a redução das correntes de pico, sabe-se que tem origem em dois fatores: *i*) diminuição da transferência de massa, relacionado à difusão da espécie no meio e *ii*) diminuição da transferência de carga, relacionado a velocidade de transferência de elétrons entre o ET e a molécula eletroativa (A. J. Bard 1980). Com relação ao fator *i*, o encapsulamento do Fc diminui a velocidade com que a sonda eletroquímica se difundiu do seio da solução para a região eletroativa do ET, devido ao maior volume e raio hidrodinâmico do composto de inclusão. Desta forma, tem-se uma redução da concentração de Fc na superfície do ET, o que reduz as correntes de pico do mesmo. De fato, pode-se observar que entre os compostos de inclusão, o sistema  $\gamma$ -CD/Fc se difunde mais lentamente devido ao seu maior volume, fornecendo menores correntes de pico em relação ao sistema  $\beta$ -CD. Quantificaremos este resultado mais adiante. Com relação ao fator *ii*, como não se observa mudança considerável no potencial de pico ( $E_p$ ) provavelmente não a influência na velocidade de transferência de elétrons ( $k_s$ ) quando Fc é encapsulado nas CDs. Desta forma, o fator *ii* não contribui para a redução das correntes de pico.



**Figura 3.4.** VC do Fc ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na mistura água/etanol (40%) e em meio aquoso encapsulado na  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ),  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

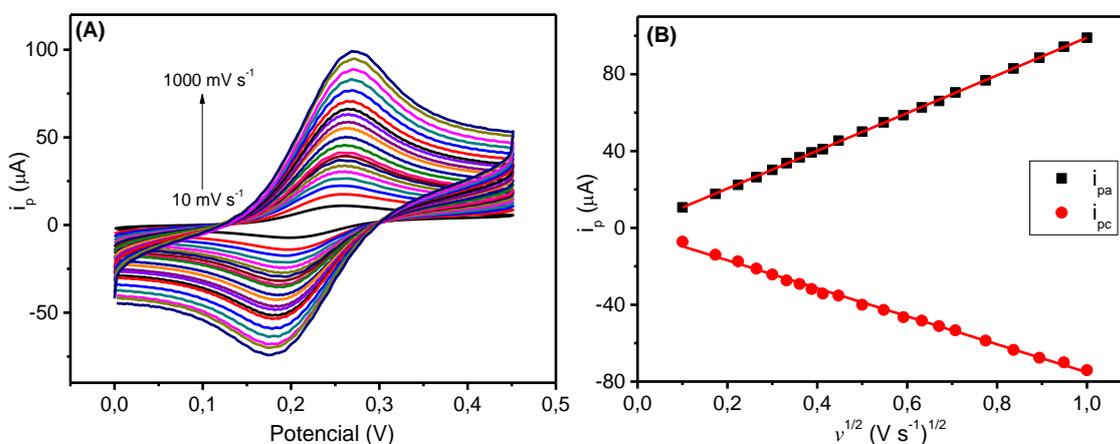
Os parâmetros eletroquímicos foram extraídos dos voltamogramas apresentados na Figura 3.4 e se encontram na Tabela 3.2.

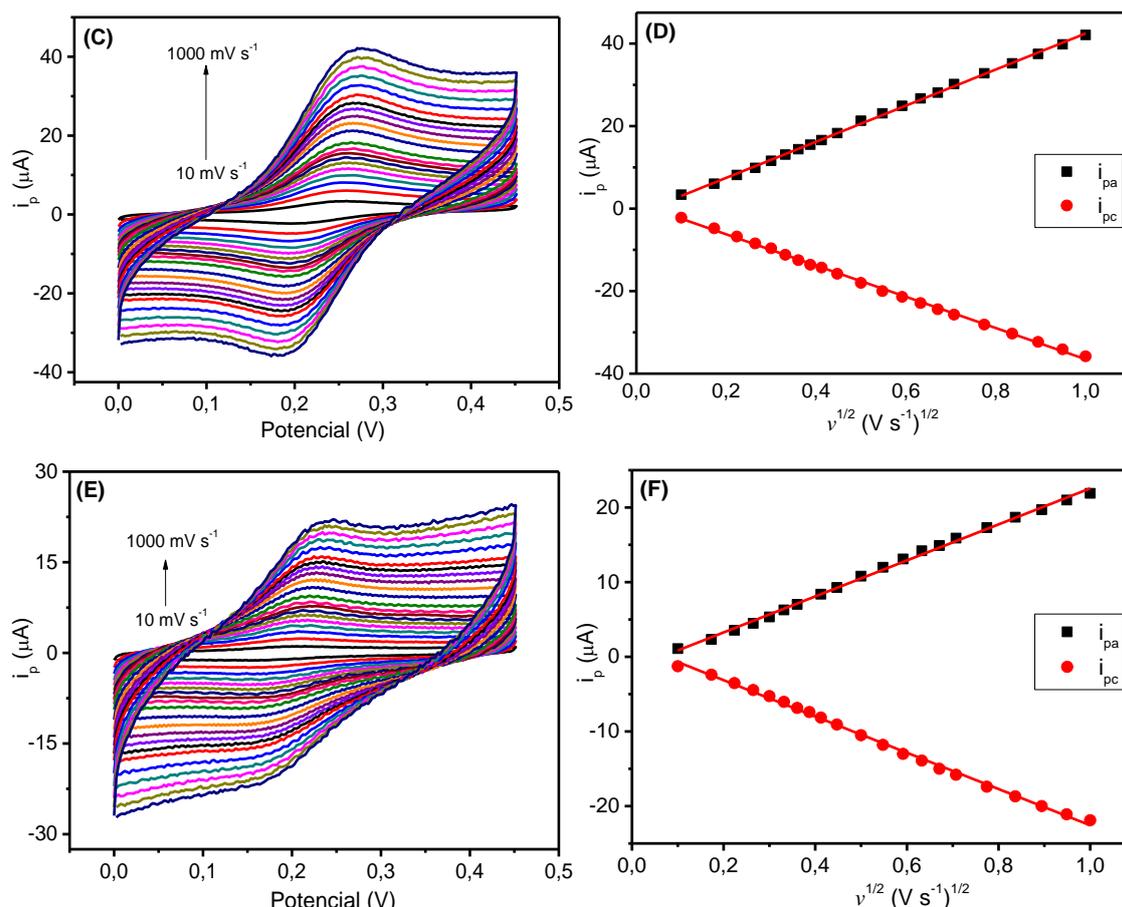
**Tabela 3.2.** Parâmetros eletroquímicos ( $E_p$ ,  $E_{1/2}$ ,  $n\Delta E_p$  e  $i_{pa}/i_{pc}$ ) do Fc (1,0 mmol L<sup>-1</sup>) na mistura água/etanol (40%) e em meio aquoso encapsulado na  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>),  $\nu = 50$  mV s<sup>-1</sup> e T = 30,0 °C.

Sistemas	$E_{pa}$ (mV)	$E_{pc}$ (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	$n\Delta E_p$ (mV)	$ i_{pa}/i_{pc} $
Fc	250	200	225	50	1,32
$\beta$ -CD/Fc	250	200	225	50	1,20
$\gamma$ -CD/Fc	220	170	195	50	1,04

Na Tabela 3.2 verifica-se que nos três sistemas, tem-se uma reversibilidade redox e de carga relativamente boa, pois os valores de  $n\Delta E_p \sim 59$  mV e  $|i_{pa}/i_{pc}| \sim 1,0$ , respectivamente (Brett 1996). Em relação ao  $E_{1/2}$ , observa-se um deslocamento para região de maior facilidade de ocorrer o processo redox apenas para o sistema  $\gamma$ -CD/Fc. A variação de  $E_{1/2}$  sugere mudança de ambiente químico. Desta forma, o resultado mostra que uma mudança no ambiente químico ocorreu apenas para o sistema  $\gamma$ -CD/Fc. Este resultado é particularmente interessante, pois sugere que a cavidade das CDs, mesmo sendo hidrofóbicas, pode estar hidratada. Assim vemos que, a cavidade da  $\gamma$ -CD é menos hidratada, em relação à  $\beta$ -CD que se apresentou o mesmo ambiente químico, em termos de  $E_{1/2}$ , que o Fc sozinho em meio aquoso.

Aplicando-se a Equação de Randles-Sevcik, Equação 2.2 (A. J. Bard 1980), pode-se observar excelente linearidade para os todos os sistemas na ampla faixa de velocidade de varredura estudado, Figura 3.5.





**Figura 3.5.** Voltamogramas cíclicos dos sistemas em KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), variando a velocidade de varredura ( $10 - 1000 \text{ mV s}^{-1}$ ). **A)** e **B)** Fc ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), em meio de água com 40% de etanol. **C)** e **D)** Fc ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\beta$ -CD ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em meio aquoso. **E)** e **F)** Fc ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\gamma$ -CD ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em meio aquoso.

Este resultado mostra que o processo redox do Fc é reversível e controlado por difusão em todas as velocidades de varredura para o Fc livre e encapsulado. Além disso, como nos sistemas da Figura 3.5 não há formação de autoagregados, verifica-se que a reversibilidade do processo redox, pode ser um parâmetro útil na avaliação de processos de autoagregação de moléculas no meio aquoso, como discutido no Capítulo 2.

### 3.3.2 Estimativa do coeficiente de difusão

O coeficiente de difusão foi estimado empregando-se a técnica de VC por meio dos gráficos da Figura 3.5. Os Valores estão apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Valores de coeficientes de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) do ferroceno na mistura água/etanol (40%) e em meio aquoso, encapsulado na  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, KCl, 0,1 mol L<sup>-1</sup>, T = 30,0 °C.

Sistemas	( $D_{ap}$ , 10 <sup>-6</sup> , cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
*Fc	0,17
$\beta$ -CD/Fc	0,075
$\gamma$ -CD/Fc	0,013

\*Meio hidroalcoólico

Como era de se esperar pelos voltamogramas já apresentados, verifica-se uma redução no coeficiente de difusão do Fc no composto de inclusão, de aproximadamente 2 vezes para  $\beta$ -CD/Fc e 10 vezes para  $\gamma$ -CD/Fc. Este resultado confirma a formação dos compostos de inclusão. A redução do coeficiente de difusão esta em harmonia com o previsto pela Equação de Stokes-Einstein, que mostra uma relação inversamente proporcional entre o raio hidrodinâmico e o coeficiente de difusão da espécie no meio. Assim, o aumento do raio hidrodinâmico da espécie tende a diminuir o coeficiente de difusão da mesma, como observado na Tabela 3.3.

Em medidas eletroquímicas, a literatura relata que o coeficiente de difusão de compostos eletroativos encapsulados em macromoléculas transportadoras, geralmente é dado pela soma de duas parcelas, Equação 3.2. Sendo uma, referente ao coeficiente de difusão das espécies não encapsuladas, e outra, referente ao coeficiente de difusão da espécie encapsulada (Mackay 1994, Rusling 1997, Charlton and Doherty 2000, Ferreira, El Seoud *et al.* 2004, Haque, Rahman *et al.* 2011, Mahmud, Samed *et al.* 2011). Sendo assim, o coeficiente de difusão observado é denominado de coeficiente de difusão aparente ( $D_{ap}$ ).

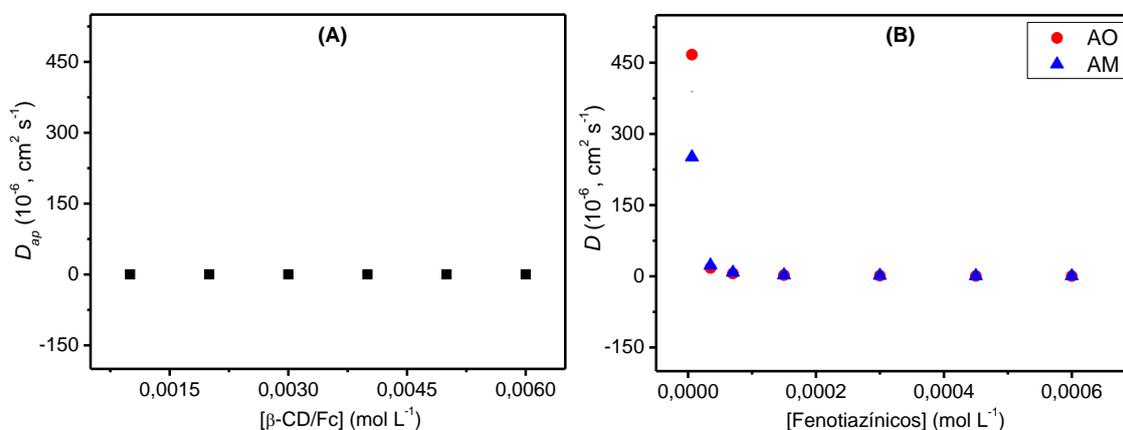
$$D_{ap} = aD_{Fc} + bD_{CD} \quad \text{Equação 3.2}$$

onde  $D_{Fc}$  e  $D_{CD}$  são os coeficientes de difusão do ferroceno livre e ferroceno inserido na CD, respectivamente. Os termos  $a$  e  $b$  representam a fração de espécies de ferroceno nestas diferentes formas, cuja soma é igual a 1. Contudo, como a estabilidade energética do Fc é maior na forma de composto de inclusão, então, é considerado que todo o Fc no meio esta encapsulado sendo que o termo  $a \sim 0$ . Assim, o coeficiente de difusão do

ferroceno passa a ser predominantemente determinado pelo coeficiente de difusão do composto de inclusão ( $D_{CD}$ ).

### 3.3.3 Efeito da concentração sobre o coeficiente de difusão aparente

Com a finalidade de validar os resultados apresentados no Capítulo 2, onde se monitorou o empilhamento molecular através de variações no coeficiente de difusão com o aumento da concentração empregando-se técnica eletroquímica, compararam-se dois sistemas. Um sistema onde há formação de auto agregados com o aumento da concentração, como foi o caso dos fenotiazínicos estudados no Capítulo 2, e outro onde o aumento da concentração não promove a formação de auto agregados, como é o caso dos compostos de inclusão CD/Fc, estudado neste Capítulo, devido a elevada solubilidade das CDs em meio aquoso, Tabela 3.1. Assim, o coeficiente de difusão aparente foi determinado empregando a Equação 2.3, fazendo  $i_{pc}$  versus  $t_m^{-1/2}$ , para várias concentrações. Os valores de coeficiente de difusão aparente foram graficados em função da concentração, Figura 3.6A.



**Figura 3.6.** Coeficiente de difusão estimado por VPD em função da concentração. **A)** Para o complexo de inclusão β-CD/Fc. **B)** Para os fenotiazínicos.

Na Figura 3.6A, não se verifica uma variação significativa do coeficiente de difusão do composto de inclusão β-CD/Fc com o aumento da concentração. Por outro lado, verifica-se na Figura 3.6B uma drástica redução do coeficiente de difusão com o aumento da concentração dos fenotiazínicos até uma região onde a concentração não influencia significativamente. Este comportamento é típico do processo de empilhamento molecular visualizado no Capítulo 2. Este resultado indica que a

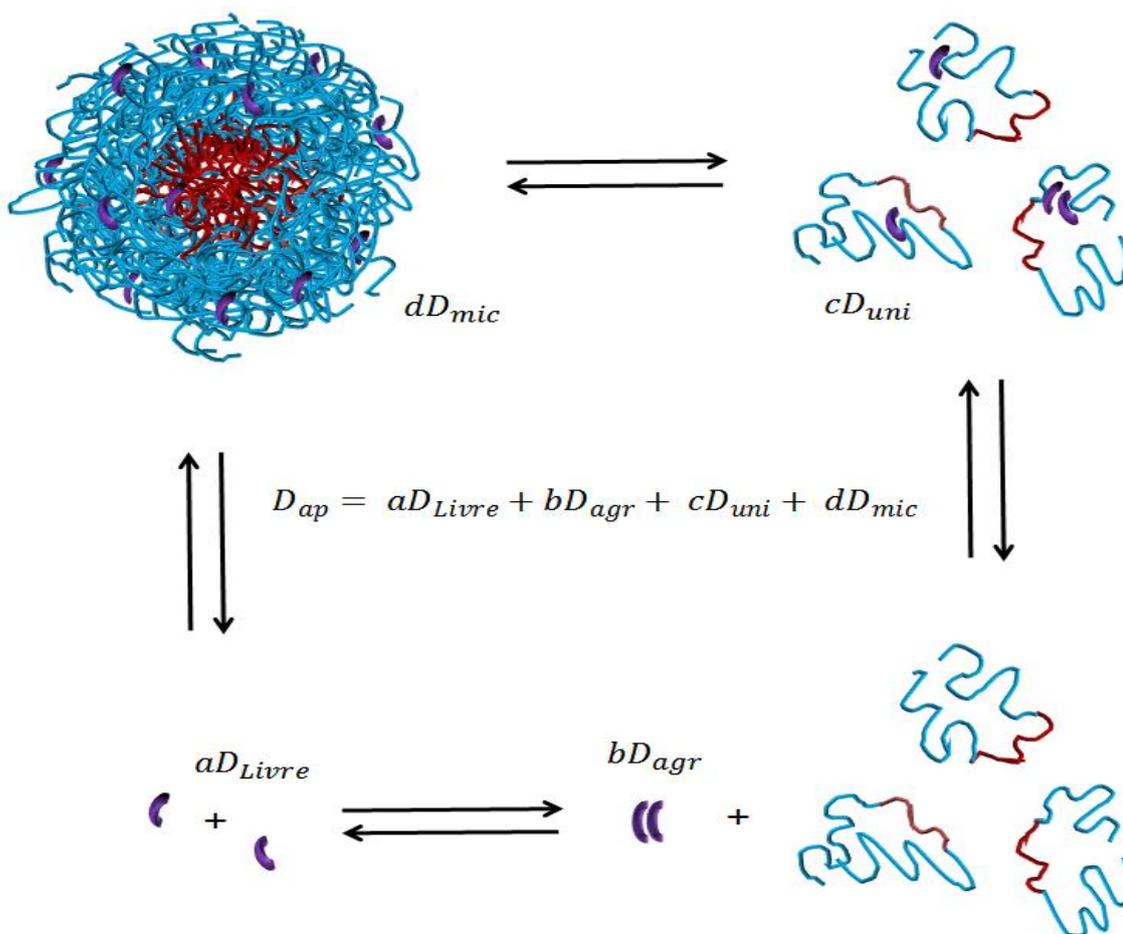
formação de autoagregados de fenotiazínicos, formando estruturas com maior raio hidrodinâmico e conseqüentemente menores coeficiente de difusão é nitidamente possível. Desta forma, confirma-se que a mudança do coeficiente de difusão de uma espécie eletroativa, com o aumento da concentração, esta relacionada com o fenômeno de empilhamento molecular via processo de autoagregação.

### **3.4 CONCLUSÃO PARCIAL**

Verificou-se a formação dos compostos de inclusão  $\beta$ -CD/Fc e  $\gamma$ -CD/Fc. A cavidade da  $\gamma$ -CD aparentemente é menos hidratada. O processo redox do ferroceno e compostos de inclusão são reversíveis e controlados por difusão numa ampla faixa de velocidade de varredura nas condições experimentais estudadas. A reversibilidade do processo redox pode ser um parâmetro útil na avaliação de processos de autoagregação de moléculas no meio aquoso. Os compostos de inclusão estudados, por apresentarem maior raio hidrodinâmico, têm menores coeficientes de difusão em relação ao Fc sozinho. O coeficiente de difusão do Fc encapsulado é dado pelo coeficiente de difusão do composto de inclusão. O aumento da concentração das CDs não altera significativamente o coeficiente de difusão dos compostos de inclusão. O empilhamento molecular via autoagregação molecular é um processo que pode ser monitorado empregando-se a técnica de VPD, avaliando a variação do coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico em função da concentração.

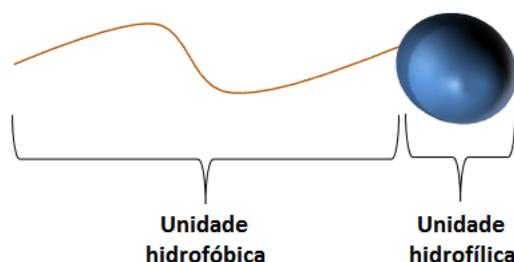
# CAPÍTULO 4

Estudo da Interação Entre Azul de  
Ortotoiluidina e Copolímeros do Tipo P-123 e  
F-127: Uma Abordagem Eletroquímica



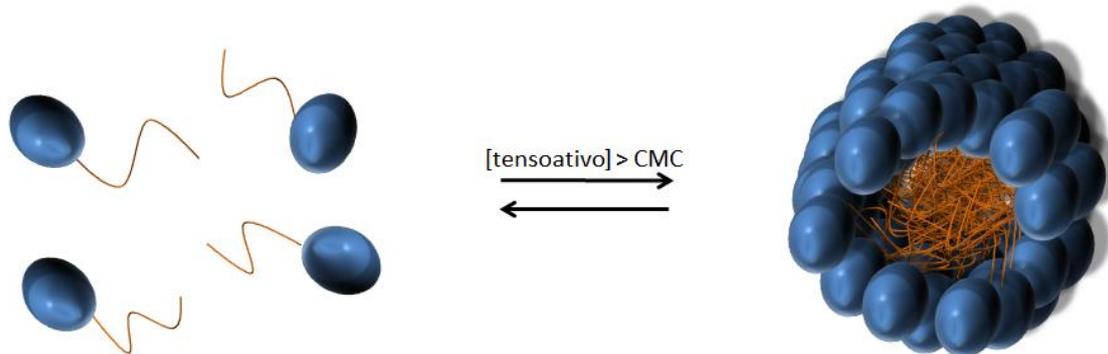
## 4.1 INTRODUÇÃO

Agentes tensoativos são moléculas anfifílicas, ou seja, possui característica de interagir com meio hidrofílico e hidrofóbico. Sendo assim, tal molécula é constituída de pelo menos uma região hidrofílica que interagem bem com meio aquoso e pelo menos uma região hidrofóbica que interage bem em meio orgânico, Figura 4.1. Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: *i*) iônico (possuindo uma parte carregada positivamente ou negativamente); *ii*) não iônica (possuindo uma parte polar (capaz de fazer ligações de hidrogênio com a água) e *iii*) zwitteriônica (possuindo uma parte caracterizada por dipolo).



**Figura 4.1.** Representação de um agente tensoativo.

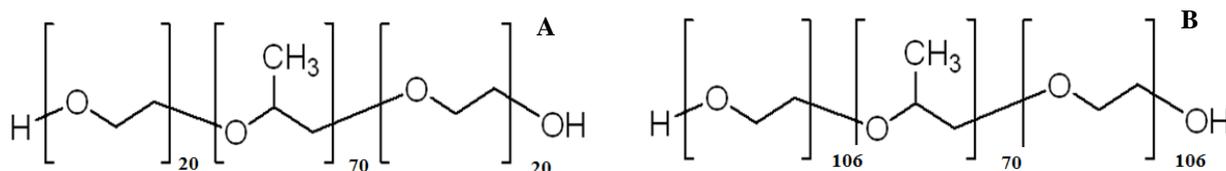
Em solução aquosa os agentes tensoativos podem exibir diversos tipos de comportamento dependendo da concentração. Em soluções com baixa concentração, ou seja, abaixo da concentração micelar crítica (CMC) as moléculas de tensoativos tendem a ficarem na interface água/ar com a parte hidrofóbica em direção ao ar. Contudo, quando tem-se uma solução com concentração acima da CMC as moléculas de tensoativos tendem a formar aglomerados de moléculas de tensoativos denominados de micelas, de forma que a parte hidrofóbica situa-se no interior da micela minimizando o contato com água e a parte hidrofílica em contato com a água (Tanford 1980, Chevalier and Zemb 1990). Entretanto, mesmo depois da formação da micela, estudos cinéticos mostraram que existe um equilíbrio dinâmico (Figura 4.2) entre monômeros e micelas, ou seja, moléculas de tensoativos podem ser transferidas para a micela e para o meio aquoso (Blankschtein, Thurston *et al.* 1986).



**Figura 4.2.** Representação da formação de micelas. Equilíbrio dinâmico.

A formação da micela é o resultado do balanço principalmente das forças de van der Waals, eletrostáticas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio (Tanford 1980, Israelachvili 2011). A principal força atrativa é o efeito hidrofóbico associado a parte hidrofóbica. As forças repulsivas é o resultado de interações estéricas (existente entre as parte polar hidratada dos tensoativos não iônicos) e eletrostáticas (para tensoativos com cargas iguais) associadas às unidades hidrofílicas. Desta forma, o processo de micelização é o balanço entre as forças atrativas e repulsivas (Kamei, Wang *et al.* 2002). O efeito hidrofóbico é governado pelo aumento da entropia quando os tensoativos são transferidos do meio aquoso para a micela. Apesar de se ter uma diminuição da entropia das moléculas de tensoativos com a formação da micela, ocorre um aumento significativo na entropia das moléculas de água, organizadas ao redor dos tensoativos. O efeito do aumento da entropia das moléculas de água prevalece, pois estas se encontram em maior quantidade (Tanford 1980). No que diz respeito aos tensoativos não iônicos, um tipo muito intrigante dentro desta classe são os tensoativos copolímeros do tipo dibloco (AB) ou tribloco (ABA).

Copolímeros triblocos são macromoléculas classificadas como agentes tensoativos não iônicos constituídas por unidades repetidas de poli(oxi-etileno) – PEO e poli(oxi-propileno) – PPO, sendo a unidade PEO hidrofílica e a PPO hidrofóbica. Os copolímeros foram introduzidos no mercado pela “Wyandotte Chemicals Corporation” em 1950 e comercialmente são conhecidos como Polaxameros produzido pela ICI ou Pluronic® produzido pela BASF (Croy and Kwon 2004). Na Figura 4.3, têm-se a representação de dois tipos de copolímeros triblocos P-123 e F-127.



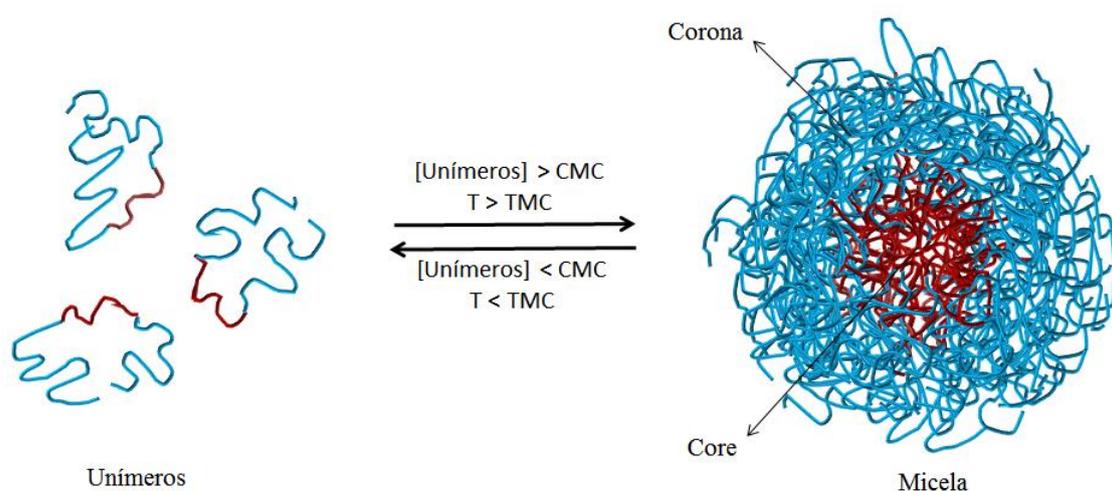
**Figura 4.3.** Estrutura dos surfactantes Pluronic<sup>®</sup>: **A)** P-123 e **B)** F-127.

Com relação à nomenclatura, a letra F e P, flocos e pasta, respectivamente, indicam o estado físico à temperatura ambiente. Os copolímeros são classificados através de um sistema numérico de três dígitos, na qual, considerando um número (monômero de um poloxâmero), os dois primeiros multiplicados por 100 dá o valor aproximado da massa molecular do centro hidrofóbico, enquanto o último dígito significa a fração em peso de grupos hidrofílicos PEO em um número desta micela (Alexandridis and Alan Hatton 1995). Neste sentido, para o P-123 tem-se uma massa molecular de aproximadamente 1200 para sua unidade hidrofóbica enquanto que há a presença de 30% de unidades hidrofílicas em um número deste copolímero. Para o F-127, por sua vez, tem-se o mesmo valor de massa molecular de unidades hidrofóbicas porém há a presença de 70% de unidades hidrofílicas em sua estrutura, ou seja, o surfactante polimérico tribloco F-127 possui uma natureza mais hidrofílica em relação o P-123 (Alexandridis and Alan Hatton 1995).

A variação da proporção de PEO e PPO no processo de síntese conduz a formação de uma gama de copolímeros com propriedades ótimas e aplicações em diversas áreas no setor industrial, tais como detergência, dispersão, formação de espuma, emulsificação, lubrificação, formulação de cosméticos (Schmolka 1977) e tintas (Winnik, Breton *et al.* 1992, Winnik, Davidson *et al.* 1992). Além disso, aplicações mais específicas na área da medicina tem sido um grande objeto de estudo para vários grupos de pesquisa. Por exemplo, onde os copolímeros são empregados na formulação de medicamentos com o intuito de solubilizar um fármaco insolúvel em meio aquoso, visando uma aplicação intravenosa com liberação controlada (Lin and Kawashima 1985, Guzmán, García *et al.* 1992, Kabanov, Batrakova *et al.* 1992). Estes copolímeros possuem baixa toxicidade em comparação aos agentes tensoativos presentes nos sistemas micelares tradicionais. Adicionalmente, possuem características únicas como a considerável biocompatibilidade bem como uma melhor entrega do fármaco em sítios específicos (van Nostrum 2004, Miyata, Christie *et al.* 2011), além de se mostrarem eficientes como entidades biotransportadoras de moléculas hidrofóbicas

(Hioka, Chowdhary *et al.* 2002, Sezgin, Yüksel *et al.* 2006, Chiappetta and Sosnik 2007, Kedar, Phutane *et al.* 2010). A solubilização/transporte de fármacos hidrofílicos também tem sido objeto de estudo, inicialmente proposto em 1984 por Bader e colaboradores e desde então vem sendo amplamente utilizado (Jones and Leroux 1999).

Como os copolímeros triblocos PEO-PPO-PEO apresentam uma região hidrofílica (PEO) e hidrofóbica (PPO), os unímeros em meio aquoso, acima da concentração micelar crítica (CMC), podem se autoagregar espontaneamente para formar micelas poliméricas aproximadamente esféricas, com o interior hidrofóbico (*core*) e exterior hidrofílico (*corona*) (Kabanov, Batrakova *et al.* 2002). Em comparação aos surfactantes tradicionais, os copolímeros possuem CMC relativamente baixa (em torno de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), os tornando mais resistentes aos efeitos de diluição do formulado no plasma quando, por exemplo, *in vivo*. Contudo, estes copolímeros são termosensíveis, o que implica que a formação da micela também é dependente da temperatura e a sua formação ocorre somente acima da temperatura micelar crítica (TMC), que é a temperatura mínima para se ter a formação de micelas. A formação da micela pode ser representada de acordo com o modelo de ação de massas, ou seja, os unímeros e micela em um equilíbrio de formação/dissociação (Horenc 1983), onde a formação da micela ocorre apenas acima da CMC e TMC. Na Figura 4.4 é mostrado a representação de uma micela de copolímero tribloco em equilíbrio dinâmico com unímeros.



**Figura 4.4.** Representação da formação de micelas de copolímero tribloco. Equilíbrio dinâmico.

Devido às diversas características peculiares das micelas poliméricas e suas aplicações diversas, em especial, como biotransportadores de fármacos, é de extrema importância a compreensão dos fenômenos de ligação e interações com moléculas incorporadas. A nanoestrutura formada entre micelas poliméricas e moléculas incorporadas, tem sido tradicionalmente investigada via métodos óticos. No entanto, muitos fármacos não apresentam propriedades óticas adequadas, inviabilizando o uso do mesmo para avaliar o mecanismo de ligação e interação com as micelas poliméricas. Assim, técnicas eletroquímicas podem ser empregadas tendo em vista o grande número de moléculas que apresentam processo redox. Mesmo sendo muito bem fundamentadas na literatura, tais técnicas são ainda subutilizadas para tais estudos, e quando empregadas, geralmente apresentam baixo nível de discussão. Além disso, técnicas eletroquímicas apresentam diversas vantagens em comparação às técnicas tradicionais, tais como, simplicidade na execução e interpretação dos resultados, baixo custo de equipamento, relativamente sensível e fornece um elevado número de informações sobre o sistema (A. J. Bard 1980, Brett 1996).

À vista disso, para investigar o mecanismo de ligação via métodos eletroquímicos, utilizou-se o azul de ortotoluidina (AO), cujo processo redox é bem definido e apresenta uma maior reversibilidade eletroquímica em relação ao azul de metileno. Dentre as várias aplicações do AO, é de destaque, o uso deste como fármaco em potencial para tratamento alternativo de câncer (Al-Majmaie, Alattar *et al.* 2012).

Assim, neste Capítulo, realizou-se uma caracterização eletroquímica dos sistemas AO/P-123 e AO/F-127, juntamente com a avaliação da estabilidade e reversibilidade eletroquímica. Foi realizada uma avaliação do efeito temporal na interação entre o AO e os copolímeros. Parâmetros cinéticos tais como, coeficiente de transferência de elétrons ( $\alpha$ ) e constante de velocidade de reação de superfície ( $k_s$ ), foram estimados. Além disso, determinaram-se as constantes de ligação ( $K_b$ ) e os coeficientes de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) dos sistemas.

## **4.2 MATERIAIS E METODOLOGIA**

### **4.2.1 Materiais**

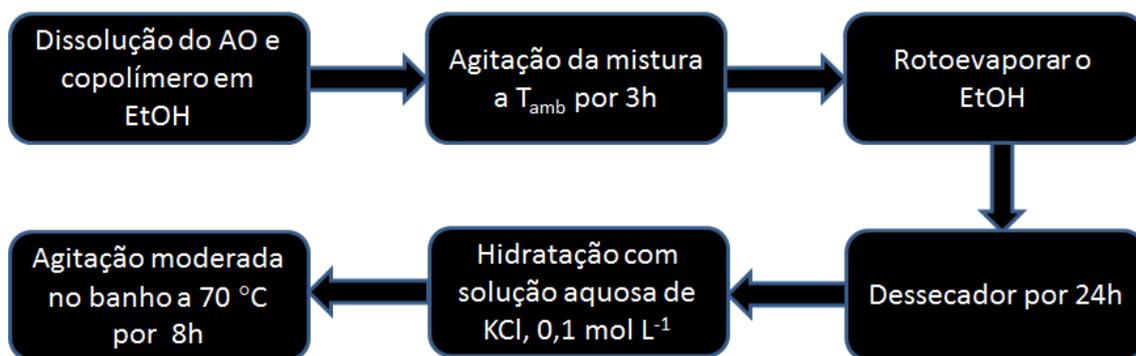
O AO foi obtido da Nuclear com grau de pureza acima de 97%. O cloreto de potássio (KCl) foi obtido da Merck com grau de pureza acima de 98%. Os Pluronic® P-123 e F-127 foram obtidos da Aldrich, com grau de pureza acima de 99%. A água

empregada para o prepara de todas as soluções estoques e de trabalho foi água Milli-Q. O etanol empregado para a produção dos formulados foi de grau PA.

## 4.2.2 Metodologia

### 4.2.2.1 Preparo das soluções e formulados

A solução estoque do AO foi preparada com a introdução de KCl fornecendo uma concentração de  $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para o AO e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para o KCl. A solução de AO foi padronizada utilizando espectrofotômetro UV-Vis usando a lei de Beer e o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) em água que é  $3,04 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  (Braga 2014). As soluções estoques foram guardadas ao abrigo da luz. Antes do uso das soluções estoques, uma padronização foi realizada para certificar-se do valor correto da concentração. No processo de incorporação do AO (confeção dos formulados) via método da dispersão sólida, como representado na Figura 4.5 (Zhang, Jackson et al. 1996, van Nostrum 2004). A agitação assim como o controle de temperatura ( $70^\circ\text{C}$ ) foi feito no banho do tipo Dubnoff com agitação MA-093, Marconi Ltda. Assim, nos formulados, obteve-se 8% (m/v) de copolímeros,  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO. Para a estimativa das constantes de ligação, as soluções estoque de P-123 e F-127 foram de 14% (m/v). Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se os Pluronic® em solução aquosa de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , deixadas em repouso por 24 horas e agitadas usando Ultrason.



**Figura 4.5.** Representação da rota de confecção dos formulados.

### 4.2.2.2 Caracterização eletroquímica

Foi empregada a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VDP) como técnicas de caracterização eletroquímica. A célula eletroquímica constituiu de um eletrodo de trabalho (ET) de carbono vítreo, um eletrodo de referência de

calomelano Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> saturado e um contra eletrodo de platina. Os voltamogramas foram obtidos empregando-se KCl na concentração de 0,1 mol/L como eletrólito suporte. Antes de realizar as medidas borbulhou-se N<sub>2</sub> por 15 minutos na solução para remover O<sub>2</sub> do meio aquoso. O eletrodo de trabalho foi limpo por polimento empregando-se alumina.

Através dos voltamogramas, foram extraídos os parâmetros de potencial catódico (E<sub>pc</sub>), potencial anódico (E<sub>pa</sub>), corrente de pico catódico (i<sub>pc</sub>), corrente de pico anódico (i<sub>pa</sub>) e potencial de meia onda (E<sub>1/2</sub>). Através dos voltamogramas foram analisadas as linearidades entre concentração e corrente do AO. A estabilidade foi verificada realizando dez ciclos voltamétricos subsequentes. A reversibilidade foi verificada variando a velocidade de varredura, avaliando o perfil do voltamograma e plotando um gráfico de corrente de pico (i<sub>p</sub>) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura (v<sup>1/2</sup>), numa concentração constante dos fenotiazínicos. O coeficiente de transferência eletrônica (α) foi calculado plotando um gráfico de potencial de pico (E<sub>p</sub>) versus lnv, Equação 2.2 de Laviron (Laviron 1979).

#### 4.2.2.3 Determinações das constantes de ligação (K<sub>b</sub>)

Uma alíquota da solução estoque de AO em KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) foi adicionado a uma solução aquosa de KCl totalizando 6,0 mL e 1,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de AO na célula eletroquímica. Depois de estabilizar a temperatura na cela, a solução foi desairada por 15 minutos e em seguida titulada com pequenas alíquotas de solução estoque de P-123 e F-127 ambas a 14%. Após cada adição de Pluronic®, agitou-se o meio e borbulho N<sub>2</sub> por aproximadamente 5 minutos. As intensidades de corrente foram monitoradas empregando VPD e corrigidas em função da diluição do meio. Os valores de corrente em função da concentração do copolímero fornece uma isoterma de ligação entre o AO e o copolímero, onde a Equação 4.1 permite fazer um ajuste teórico com os pontos experimentais obtidos (Enache, Bulcu et al. 2007, Toader and Volanschi 2007).

$$i_{pc} = \frac{i_o + i_{m\acute{a}x} \cdot K_b \cdot C}{1 + K_b \cdot C} \quad \text{Equação 4.1}$$

sendo i<sub>pc</sub> a corrente do pico catódico (A), i<sub>o</sub> corrente do pico na ausência de surfactante (A), i<sub>máx</sub> é a corrente de pico máxima (A), C a concentração do fenotiazínico (mol L<sup>-1</sup>) e K<sub>b</sub> é a constante de ligação (L mol<sup>-1</sup>).

#### **4.2.2.4 Estimativa dos coeficientes de difusão aparente**

Para a estimativa dos coeficientes de difusão aparente ( $D_{ap}$ ), empregou-se a técnica de VPD. Variou-se o tempo de modulação ( $t_m$ ) para a obtenção dos voltamogramas, onde plotou-se um gráfico de  $i_p$  versus  $(t_m)^{-1/2}$ , onde através da reta pode-se extrair o coeficiente angular e empregando a Equação 3.1 para VPD (A. J. Bard 1980, Brett 1996).

#### **4.2.2.5 Avaliação do efeito temporal na ligação do AO**

Uma alíquota de solução estoque de AO foi adicionado à solução de copolímero (8%) e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , fornecendo uma concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO e totalizando 6,0 mL de volume total na cela. A solução foi desairada por 15 minutos e feito o primeiro voltamograma. Em seguida, outros voltamogramas foram realizados, sempre desairando antes, de tempos em tempos num intervalo de 36 horas.

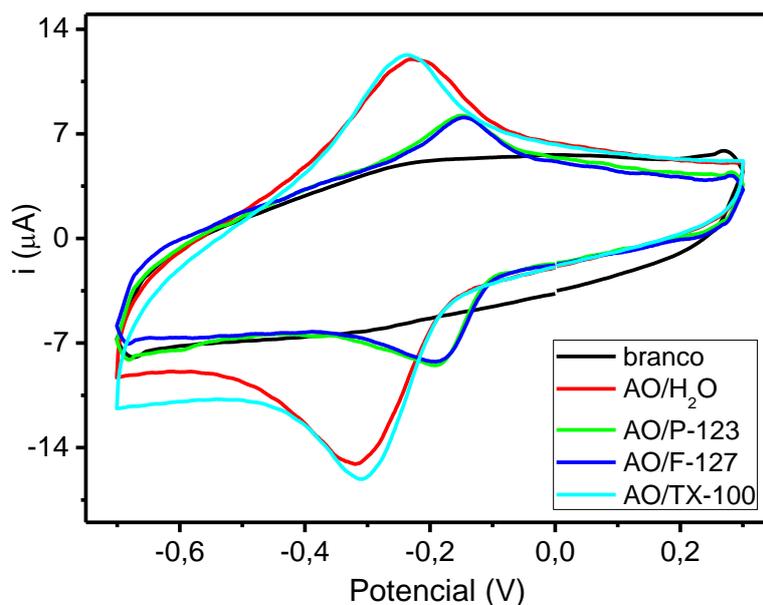
#### **4.2.2.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

Para estas medidas foram adicionados 1,0 mL do formulado numa cubeta de poliestireno. Devido às características da amostra, ajustou-se a radiação de baixo ângulo ( $12,8^\circ$ ). As medidas foram feitas em triplicatas de 10 repetições.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1 Caracterização eletroquímica**

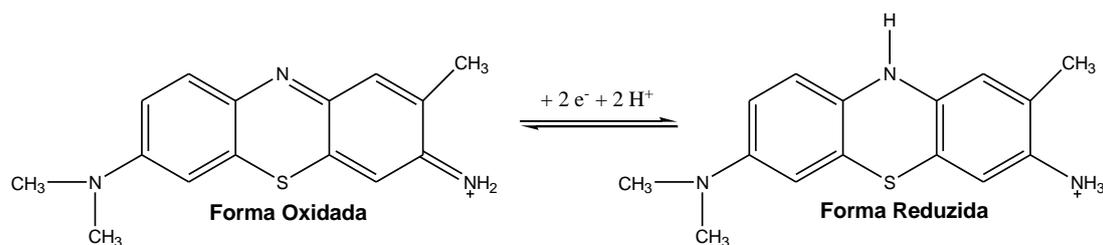
Para compreender melhor o nível de interação do AO encapsulado nos copolímeros P-123 e F-127, realizaram-se algumas medidas eletroquímicas do AO em meio de surfactante não iônico simples - Triton X-100 (TX). Em todos os experimentos com AO em meio aquoso e em copolímeros o pH permaneceu entre 6,0 e 6,3. Abaixo segue os voltamogramas cíclicos do AO em meio aquoso e nos sistemas AO/P-123, AO/F-127, AO/TX, Figura 4.6.



**Figura 4.6.** VC do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e incorporado nos copolímeros: P-123 (8%), F-127 (8%) e TX ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), com  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Sendo que o branco é  $\text{H}_2\text{O} + \text{KCl}$ .

Na Figura 4.6, para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127, observamos uma redução nas correntes de pico (catódica e anódica) concomitantemente com um deslocamento dos potenciais, indicando que o AO está encapsulado nas micelas poliméricas. A redução da corrente esta relacionada com a diminuição da concentração de AO na superfície do eletrodo, o que é uma consequência da redução do coeficiente de difusão das moléculas de AO devido à ligação dos mesmos com unímeros e principalmente com micelas, já que as condições são acima da CMC e TMC. A diminuição do coeficiente de difusão é um resultado da diminuição da velocidade com que as moléculas AO são repostas por moléculas do seio da solução (bulk), depois da redução/oxidação, na superfície do ET. Além disso, a redução na corrente também pode estar relacionada com a diminuição da velocidade de transferência de elétrons na superfície do ET devido à interação AO/copolímeros.

O deslocamento dos potenciais catódicos e anódicos para valores mais positivos (Tabela 4.1) indicam uma mudança nos ambientes químicos das espécies reduzidas e oxidadas do AO. Nas condições trabalhadas ( $\text{pH} > 5,0$ ) o equilíbrio redox ocorre da seguinte forma (Hoffmann, Dias *et al.* 2007):



**Figura 4.7.** Equilíbrio redox do AO em pH > 5.

A estrutura química do AO em suas formas oxidada e reduzida, Figura 4.7, mostra que a forma reduzida do AO possui maior caráter hidrofílico em comparação a estrutura química da forma oxidada, devido ao maior número de possibilidades de estabelecimento de ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Esta informação é extremamente importante para compreender os deslocamentos de potenciais observados na Figura 4.6. Verifica-se que o AO reduz mais facilmente e oxida com maior dificuldade no formulado do que em água, isto ocorre provavelmente devido a melhor estabilização da forma reduzida, devido às interações de van de Waals e ligação de hidrogênio com as cadeias de PEO dos copolímeros.

Para o sistema AO/TX não se observou uma variação considerável nas correntes e nem nos potenciais redox (Figura 4.6) em relação aos sistemas AO/copolímeros, indicando que micelas simples tem maior dificuldade de encapsular o AO, possivelmente devido ao menor tamanho das moléculas de TX e baixo caráter hidrofóbico do AO.

Através da Figura 4.6 foi possível extrair os parâmetros eletroquímicos que caracterizam os sistemas. Estes parâmetros estão apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Parâmetros eletroquímicos ( $E_p$ ,  $E_{1/2}$ ,  $n\Delta E_p$  e  $i_{pa}/i_{pc}$ ) do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso, em copolímeros (8%) e TX ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Sistemas	$E_{pa}$ (mV)	$E_{pc}$ (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	$n\Delta E_p$ (mV)	$ i_{pa}/i_{pc} $
H <sub>2</sub> O/KCl	-225	-330	-278	105	0,780
P-123	-154	-197	-176	43	0,990
F-127	-145	-187	-166	42	0,992
TX	-236	-308	-272	72	0,762

Verifica-se que o AO nos sistemas de P-123 e F-127 tem seu  $E_{1/2}$  deslocado em 102 e 112 mV, respectivamente, enquanto que o TX desloca apenas em 6 mV,

confirmando a maior efetividade na mudança de ambiente químico do AO em micelas de copolímeros, em comparação ao sistema AO/TX. Este resultado mostra que provavelmente o AO está mais internalizado nas micelas de copolímeros do que nas micelas simples de TX.

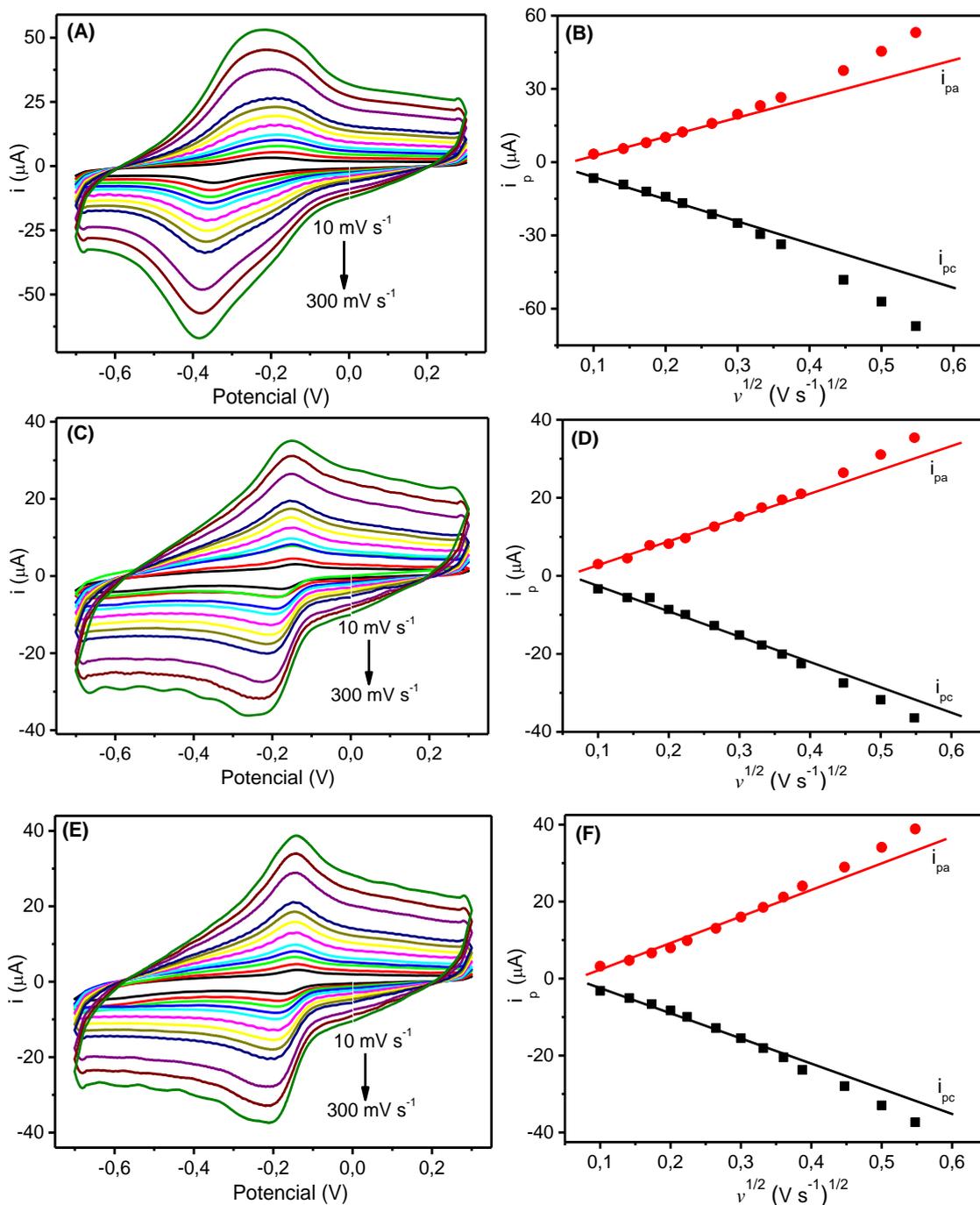
Os parâmetros  $n\Delta E_p \sim 59$  mV e  $|i_{pa}/i_{pc}| \sim 1$ , caracterizam um processo redox reversível e reversibilidade de carga, respectivamente (A. J. Bard 1980). Desta forma, observa-se que o AO em meio de P-123 e F-127 apresentou uma melhor reversibilidade redox e de carga do que o AO em meio aquoso, tendo em vista que os valores de tais parâmetros foram mais próximos de 59 mV e 1 em meio de copolímeros.

No Capítulo 2, verificou-se que pode haver moléculas autoagregadas a partir de  $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Isto significa que na concentração de AO empregado nestes experimentos ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), há moléculas autoagregadas especialmente em meio aquoso. Desta forma, sabendo da capacidade de monomerização que os copolímeros apresentam, estes resultados sugerem que a monomerização tende a aumentar a reversibilidade eletroquímica do AO. Realmente, como foi constatada no Capítulo 2, a autoagregação de fenotiazínicos causa uma diminuição da reversibilidade dos mesmos.

Para o sistema AO/TX, nota-se uma menor capacidade de monomerização dos autoagregados de AO em comparação aos surfactantes copoliméricos, como observado nos voltamogramas cíclicos, e agora confirmado com a baixa proximidade dos parâmetros  $n\Delta E_p$  (mV) e  $|i_{pa}/i_{pc}|$  aos valores 59 mV e 1, respectivamente.

#### **4.3.2 Reversibilidade dos sistemas**

A reversibilidade do AO encapsulado nos copolímeros de P-123 e F-127, verificada anteriormente, pode ser confirmada através da variação das correntes de pico com a velocidade de varredura ( $v$ ). Para isto, empregou-se a Equação Randles-Sevcik (Equação 2.2) para sistemas reversíveis referentes ao método de VC e construiu gráficos de  $i_p$  versus  $v^{1/2}$ , Figura 4.8.



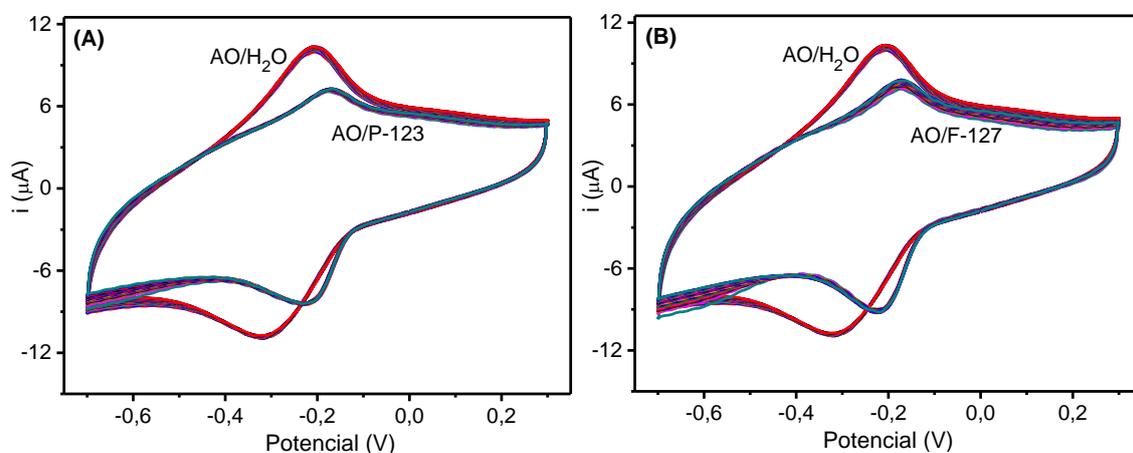
**Figura 4.8.** Avaliação da reversibilidade do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) encapsulado nos copolímeros (8%),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A) e B)** AO/ $\text{H}_2\text{O}$ . **C) e D)** AO/P-123. **E) e F)** AO/F-127.

Observa-se nitidamente uma maior simetria nos voltamogramas cíclicos do AO incorporado em copolímeros, mostrando novamente que o AO tem maior reversibilidade eletroquímica quando está em meio de surfactante copolimérico. Esta observação é confirmada através dos gráficos de  $i_p$  versus  $v^{1/2}$ , onde uma melhor linearidade é verificada

nos sistemas AO/copolímeros, Figura 4.8D e F. Contudo, em todos os casos, a linearidade é obedecida apenas num intervalo de baixa velocidade de varredura, 10 a 90  $\text{mV s}^{-1}$  para o AO em meio aquoso e 10 a 130  $\text{mV s}^{-1}$  para o AO encapsulado em copolímeros. Estes resultados indicam que o processo redox do AO, na superfície do ET, é reversível e controlado por difusão apenas dentro destas faixas de velocidade de varredura.

#### 4.3.3 Estudo de estabilidade eletroquímica dos formulados

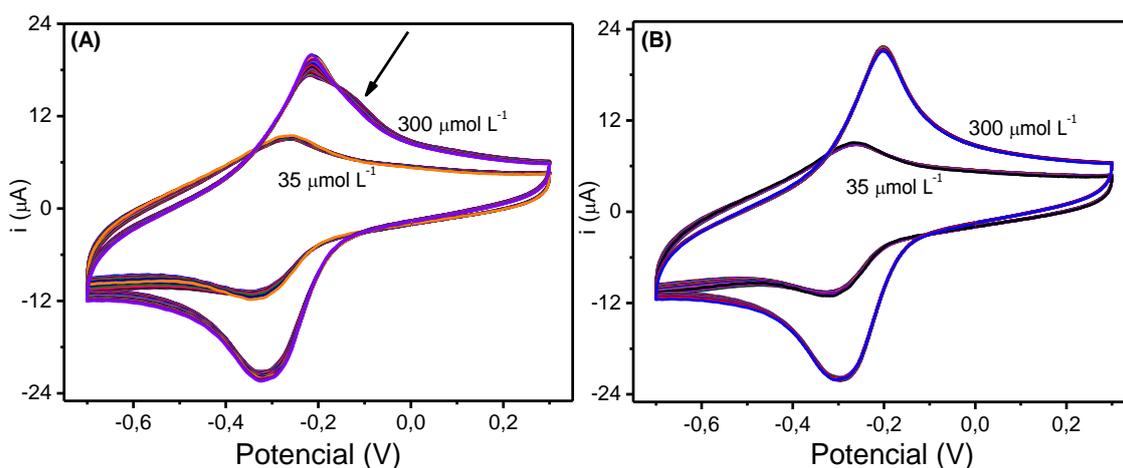
A estabilidade eletroquímica é uma consequência da capacidade em que a concentração local (na superfície do ET) permanece constante com o aumento do número de ciclos, ou seja, a capacidade das espécies oxidadas serem reduzidas na mesma proporção, voltando ao seu estado de origem para serem oxidadas novamente. É um parâmetro que está relacionada com a reversibilidade redox da espécie eletroativa. Compostos eletroquimicamente estáveis tendem a serem reversíveis. Desta forma, avaliou-se primeiramente a estabilidade dos sistemas AO/P-123 e AO/F-127 formulados, fazendo-se vários ciclos (Figura 4.9) e avaliando as variações nas correntes de picos e nos potenciais redox.



**Figura 4.9.** Voltametria cíclica de 30 ciclos consecutivos para o AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e para os sistemas formulados em copolímeros (8%), KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** AO/P-123. **B)** AO/F-127.

Primeiramente, verificou-se que o AO formulado, nestas condições experimentais, aparenta ter maior estabilidade eletroquímica em formulado de P-123 do que em água e menor estabilidade eletroquímica em F-127 do que em água. Este resultado mostra uma maior dificuldade do F-127 em repor a concentração de AO na

superfície do eletrodo. Quando comparamos a estabilidade do AO entre os formulados, observamos na Figura 4.9 que o AO incorporado em P-123 apresentou maior constância nas correntes de picos, especialmente quando se compara os picos anódicos de ambos os formulados. Este resultado indica que o AO incorporado em P-123 apresenta maior estabilidade eletroquímica. A mesma avaliação foi realizada para o sistema AO/TX, Figura 4.10, porém em condições de maiores concentrações de AO para verificar o efeito da agregação na estabilidade e reversibilidade.



**Figura 4.10.** Voltametria cíclica de 30 ciclos consecutivos do AO (35 e 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e em meio de TX (2,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ), KCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** AO sem TX. **B)** AO com TX.

Verifica-se na Figura 4.10A que em solução mais concentrada de AO um ombro anódico adicional aparece em -0,12 V. Contudo, nas mesmas condições, mas na presença de TX, o sinal não aparece, como pode ser visto na Figura 4.10B. Este resultado sugere que o ombro pode estar associado à formação de autoagregados de AO eletroativo na solução, que em meio de TX são monomerizados. Assim, pode-se inferir que surfactantes são capazes de aumentar a reversibilidade eletroquímica de compostos eletroativos que formam autoagregados, pois os voltamogramas ficam mais simétricos na presença do surfactante simples TX.

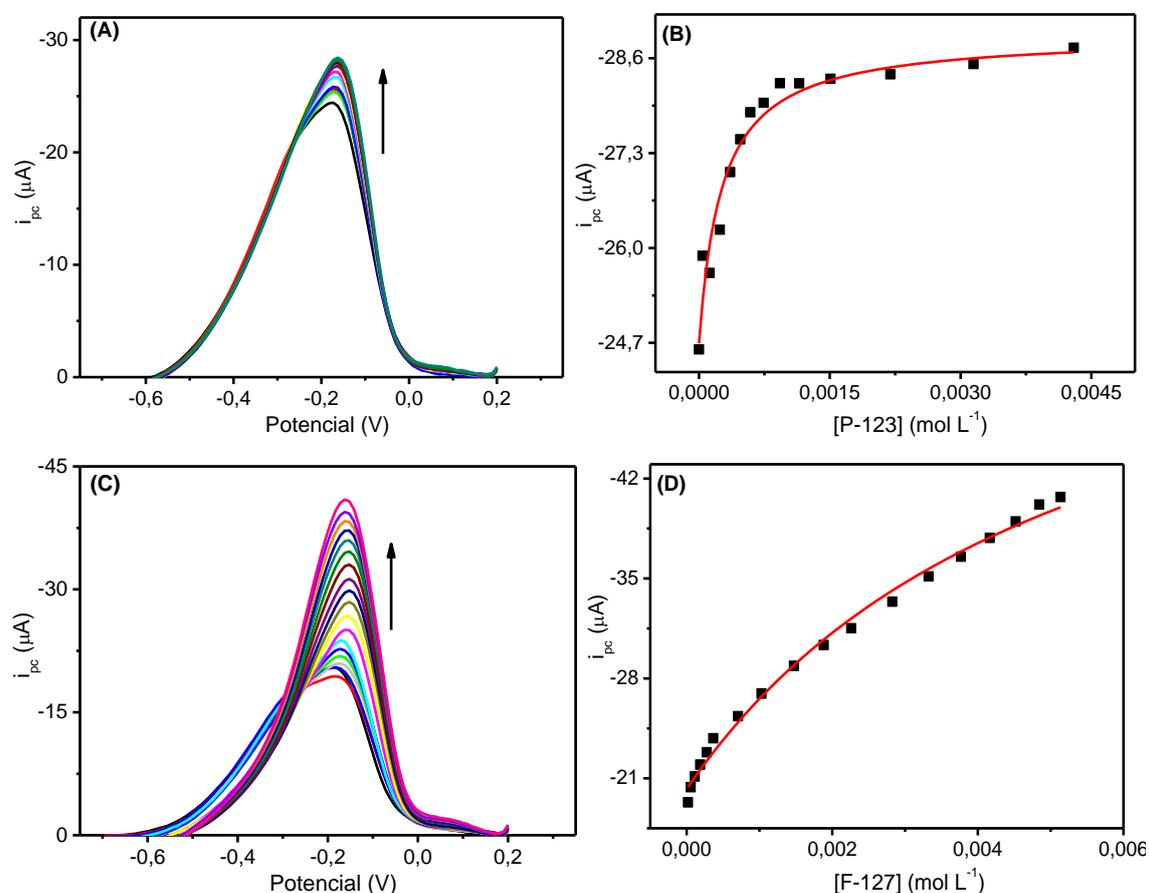
Observa-se também que em meio de surfactante, há uma maior estabilidade eletroquímica do AO, tanto em baixa concentração (35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) quanto em alta concentração (300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), pois as correntes de picos são praticamente constantes na presença de TX em comparação as correntes do AO na ausência do surfactante, como pode ser visto comparativamente na Figura 4.10A e B. Este resultado mostra que os

surfactantes/micelas ajudam a estabelecer a concentração local (na superfície do eletrodo) de espécies oxidadas e reduzidas no decorrer dos ciclos. Isto ocorre provavelmente devido a capacidade dos surfactantes em manter as moléculas de AO monomerizadas.

#### 4.3.4 Determinações das constantes de ligação

Para investigar o nível de ligação do AO com micelas de copolímeros, determinou-se as constantes de ligação ( $K_b$ ) a 30,0 °C empregando a Equação 4.1 de ajuste não linear. Como é conhecida na literatura, esta temperatura esta acima da TMC dos copolímeros (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994, Wanka, Hoffmann *et al.* 1994).

Neste experimento o AO não foi formulado pelo método de dispersão sólida. Para a determinação de  $K_b$ , adições de alíquotas de solução estoque de copolímeros foram adicionadas sobre uma solução de AO. Abaixo segue os voltamogramas de pulso diferencial e variação da corrente catódica em função da concentração de copolímeros, Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Variação da corrente catódica do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com adição de copolímero,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl,  $t_m = 0,1 \text{ s}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** VPD para AO/P-123. **B)** Curva de corrente em função da [P-123]. **C)** VPD para AO/F-127. **D)** Curva de corrente em função da [P-127].

Na Figura 4.11 A e C pode ser observado um aumento na corrente catódica com a adição de copolímeros, indicando uma monomerização de moléculas de AO. Contudo, observa-se que o P-123 tem maior capacidade de monomerizar os autoagregados de AO, pois a saturação do sistema foi alcançada numa concentração menor em relação ao sistema AO/F-127, onde não se verifica saturação na faixa de concentração estudada. Através dos valores de  $K_b$  foi possível calcular a variação da energia de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), nessas condições experimentais, empregando a Equação 4.2.

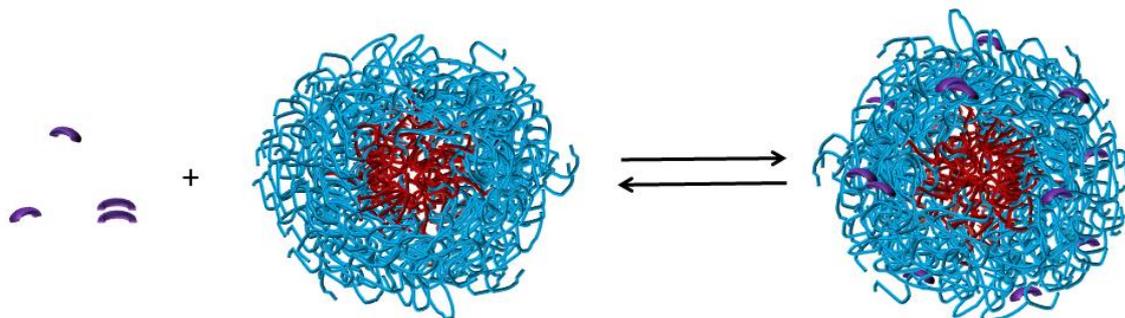
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad \text{Equação 4.2}$$

sendo R a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e T é a temperatura (em Kelvin). Os valores de  $K_b$  e  $\Delta G^\circ$  se encontram na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Valores de  $K_b$ ,  $\Delta G^\circ$  e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para AO/copolímeros, com  $[\text{AO}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Sistemas	$K_b (\text{L mol}^{-1})$	$\Delta G^\circ (\text{kJ mol}^{-1})$	$R^2$
P-123	$3.846 \pm 392$	-20,81	0,9551
F-127	$184 \pm 3$	-13,14	0,9937

Os perfis das isotermas de ligação são confirmados pelo valor da constante de ligação que foi aproximadamente 21 vezes maior para o sistema AO/P-123. Este resultado mostra que o AO liga-se mais efetivamente e tem um mecanismo de ligação termodinamicamente mais favorável para o sistema AO/P-123. Uma representação da ligação de moléculas de AO nas micelas de copolímeros é mostrado na Figura 4.11.

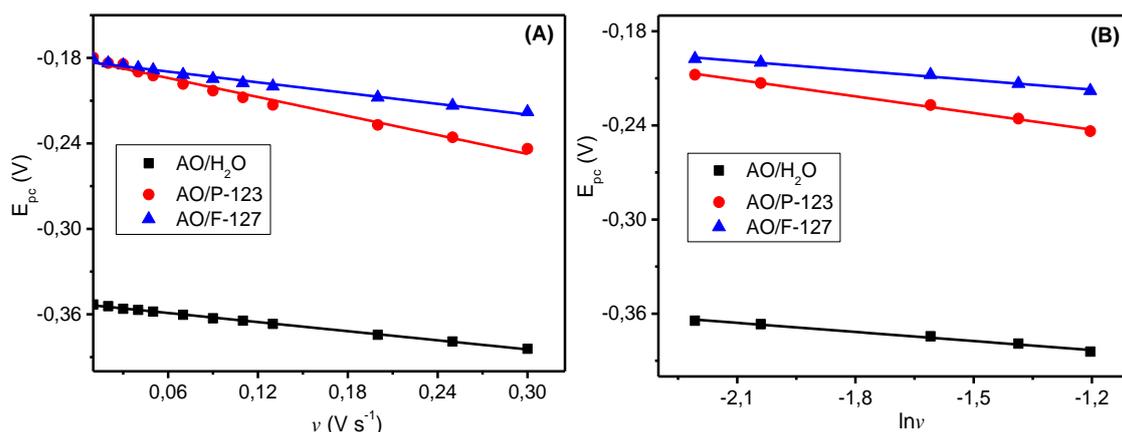


**Figura 4.12.** Representação do equilíbrio termodinâmico do AO ligado a micela de copolímero.

É importante salientar que, era de se esperar uma maior ligação para os copolímeros de F-127, sendo este mais hidrofílico do que o P-123, pois apresenta maior teor de grupos hidrofílicos PEO (70%) (Alexandridis, Holzwarth et al. 1994), como visto na Figura 4.3. Tal anomalia, também observada por Braga, pode residir no fato de moléculas de AO competir com moléculas de água na *corona* hidrofílica das micelas copoliméricas (Braga 2014), ou seja, o elevado grau de hidratação nos grupos PEO, faz com que moléculas de água blindam a interação do AO com tais grupos. Como o F-127 possui uma *corona* hidrofílica mais hidratada, por ter maior teor hidrofílico, o grande número de moléculas de água pode impedir ou blindar a interação do AO com os grupos PEO da micela. As micelas de P-123 tem sua *corona* menos hidratada, devido ao menor teor hidrofílico, conferindo um menor efeito de blindagem pelas moléculas de água e conseqüentemente uma maior interação do AO com os grupos PEO das micelas de P-123.

#### **4.3.5 Estimativas dos parâmetros cinéticos: coeficientes de transferência de elétrons ( $\alpha$ ) e constantes de velocidades de reação da superfície ( $k_s$ )**

Os parâmetros cinéticos  $\alpha$  e  $k_s$  foram estimados empregando a Equação de Laviron (Equação 2.1) fazendo  $E_p$  versus  $\ln v$ , Figura 4.13B (A. J. Bard 1980). Os valores de potencial formal ( $E^\circ$ ) da Equação 2.1, foram determinados através do gráfico de  $E_{pc}$  versus  $v$  pela extrapolação da reta sendo  $v = 0$  (coeficiente linear), Figura 4.13A.



**Figura 4.13.** Estimativa dos parâmetros cinéticos do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso e copolímeros (8%),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl,  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** Plot  $E_{pc}$  versus  $v$ . **B)** Plot  $E_{pc}$  versus  $\ln v$ .

Os voltamogramas cíclicos referentes à variação de velocidade de varredura foram apresentados anteriormente (Figura 4.8B, D e F) na discussão da reversibilidade eletroquímica do AO nos diferentes meios. Para estimar os parâmetros cinéticos, trabalhou-se apenas na região de menor reversibilidade, ou seja, em altas velocidades de varredura ( $110$  a  $300 \text{ mV s}^{-1}$ ), pois é a região mais adequada para se aplicar a Equação de Laviron (Laviron 1979), como mostra a Figura 4.13B. Os valores de  $\alpha$  e  $k_s$  estão apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Parâmetros cinéticos,  $\alpha$  e  $k_s$  do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso e em copolímeros (8%), potencial formal ( $E^\circ$ ) e coeficiente de correlação (R),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Parâmetros	H <sub>2</sub> O	P-123	F-127
$E^\circ$ (mV)	-353	-181	-180
R ( $E_{pc}$ x $\ln v$ )	0,986	0,995	0,988
$\alpha$	0,69	0,37	0,59
$k_s$	3,1	1,5	2,1

Observa-se uma redução nos valores de  $\alpha$  e  $k_s$  do AO quando o mesmo é incorporado em micelas de copolímeros em relação ao AO em meio aquoso, como tem sido observado na literatura com micelas simples (Jiao, Li *et al.* 2005, Toader and Volanschi 2007).

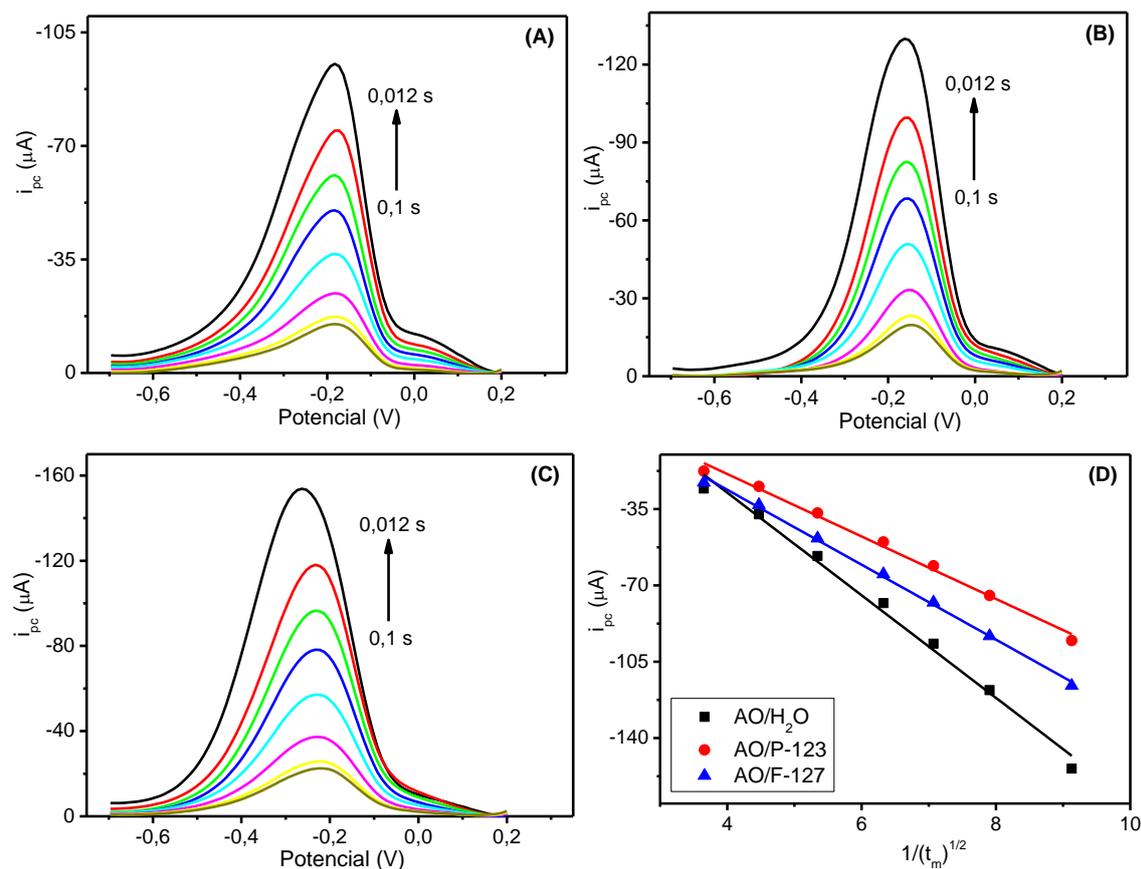
O valor de  $\alpha$  está relacionado com a simetria da barreira de ativação e as energias do estado oxidado, reduzido e do complexo ativado (A. J. Bard 1980). Assim, o valor de  $\alpha$  de 0,69 e 0,59 para o AO em meio aquoso e de F-127, respectivamente, indicam que a estrutura do complexo ativado é mais semelhante à estrutura da forma reduzida do AO e, conseqüentemente, o equilíbrio redox está mais deslocado para a forma oxidada que apresenta menor energia livre. No entanto, comparativamente com o AO em meio aquoso, verifica-se uma pequena estabilização da forma reduzida. O valor de  $\alpha$  foi menor que 0,5 apenas para o AO em P-123 (0,37), indicando que a estrutura do complexo ativado é mais semelhante à estrutura da forma oxidada do AO, sendo neste caso, o equilíbrio redox mais deslocado para a forma reduzida que apresenta menor energia livre. Estes resultados mostram que, na presença de P-123, a forma reduzida do AO é mais estabilizada pelas interações de van der Waals e ligações de hidrogênio com os grupos PEO dos copolímeros do que na presença de F-127. Provavelmente, o efeito de blindagem causado pela grande quantidade de água de hidratação entre as unidades de PEO, faz com que a forma reduzida do AO não seja tão estabilizada como ocorreu no P-123. Estes dados então em concordância com o deslocamento dos potenciais de redução e oxidação do AO, em meio aquoso e copolímeros, quando comparamos os voltamogramas na Figura 4.6.

A redução de  $k_s$  do AO em meio de copolímeros em comparação ao meio aquoso, indicam uma redução na velocidade do processo redox entre espécie eletroativa e ET, isto ocorre devido à interação do AO com as micelas e unímeros. Contudo, também mostra a intensidade desta interação, pois se observa um valor de 1,5 e 2,1  $s^{-1}$  para o AO/P-123 e AO/F-127, respectivamente. Este resultado sugere uma maior interação do AO com P-123, pois torna o processo redox na superfície do ET mais lento. Adicionalmente, valores de  $k_s$  superior a 0,020  $s^{-1}$ , como é o caso, indicam um equilíbrio redox simples, sem reações paralelas ou acopladas e que este equilíbrio é alcançado rapidamente após a aplicação de um potencial (A. J. Bard 1980, Brett 1996).

Tanto os valores de  $\alpha$  quanto os valores de  $k_s$  estão em concordância com os valores encontrados na determinação da constante de ligação ( $K_b$ ) encontrados anteriormente, onde se verificou uma maior ligação para o sistema AO/P-123. Assim, estes resultados confirmam a hipótese proposta por Braga, onde as moléculas de água de hidratação dos grupos PEO blindam a interação das moléculas de AO nestes grupos.

### 4.3.6 Estimativas dos coeficientes de difusão aparente

Os coeficientes de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) dos sistemas formulados de AO/P-123 e AO/F-127 foram estimados empregando-se a Equação 3.1 referente ao método de VPD. Abaixo segue a variação da corrente de pico catódico em função do tempo de modulação (Figura 4.14A, B e C) e o plot de  $i_{pc}$  versus  $1/(t_m)^{1/2}$ , Figura 4.14D.



**Figura 4.14.** Estimativa do  $D_{ap}$  para o AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso e em copolímeros (8%). Variação do tempo de modulação ( $t_m$ ) para: **A)** AO/P-123, **B)** AO/F-127 e **C)** AO/H<sub>2</sub>O. **D)** Plot de  $i_{pc}$  versus  $1/(t_m)^{1/2}$  para AO em meio aquoso e em copolímeros.

Os valores de  $D_{ap}$  foram extraídos através das retas obtidas na Figura 4.14D e estão apresentados na Tabela 4.4.

Para compreender melhor os valores encontrados de  $D_{ap}$  por VPD, realizaram-se experimentos empregando espelhamento de luz dinâmico (DLS) para determinar o coeficiente de difusão dos sistemas AO/P-123 e AO/F-127. Os valores dos coeficientes

de difusão ( $D$ ) estimados por DLS se encontram na Tabela 4.4, juntamente com os valores de  $D_{ap}$  estimados por VPD.

**Tabela 4.4.** Valores de  $D_{ap}$  e  $D$  estimados por VPD e DLS, respectivamente, do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em água e incorporado nas micelas de copolímeros (8%),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

<b>Técnicas:</b>	<b>VPD</b>	<b>DLS</b>
Sistemas	$D_{ap} (10^{-6}, \text{cm}^2 \text{s}^{-1})$	$D (10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1})$
H <sub>2</sub> O	8,7	-
P-123	3,7	0,080
F-127	4,8	0,0067

Com relação aos valores de  $D_{ap}$  encontrados por VPD, verifica-se uma redução do mesmo em meio de copolímeros em relação ao meio aquoso, Tabela 4.4, indicando que a incorporação do AO em micelas de copolímeros diminui a difusibilidade do AO no meio. Entre os copolímeros, verifica-se um menor valor  $D_{ap}$  para o sistema AO/P-123. Entretanto, na técnica de DLS o menor valor do  $D$  foi para o sistema AO/F-127. Adicionalmente, os valores de  $D$  encontrados por DLS são muito menores em relação aos valores de  $D_{ap}$  encontrados por VPD. Esta inversão e discrepância nos valores podem ser justificadas pelas características intrínsecas de análise do coeficiente de difusão de cada técnica. Assim, é apropriado compreender tais características.

A técnica de DLS avalia o coeficiente de difusão de espécies com base no movimento Browniano empregando-se a Equação de Stokes-Einstein, cuja relação entre coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico da espécie é inversamente proporcional. A técnica considera que as espécies no meio são esféricas e livres de interações intermoleculares. Além disso, como se trata de uma técnica de espalhamento de luz, esta avalia o coeficiente de difusão apenas das espécies que causam espalhamento no meio.

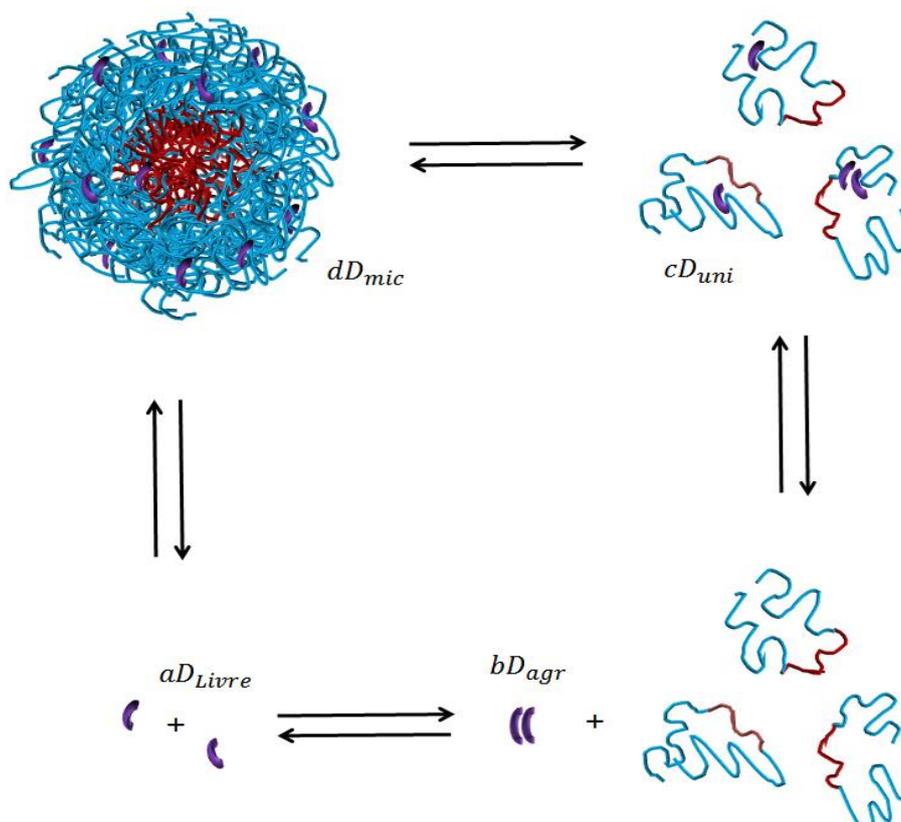
Por outro lado, a técnica de VPD avalia o coeficiente de difusão da sonda eletroquímica que chega até a superfície do ET. Em meio de copolímeros, moléculas de AO podem chegar até a superfície do eletrodo de diferentes formas, sendo elas: livre, autoagregadas, ligado a unímeros e incorporado na micela. Assim, é proposto que, empregando uma técnica eletroquímica, o coeficiente de difusão deve ser uma

somatória destas parcelas, que são as quatro formas mais relevantes que o AO pode chegar até a superfície do eletrodo, Equação 4.3.

$$D_{ap} = aD_{Livre} + bD_{agr} + cD_{uni} + dD_{mic} \quad \text{Equação 4.3}$$

sendo  $D_{ap}$  o coeficiente de difusão aparente,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  representam as frações das espécies de AO livres, autoagregado, ligado a unímeros e incorporado na micela, respectivamente, cuja a soma é igual a um.

Como mencionado, os valores de  $D_{ap}$  estimados empregando VPD são muito maiores em relação aos  $D$  estimados empregando DLS, que por sua vez forneceram valores semelhantes aos encontrados na literatura em condições experimentais semelhantes (Malmsten and Lindman 1992, Alexandridis and Alan Hatton 1995). Este fato é condizente com a Equação proposta, pois na técnica de VPD tem contribuição de outras três parcelas, e não somente da parcela referente micela com AO incorporado ( $D_{mic}$ ), como é analisado em DLS, já que é a única forma onde se observa espalhamento significativo. Este resultado é particularmente interessante, pois mostra que nem todas as moléculas de AO estão ligadas as micelas, mesmo tendo elevados valores de  $K_b$ . Há moléculas de AO ligadas a unímeros, na forma autoagregada e livre, porem com frações distintas apresentando possivelmente a seguinte ordem:  $d > c > b \gg a$ . Desta forma o equilíbrio dinâmico apresentado na Figura 4.13 é insuficiente para representar os sistemas AO/copolímeros, de forma que um equilíbrio mais completo é proposto, Figura 4.15.



**Figura 4.15.** Equilíbrios dinâmicos existentes nos sistemas: equilíbrio monômero e autoagregado de AO, equilíbrio autoagregado de AO e unímeros e equilíbrio unímeros com AO e micela.

Também mencionamos que, quando comparamos os valores de  $D$ , na técnica de DLS, entre os copolímeros, Tabela 4.5, verifica-se um valor maior para o sistema AO/P-123, mostrando que, de acordo com a Equação de Stokes-Einstein, as micelas de P-123 são menores (Alexandridis and Alan Hatton 1995, Hecht and Hoffmann 1995). Contudo, na técnica de VPD o contrário é observado, ou seja, o  $D_{ap}$  é menor para o sistema AO/P-123. Este resultado está em harmonia com os valores de  $K_b$  e a Equação 4.3 proposta. Como o AO liga-se mais efetivamente nos copolímeros de P-123 (maior  $K_b$ ), há uma fração menor de moléculas de AO ligadas a unímeros, autoagregadas e livre, contribuindo para reduzir os valores de  $D_{uni}$ ,  $D_{agr}$  e  $D_{livre}$ , respectivamente, e consequentemente o valor  $D_{ap}$ .

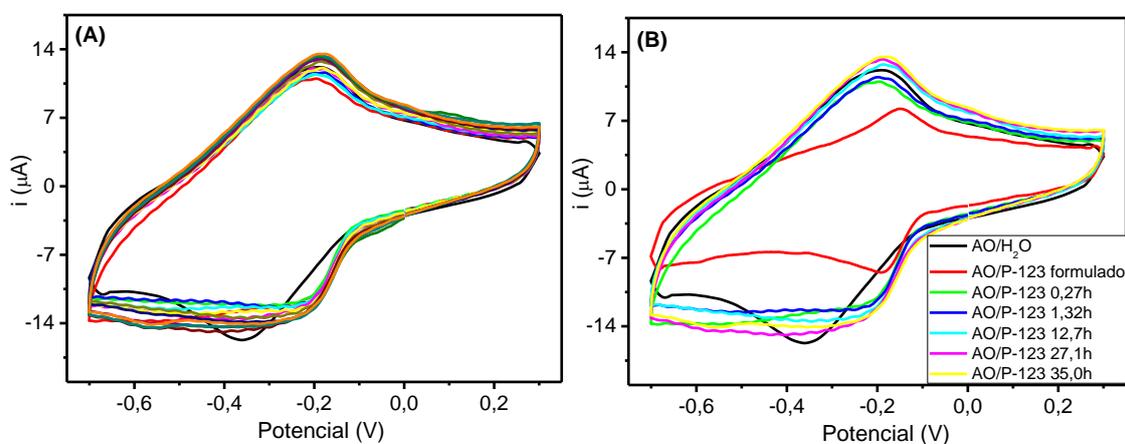
Estes resultados, de maneira geral, mostram que não se pode simplesmente excluir a existência de moléculas livres, autoagregadas e ligadas a unímeros, no meio, atribuindo valores de  $a$ ,  $b$  e  $c = 0$  e considerando-se apenas  $D_{ap} = D_{mic}$  como a literatura

tem reportado (Mackay 1994, Rusling 1997, Charlton and Doherty 2000, Ferreira, El Seoud *et al.* 2004, Haque, Rahman *et al.* 2011, Mahmud, Samed *et al.* 2011).

Uma análise mais detalhada das micelas de copolímeros com e sem AO, empregando DLS, será realizada no Capítulo 6.

#### 4.3.7 Efeito temporal da interação do AO

Avaliou-se o efeito temporal da interação do AO com as micelas de copolímeros de P-123 e F-127. Contudo, para esta avaliação, não se realizou a incorporação do AO pelo método de dispersão sólida, e sim adição direta da sonda. O AO foi introduzido numa solução de copolímero (8%) e realizaram-se diversos voltamogramas num intervalo de aproximadamente 36 horas. Este experimento teve o objetivo de avaliar o grau de penetração do AO nas micelas de copolímeros através da adição direta. Abaixo segue os voltamogramas cíclicos somente para o sistema P-123, Figura 4.16. Como o comportamento da corrente e potencial foi semelhante para o sistema envolvendo o F-127, optou-se por não apresentar.

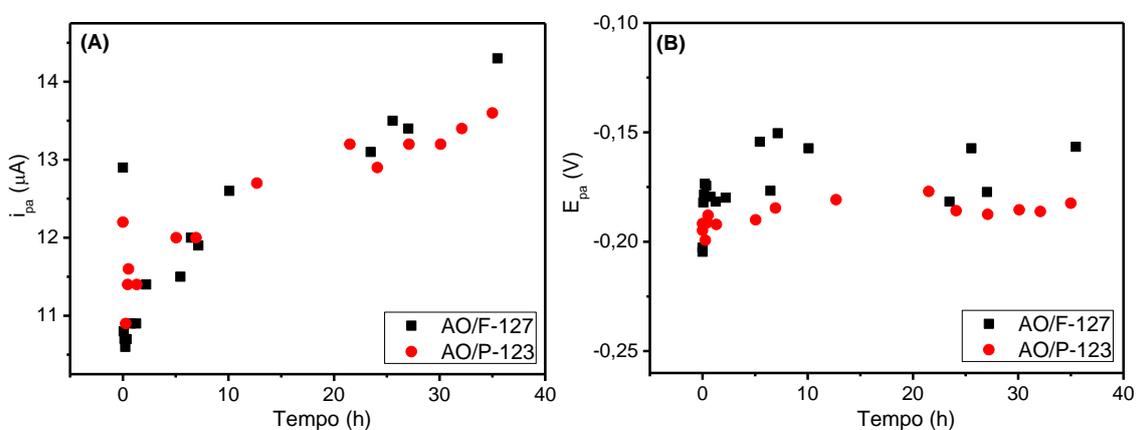


**Figura 4.16.** Efeito do tempo na interação do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com P-123 (8%), KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** VC do AO em P-123 por adição direta em função do tempo. **B)** VCs do AO em P-123 por adição direta comparando com AO em P-123 formulado.

Verifica-se na Figura 4.16A que as correntes e os potenciais não variam muito em função do tempo, no entanto uma tendência é observada, como pode ser observado na Figura 4.17A. Na Figura 4.16B, a comparação da adição direta de AO e o mesmo formulado pelo método de dispersão sólida, mostra claramente o nível de interação do

AO com o P-123. No formulado as moléculas de AO interagem mais efetivamente com as micelas, onde neste caso, grande parte das moléculas de AO estão incorporadas nas micelas. Na adição direta o AO interage mais fracamente com as micelas, pois provavelmente o AO não chega a penetrar na *corona* hidrofílica. Estes resultados mostram que os valores de constantes de ligação determinados anteriormente avaliam uma ligação mais superficial com micelas e unímeros, já que o método de determinação foi por adição direta.

Para observar melhor a tendência nas correntes e nos potenciais, construiu gráficos de  $i_{pa}$  versus tempo e  $E_{pa}$  versus tempo, Figura 4.17.



**Figura 4.17.** Efeito do tempo na interação do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com copolímeros (8%), por adição direta, KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . **A)** Plot de  $i_{pa}$  versus tempo. **B)** Plot de  $E_{pa}$  versus tempo.

Nos primeiros minutos a corrente diminui em função do tempo, Figura 4.17A, sugerindo uma redução do coeficiente de difusão e da constante de velocidade de transferência de elétrons na superfície do ET, devido à interação do AO com os copolímeros, como já constatado. Depois de aproximadamente 25 minutos, a corrente começa a aumentar, indicando que a interação do AO com os copolímeros esta promovendo monomerização de moléculas de AO autoagregadas, Figura 4.17A. A Figura 4.17B, mostra um pequeno deslocamento no potencial anódico para região de mais difícil oxidação (potencial mais positivo) nos primeiros minutos, devido a maior estabilização da forma reduzida do AO nos grupos hidrofílicos PEO, como discutido anteriormente. Este deslocamento, mesmo que pequeno, mostra uma leve mudança de ambiente químico do AO com o tempo. Contudo, depois de aproximadamente uma hora, os valores de  $E_{pa}$  ficam oscilantes, dentro de um valor médio de  $-166$  e  $-183 \text{ mV}$

para o AO/F-127 e AO/P-123, respectivamente. Estes valores sugerem um ambiente químico mais favorável eletroquimicamente para o sistema AO/P-123, o que é condizente com os resultados obtidos de  $K_b$  e  $k_s$ .

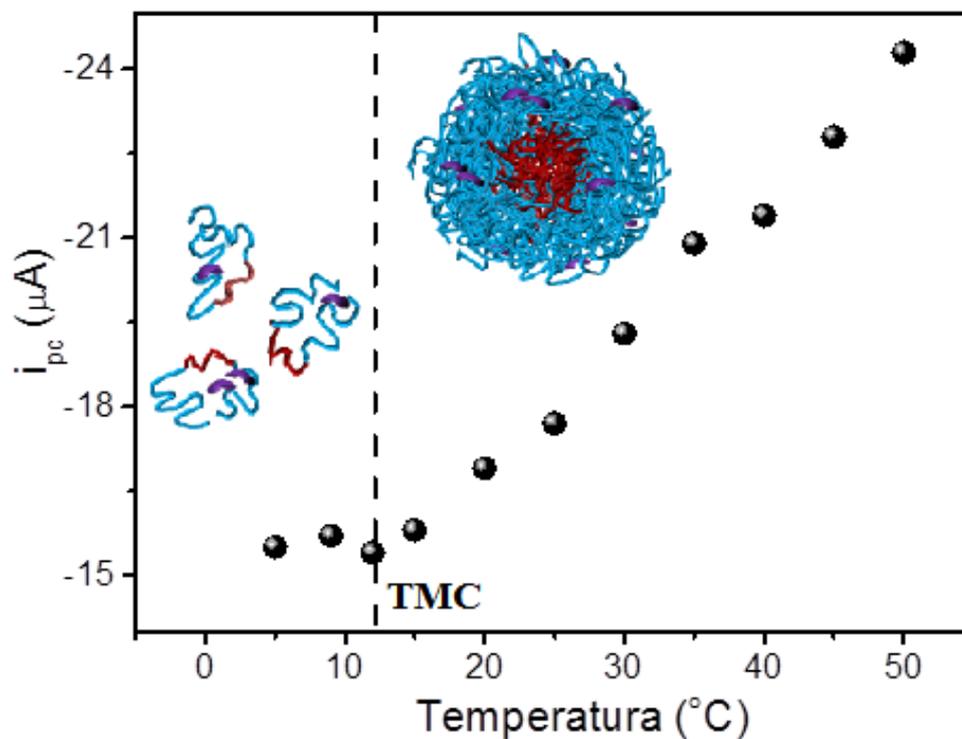
#### 4.4 CONCLUSÃO

O AO interage mais efetivamente com os copolímeros P-123 e F-127 em relação ao surfactante simples TX. Os sistemas formulados com AO encapsulado nos copolímeros aumentam a reversibilidade e estabilidade eletroquímica do fenotiazínico. Tanto em meio aquoso como encapsulado o processo redox do AO é reversível e controlado por difusão apenas em baixas velocidades de varredura. A forma reduzida do AO é mais estabilizada em copolímeros em relação ao meio aquoso. Dentre os copolímeros, esta estabilização foi mais eficiente para o P-123. O método eletroquímico permite determinar o coeficiente de difusão aparente do AO em meio de micelas de copolímeros, que é uma soma de quatro parcelas. A ligação do AO, por adição direta em meio de copolímeros é apenas superficial, ou seja, não penetra na corona hidrofílica com o tempo. A interação do AO com as micelas poliméricas é mais efetiva no formulado do que em adição direta. O AO liga-se mais efetivamente e espontaneamente com as micelas de P-123 do que nas micelas de F-127. Há realmente uma competição entre moléculas de água e moléculas de AO na interação com os grupos PEO das micelas de F-127. O equilíbrio redox para todos os sistemas é simples e rapidamente alcançado.

Métodos eletroquímicos são viáveis na investigação dos efeitos de interação de sondas e fármacos com micelas poliméricas, ajudando a compreender as mudanças nas propriedades eletroquímicas das espécies encapsuladas e entender o mecanismo de ligação, fornecendo informações adicionais em relação aos obtidos pelos métodos óticos tradicionais.

# CAPÍTULO 5

Avaliação Eletroquímica no Processo de Autoagregação de Pluronic® do Tipo P-123 e F-127 e Termodinâmica de ligação com Azul de Ortotoluidina



## 5.1 INTRODUÇÃO

O processo de micelização em meio aquoso de copolímeros do tipo tribloco (PEO-PPO-PEO), como por exemplo, P-123 e F-127, tem atraído muita atenção em vários grupos de pesquisa, devido a grande importância e vasta aplicação em diversos da indústria (Winnik, Breton et al. 1992, Winnik, Davidson et al. 1992, Hioka, Chowdhary et al. 2002, van Nostrum 2004, Sezgin, Yüksel et al. 2006, Chiappetta and Sosnik 2007, Kedar, Phutane et al. 2010, Miyata, Christie et al. 2011). Em meio aquoso, estes copolímeros tendem a formar micelas acima da concentração micelar crítica (CMC) com um interior hidrofóbico denominado de *core*, e uma camada hidrofílica denominada de *corona* (Kabanov, Batrakova et al. 2002). Para uma dada concentração de copolímeros, a temperatura na qual as micelas poliméricas são formadas é chamada de temperatura micelar crítica (TMC). O *core*, formada por unidades de PPO, é uma região com poucas moléculas de água capaz de aprisionar moléculas hidrofóbicas devido às interações de van der Waals. A *corona*, formada por unidades de PEO, é uma região mais hidratada, onde ocorre ligação de hidrogênio entre moléculas de água e unidades de PEO (Kedar, Phutane et al. 2010).

Tanto CMC quanto a TMC podem ser determinadas através de estudos de espalhamento estático e dinâmico de luz (Zhou and Chu 1988, Nelson and Cosgrove 2004), emissão de fluorescência utilizando-se de sondas fluorescentes como o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Alexandridis, Holzwarth et al. 1994) e micro DSC (Zhou and Chu 1988, Hecht and Hoffmann 1995), onde neste último, é definida como a interseção da tangente no primeiro ponto de inflexão do pico-térmico com a linha base (Hecht and Hoffmann 1995). No caso da TMC, tem-se uma dependência com a concentração de copolímero em solução. Assim, Hecht e Hoffmann propuseram uma equação que permite calcular o valor teórico da TMC, dos copolímeros do tipo PEO-PPO-PEO, de acordo com a porcentagem (m/V) do copolímero em solução, Equação 5.1 (Hecht and Hoffmann 1995).

$$TMC = TMC^{\circ} - A(w) \quad \text{Equação 5.1}$$

sendo  $TMC^{\circ}$  corresponde ao valor da TMC à diluição infinita igual 17,8 °C para o P-123, e 20,4 °C para o F-127,  $w$  é a concentração de copolímero em porcentagem (m/V) e  $A$  é o coeficiente angular do gráfico TMC *versus* concentração de copolímero, que é

igual a 0,38 (°C/%m) para o P-123 e 0,59 (°C/%m) para o F-127 (Hecht and Hoffmann 1995).

A formação da micela em meio aquoso, devido à autoagregação dos unímeros, é dirigida por uma redução na energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ), ou seja, é um processo termodinamicamente favorável (Kwon 2003). Contudo a micelização de copolímeros anfifílicos é inerentemente mais complexa do que a micelização de agentes surfactantes convencionais de baixo peso molecular (Alexandridis and Alan Hatton 1995). Estudos revelaram que a transferência de um unímero da solução para a micela é um processo entalpicamente desfavorável, ou seja, com entalpia padrão ( $\Delta H^\circ$ ) de micelização positiva. Porém, como o processo é termodinamicamente favorável, tem-se que a transferência destes unímeros do meio aquoso para a micela é um processo entropicamente favorável, o que significa um valor positivo de entropia padrão ( $\Delta S^\circ$ ) de micelização. Desta forma, o fator  $T\Delta S^\circ$  é maior do que o  $\Delta H^\circ$ , resultando em um  $\Delta G^\circ < 0$  (Alexandridis and Alan Hatton 1995).

A visão tradicional de formação de micelas reside principalmente no efeito hidrofóbico (Ben-Naim 1980, Tanford 1980, Hiemenz 1986, Hunter 1987). Os unímeros em solução apresentam as unidades de PPO hidrofóbicas relativamente expostas às moléculas de água, que precisam de um alto grau de organização para solvatar um unímero em meio aquoso, o que conduz a uma redução na entropia padrão da vizinhança ( $\Delta S_{viz}^\circ$ ). Quando um unímero é transferido do meio aquoso para a micela, as moléculas de água se desorganizam e  $\Delta S_{viz}^\circ$  aumenta consideravelmente, de modo que supera a redução da entropia padrão do sistema ( $\Delta S^\circ$ ) causado pela autoagregação dos unímeros na formação da micela, levando assim, a uma entropia padrão global positiva. Como o  $\Delta H^\circ$  de micelização é positivo, o aumento da temperatura tende a conduzir a uma maior formação de micela, mostrando que a magnitude do efeito hidrofóbico tende a aumentar com o aumento da temperatura (Ben-Naim 1980). No entanto, Alexandridis verificou que tal explicação não leva em consideração a natureza específica dos copolímeros PEO-PPO-PEO (Alexandridis and Alan Hatton 1995).

Copolímeros do tipo PEO-PPO-PEO são relativamente menos hidrofóbicos quando apresentam alto teor de unidades de PEO, ou apresentam baixa massa molecular. Estes tendem a formar micelas em temperaturas maiores, tendo maiores valores de TMC. Isto foi explicado por Alexandridis *et al*, onde verificou que em altas temperaturas a água não solvata muito bem as unidades de PEO e PPO dos copolímeros

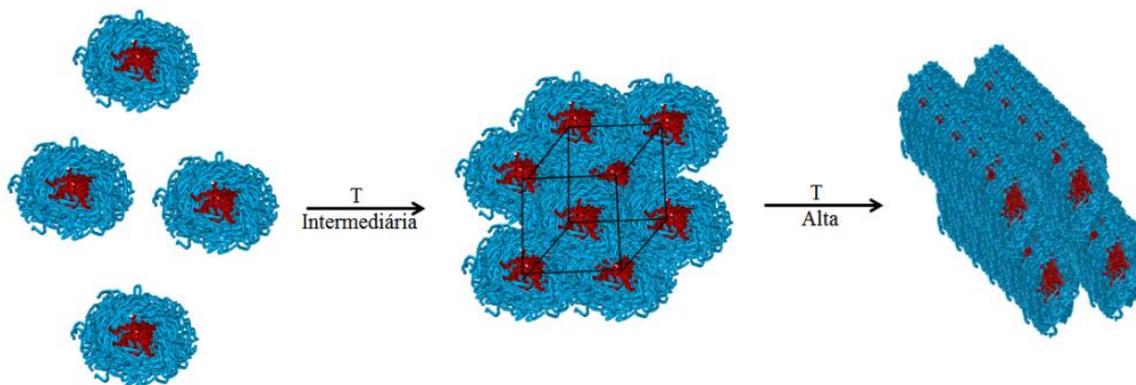
(Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994). Por outro lado, copolímeros de PEO-PPO-PEO com unidades de PEO com peso molecular constante e PPO com peso molecular variável, os valores de CMC (a uma dada temperatura) diminuem com o aumento do número de unidades de PPO, mostrando que copolímeros com alto teor de unidades de PPO, ou seja, mais hidrofóbico tendem a apresentarem menores valores de CMC e TMC.

Em meio aquoso a baixas temperaturas, moléculas de água formam uma camada de hidratação ao redor das moléculas de unímeros. No entanto, o aumento da temperatura promove quebra das ligações de hidrogênio da água com as cadeias de PEO e PPO. Tal fenômeno favorece, principalmente, as interações hidrofóbicas do polímero (PPO) e em determinados casos, dependendo da natureza hidrofóbica do copolímero e sua concentração no meio aquoso, pode-se ter a formação de gel em temperaturas muito elevadas. (Miller and Drabik 1984, Attwood, Collett *et al.* 1985).

Em baixas temperaturas, mas acima da TMC, tem-se uma solução com micelas simples com formato aproximadamente esférico de tamanho aproximadamente 10 – 100 nm (Goldmints, von Gottberg *et al.* 1997, Goldmints, Yu *et al.* 1999, Yang, Alexandridis *et al.* 2000). Contudo, o aumento da temperatura promove um comportamento dual no tamanho da micela. Um dos efeitos é a desidratação das unidades de PEO devido à quebra das ligações de hidrogênio entre moléculas de água e os grupos hidroxilas do PEO, conduzindo a uma redução do volume da micela (Miller and Drabik 1984, Attwood, Collett *et al.* 1985). O outro efeito é o aumento no número de agregação da micela, o que implica num aumento do volume da micela (Linse and Malmsten 1992). Alexandridis e Hatton relatam que estes dois efeitos opostos faz com que o raio hidrodinâmico das micelas de copolímeros de PEO-PPO-PEO permaneça quase que independente da temperatura (Alexandridis and Alan Hatton 1995).

O aumento de temperatura para valores muito acima da TMC pode causar efeitos drásticos no formato destes copolímeros no meio aquoso, como por exemplo, a formação de estruturas cúbicas e cilíndricas (Figura 5.1) quando a temperatura aumentar para valores muito acima da TMC (Fan, Degen *et al.* 2010). Estas estruturas são formadas devido à autoagregação de micelas esféricas, que ao expelirem água com o aumento da temperatura, expõe grupos hidrofóbicos de PPO ao meio aquoso que induzem a autoagregação micelar. A observação destes formatos tem sido reportada na literatura usando técnicas de espalhamento de luz, como DLS (Rassing and Attwood

1982, Zhou and Chu 1988, Yu, Deng et al. 1992), SANS, SAXS (Foster, Cosgrove et al. 2009, Hammouda 2010) e RMN (Rassing 1984).



**Figura 5.1.** Representação esquemática dos possíveis formatos dos copolímeros tribloco PEO-PPO-PEO.

Alguns estudos reportam que a força iônica, dependendo da concentração do eletrólito, não afeta de maneira significativa os valores de CMC e TMC (Mata, Majhi *et al.* 2005). Fan e colaboradores verificaram que quando se adiciona um eletrólito num sistema de micelas poliméricas, o meio torna-se mais iônico, como consequência, moléculas de unímeros tem maior dificuldade em permanecer solvatados no meio aquoso e com maior facilidade em serem transferidos deste meio para as micelas, proporcionando um aumento no número de agregação da mesma. No entanto, o raio da micela polimérica não muda significativamente, pois o aumento do raio no *core* é compensado pela diminuição do raio da *corona* (Fan, Degen *et al.* 2010). Além disso, Fan também verificou que a adição de eletrólito tende a contribuir com a desidratação das cadeias de PEO expelindo água de dentro da micela.

Desta forma, a presença de eletrólito em concentrações relativamente baixas, aparentemente não causaria mudanças significativas no tamanho das micelas de copolímeros (Fan, Degen *et al.* 2010) e nem nos valores de CMC e TMC (Mata, Majhi *et al.* 2005). As principais propriedades dos copolímeros P-123 e F-127 estão apresentadas na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.** Propriedades dos copolímeros P-123 e F-127 (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994, Wanka, Hoffmann *et al.* 1994).

<b>Copolímeros</b>	<b>P-123</b>	<b>F-127</b>
Proporção PEO/PPO	(EO) <sub>20</sub> (PO) <sub>70</sub> (EO) <sub>20</sub>	(EO) <sub>106</sub> (PO) <sub>70</sub> (EO) <sub>106</sub>
Porcentagem de PEO	30%	70%
Massa Molar	5.800 g mol <sup>-1</sup>	12.600 g mol <sup>-1</sup>
Nº de agregação (30,0 °C e 1%)	211	67
CMC (30,0 °C e 1 %)	9,0x10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>	8,0x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>
TMC (1%)	16,0 °C	24,0 °C
Viscosidade (cP)	350 (pasta a 60,0 °C)	3100 (sólido a 77,0 °C)
Tensão superficial (0,1%, 25,0°C)	34 dyn cm <sup>-1</sup>	41 dyn cm <sup>-1</sup>

A complexidade da nanoestrutura de micelas copoliméricas e os efeitos complexos causados na dinâmica molecular, em meio aquoso, das mesmas com a variação da temperatura, torna este sistema particularmente interessante de ser estudado. Porquanto, a melhor compreensão de tal sistema tende melhorar e ampliar a aplicabilidade destes copolímeros nos diversos setores industriais.

A avaliação do efeito da temperatura sobre o comportamento molecular de copolímeros, em meio aquoso, envolvendo técnicas de espalhamento de luz como DLS, SANS, SAXS e RMN, têm sido amplamente exploradas na literatura, como mencionado. Contudo, não há registro empregando-se técnicas eletroquímicas, que é versátil, de baixo custo, relativamente sensível e de fácil operação e interpretação. Tendo em vista que os copolímeros não apresentam propriedades eletroquímicas, utilizou-se o azul de ortotoluidina (AO) como sonda eletroquímica catiônica e relativamente hidrofílica.

Desta forma, neste Capítulo, avaliou-se o efeito da temperatura sobre o processo de autoagregação dos copolímeros de P-123 e F-127, determinando a TMC e os parâmetros termodinâmicos de ligação entre as micelas copoliméricas e o AO, abaixo e acima da TMC, empregando pela primeira vez voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD).

## 5.2 MATERIAIS E METODOLOGIA

### 5.2.1 Materiais

O AO foi obtido da Nuclear com grau de pureza acima de 97%. O cloreto de potássio (KCl) foi obtido da Merck com grau de pureza acima de 98%. Os Pluronic® P-123 e F-127 foram obtidos da Aldrich, com grau de pureza acima de 99%. A água empregada para o prepara de todas as soluções estoques e de trabalho foi água Milli-Q. O etanol empregado para a produção dos formulados foi de grau PA.

### 5.2.2 Metodologia

#### 5.2.2.1 Preparo das soluções e formulados

A solução estoque do AO foi preparada com a introdução de KCl fornecendo uma concentração de  $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para o AO e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para o KCl. A solução de AO foi padronizada utilizando espectrofotômetro UV-Vis usando a lei de Beer e o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) em água que é  $3,04 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  (Braga 2014). As soluções estoques foram guardadas ao abrigo da luz. Antes do uso das soluções estoques, uma padronização foi realizada para certificar-se do valor correto da concentração. No processo de incorporação do AO (confeção dos formulados) via método da dispersão sólida (Figura 4.5) (Zhang, Jackson et al. 1996, van Nostrum 2004) a agitação assim como o controle de temperatura ( $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foi feito no banho do tipo Dubnoff com agitação MA-093, Marconi Ltda. Assim, nos formulados, obteve-se 8% (m/v) de copolímeros,  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO. Para a estimativa das constantes de ligação, as soluções estoque de P-123 e F-127 foram de 14 % (m/v). Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se os Pluronic® em solução aquosa de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , deixadas em repouso por 24 horas e agitadas usando Ultrason.

#### 5.2.2.2 Avaliação do efeito da temperatura sobre os copolímeros

Para realizar esta avaliação, formulados de AO/P-123 e AO/F-123 foram preparados com 8% de copolímero,  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Foi empregada a técnica de Voltametria cíclica (VC) e Voltametria de pulso diferencial (VPD). As medidas foram realizadas somente depois de 5 minutos após a estabilização da temperatura.

### 5.2.2.3 Voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD)

As medidas de VC foram realizadas introduzindo 6,0 mL do formulado na cela eletroquímica. Para a VC empregou-se a velocidade de varredura ( $v$ ) de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e para a VPD um tempo de modulação ( $t_m$ ) de 0,1 s. Antes de realizar as medidas borbulhou-se  $\text{N}_2$  por 15 minutos na solução para remover  $\text{O}_2$  do meio aquoso. O eletrodo de trabalho foi limpo por polimento empregando-se alumina.

### 5.2.2.4 Estimativa dos coeficientes de difusão aparente

Para estimar os coeficientes de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) empregou-se a técnica de VDP. Variou-se o tempo de modulação ( $t_m$ ) para a obtenção dos voltamogramas, onde plotou-se um gráfico de  $i_p$  versus  $(t_m)^{-1/2}$ , onde através da reta pode-se extrair o coeficiente angular e empregando a Equação 2.3 para VPD (A. J. Bard 1980, Brett 1996), estimou-se os valores de  $D_{ap}$ .

### 5.2.2.5 Determinações das constantes de ligação

Uma alíquota da solução estoque de AO em KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionado a uma solução aquosa de KCl totalizando 6,0 mL e  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO na célula eletroquímica. Depois de estabilizar a temperatura na cela, a solução foi desairada por 15 minutos e em seguida titulada com pequenas alíquotas de solução estoque de P-123 e F-127 ambas a 14%. Após cada adição de Pluronic®, agitou-se o meio e borbulho  $\text{N}_2$  por aproximadamente 5 minutos. As intensidades de corrente foram monitoradas empregando VPD e corrigidas em função da diluição do meio. Os valores de corrente em função da concentração do copolímero fornece uma isoterma de ligação entre o AO e o copolímero, onde a Equação 4.1 permite fazer um ajuste teórico com os pontos experimentais obtidos (Enache, Bulcu et al. 2007, Toader and Volanschi 2007).

### 5.2.2.6 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos de ligação

As constantes de ligação foram determinadas de acordo com o procedimento 4.2.2 para as temperaturas de 5, 15, 25, 35, 45, 55 e  $65^\circ\text{C}$ , e os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ) foram estimados empregando as Equações 4.2, 5.1, 5.2 (De, Bhattacharya *et al.* 2010) e 5.3 abaixo:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad \text{Equação 5.1}$$

$$\frac{\partial(\Delta G^\circ/T)}{\partial(1/T)} = \Delta H^\circ = a - cT^2 \quad \text{Equação 5.2}$$

$$\Delta S^\circ = \frac{(\Delta H^\circ - \Delta G^\circ)}{T} \quad \text{Equação 5.3}$$

Sendo que  $a$  e  $c$ , na Equação 5.2, são coeficientes extraídos através de um ajuste polinomial parabólico.

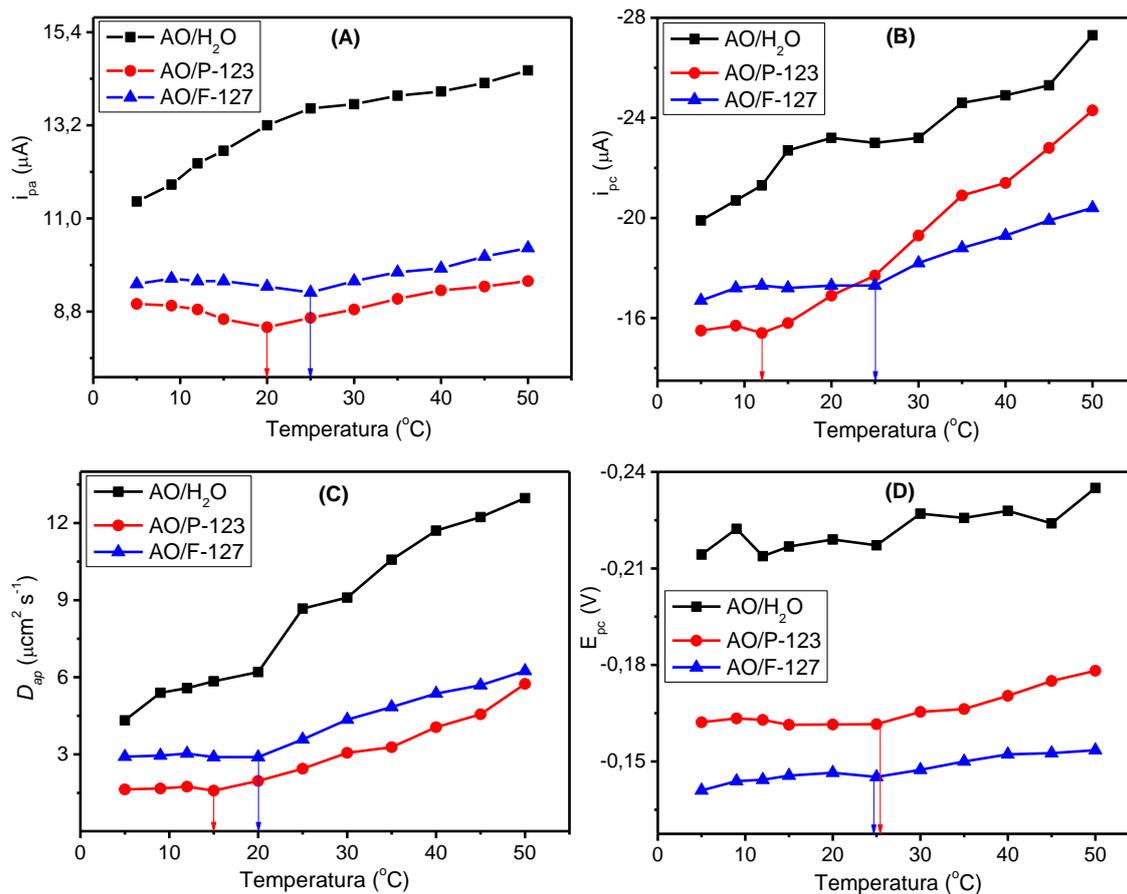
## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Avaliação do efeito da temperatura

Micelas copoliméricas são consideradas termosensíveis, ou seja, além de terem uma CMC, tem-se uma temperatura micelar crítica (TMC). Desta forma, a micela se forma apenas a partir de uma dada temperatura e concentração crítica. É conhecido que a CMC diminui com o aumento da temperatura devido às interações mais desfavoráveis entre moléculas de água e cadeias de copolímero (Zhou and Chu 1988, Reddy, Fordham *et al.* 1990, Brown, Schillen *et al.* 1991, Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994).

Para a avaliação do efeito da temperatura sobre os copolímeros P-123 e F-127, estes foram formuladas com o AO, com intuito de incorporar a sonda eletroquímica, e assim, avaliar as mudança nas propriedades físico-químicas, eletroquímicas e compreender o efeito da temperatura nas micelas de P-123 e F-127. Assim, empregaram-se as técnicas eletroquímicas de Voltametria cíclica (VC) e Voltametria de pulso diferencial (VPD).

Na Figura 5.2, segue a variação da corrente pelo método VC e VPD, do potencial catódico e coeficiente de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) pelo método VPD em função da temperatura. No caso do gráfico de  $D_{ap}$  em função da temperatura, os  $D_{ap}$  foram estimados empregando-se a Equação 2.3, fazendo-se  $i_{pc}$  em função de  $1/(t_m)^{1/2}$ .



**Figura 5.2.** Efeito da temperatura sobre os sistema AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímero (8%) formulados,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Para VC,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e VPD,  $t_m = 0,1 \text{ s}$ . **A)** VC,  $i_{pa}$  versus Temperatura. **B)** VPD,  $i_{pc}$  versus Temperatura. **C)** VPD,  $D_{ap}$  versus Temperatura. **D)** VPD,  $E_{1/2}$  versus Temperatura.

As Figuras acima mostram uma mudança no regime da variação das propriedades eletroquímicas na faixa de temperatura de  $12,0 - 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $18,0$  e  $23,8 \text{ }^\circ\text{C}$  para os sistemas P-123/AO e F-127/AO, respectivamente. Esta região possivelmente é devido a região da TMC para P-123 e F-127 tendo o AO como sonda eletroquímica. Os valores de TMC nas diferentes propriedades e métodos eletroquímicos podem ser melhores visualizados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2.** Valores de TMC para os copolímeros (8%) com AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

TMC (°C)		
Técnicas	P-123	F-127
VPD ( $i_{pc} \times T$ )	12,0	25,0
VPD ( $D_{ap} \times T$ )	15,0	20,0
VPD ( $E_{pc} \times T$ )	25,0	25,0
VC ( $i_{pa} \times T$ )	20,0	25,0
DSC*	16,0	24,0

\*Nas condições de 1% de copolímero sem KCl (Alexandridis, Holzwarth et al. 1994).

Verifica-se uma concordância dos valores da TMC determinados pelos métodos eletroquímicos em relação aos valores encontrados por Alexandridis e Wanka, em condições experimentais semelhantes, empregando o método de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Contudo, dentre os métodos eletroquímicos, o método de VPD, avaliando o  $D_{ap}$  e  $i_{pc}$  em função da temperatura, foi o que obteve-se maiores variações nas propriedades e valores de TMC mais próximos ao da literatura. Esta maior variação na propriedade em função da temperatura, contribui para minimizar erros experimentais, fornecendo resultados mais reais. Portanto, fica constatada a viabilidade na determinação da TMC de copolímeros empregando métodos eletroquímicos.

Estas mudanças no regime da variação na propriedade eletroquímica indicam uma mudança de interação entre as moléculas de copolímero e a sonda eletroquímica. Abaixo da TMC as moléculas de AO estariam interagindo com as moléculas de água e os unímeros, enquanto que acima da TMC, a interação seria preferencialmente com as micelas.

Avaliando as correntes de picos anódicos ( $i_{pa}$ ) e catódico ( $i_{pc}$ ) pelo método de VC e VPD, respectivamente, verifica-se que em baixas temperaturas a corrente é baixa e varia muito pouco com a temperatura. A baixa corrente é devido à concentração reduzida de AO na superfície do ET, que esta relacionada a dois fatores: *i*) diminuição da solubilidade do AO, aumentando a quantidade de autoagregados e agregados maiores e, portanto diminuindo o  $D_{ap}$  e *ii*) interação das moléculas de AO com unímeros, e consequentemente, também contribuindo para reduzir o  $D_{ap}$ . Estes fatores são perfeitamente plausíveis, tendo em vista que os resultados das Figuras 5.2A, B e C,

mostram que a  $i_{pa}$ ,  $i_{pc}$  e  $D_{ap}$  do AO diminuem com a diminuição da temperatura e que tais parâmetros são menores em meio de copolímeros em relação ao meio aquoso. Além disso, estes resultados sugerem que, em baixa temperatura, não há variação significativa do coeficiente de difusão aparente ( $D_{ap}$ ) nem da constante de velocidade de reação de superfície ( $k_s$ ), que são parâmetros que limitam a corrente observada.

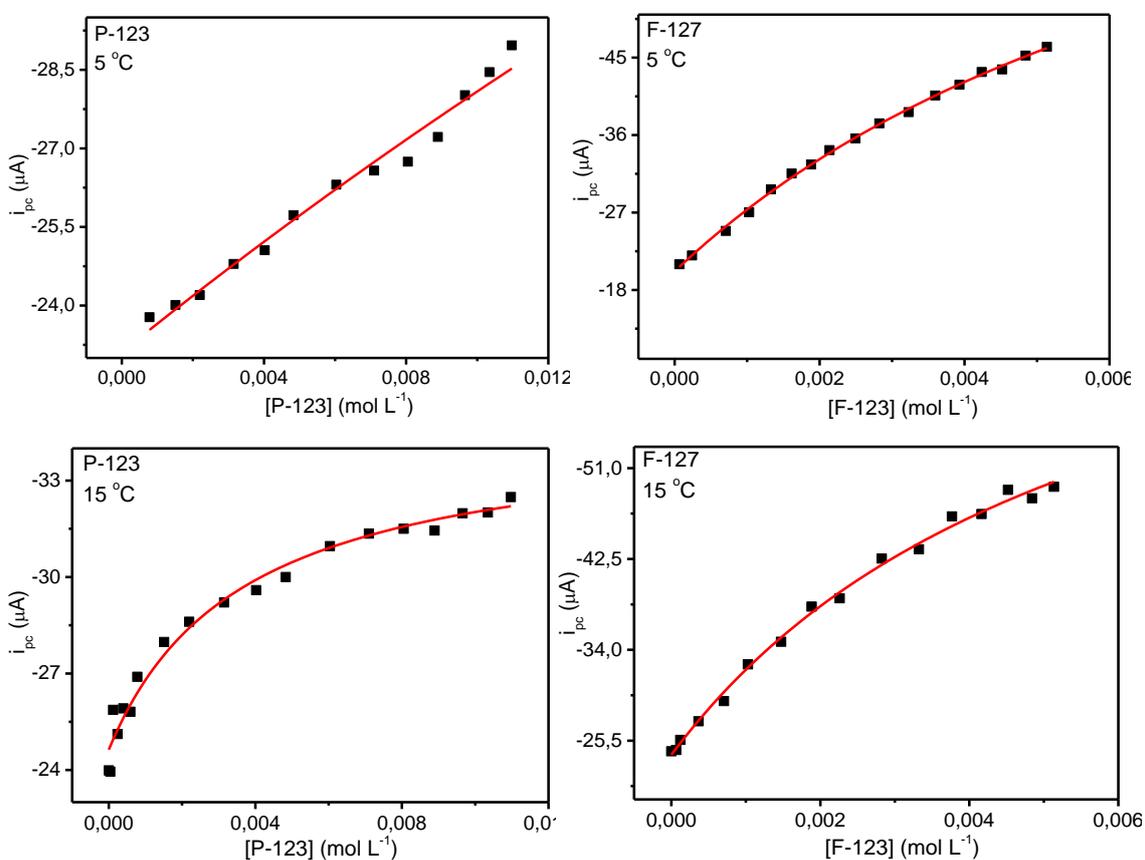
Em altas temperaturas, após a TMC (ponto de inflexão), observa-se um aumento gradativo na corrente da sonda (Figuras 5.2A e B), indicando um aumento na concentração do AO na superfície do ET. Este aumento da concentração está relacionado com o aumento do  $D_{ap}$ , visualizado na Figura 5.2C. Neste caso, novamente foi possível observar um ponto de inflexão na variação do  $D_{ap}$  em função da temperatura.

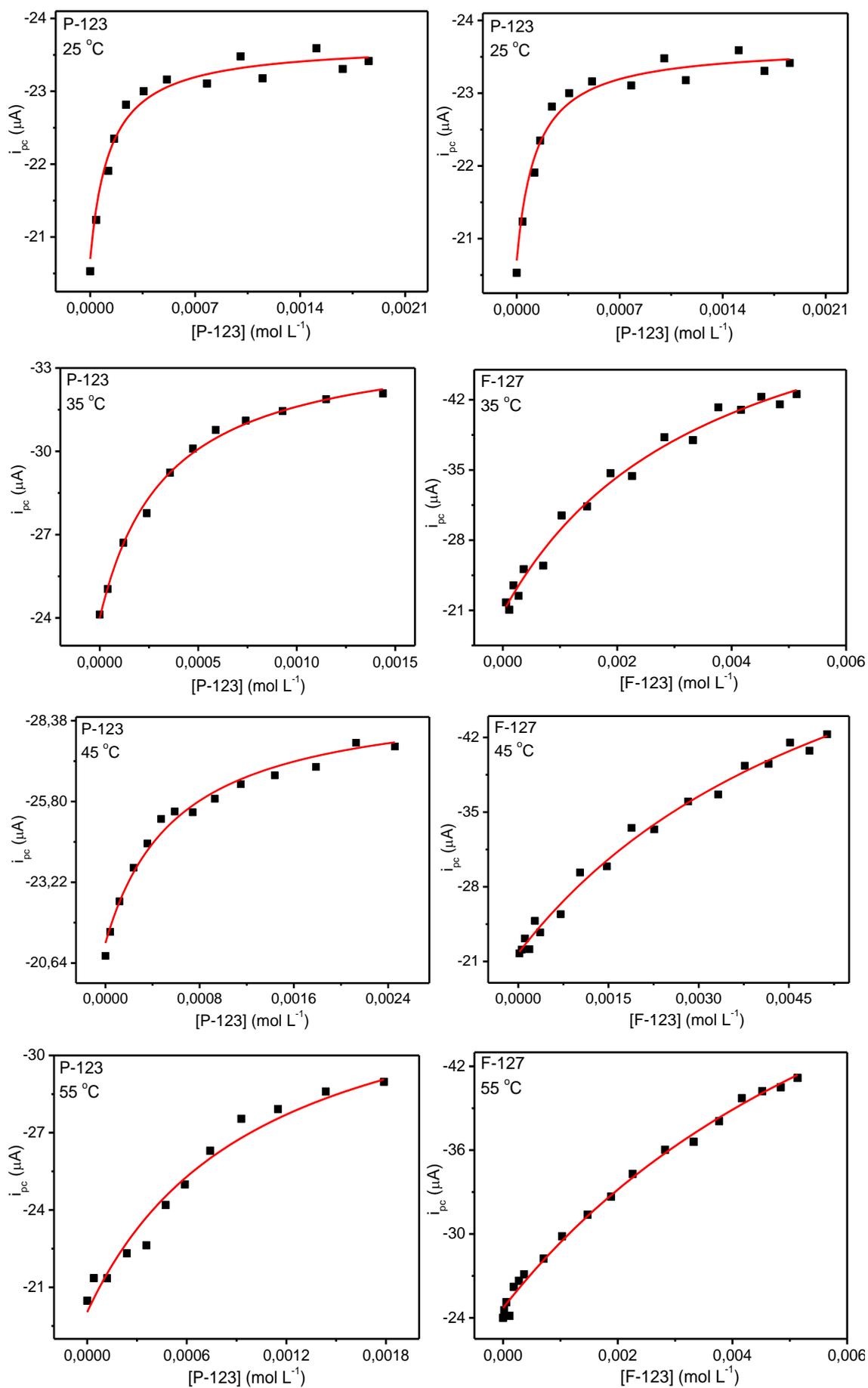
Nas técnicas eletroquímicas, o coeficiente de difusão é avaliado através de uma sonda eletroquímica (AO) que chega até a superfície do ET, predominantemente por difusão devido ao gradiente de concentração de AO, de diversas formas, sendo elas: livre, autoagregado, ligado a unímeros e incorporado na micela, como proposto pela Equação 4.3. Sendo assim, o aumento constante no  $D_{ap}$  com a temperatura, pode ter contribuição predominante do aumento do movimento Browniano, ou seja, aumenta a velocidade de reposição de moléculas de AO, em todas as formas, na superfície do ET.

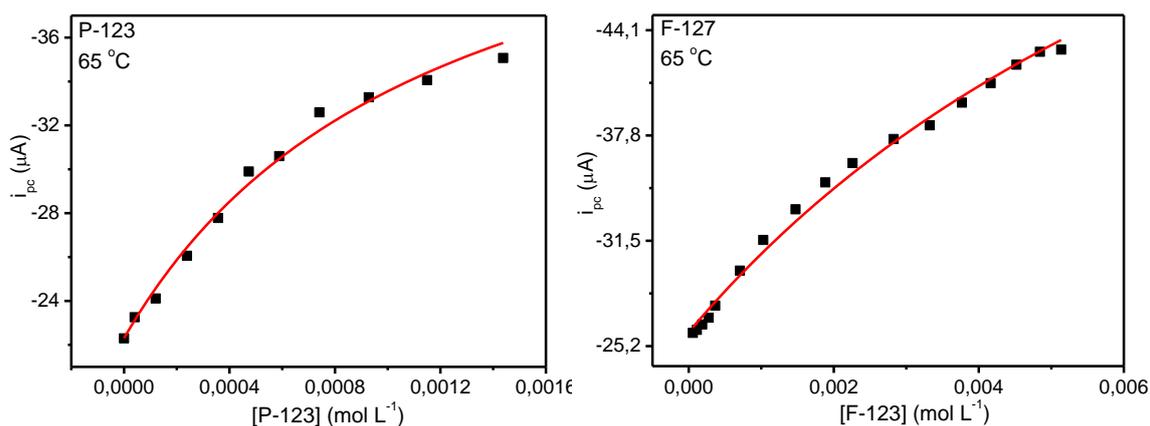
Na variação do  $E_{pc}$  com a temperatura, Figura 5.2D, observou-se também uma região de inflexão nas proximidades da TMC. O  $E_{pc}$  pouco varia em baixas temperaturas, indicando uma interação no mesmo ambiente químico até o ponto de inflexão. Depois da TMC, o ambiente químico começa a mudar, ou seja, o  $E_{pc}$  torna-se menos positivo à medida que a temperatura aumenta. Este resultado mostra que o AO tem maior dificuldade de reduzir com o aumento da temperatura. Vimos no Capítulo 4 que o AO formulado em P-123 e F-127 reduz mais facilmente em comparação ao AO em meio aquoso devido a maior estabilização da forma reduzida (Figura 4.5), mais hidrofílica, pelos grupos de PEO destes surfactantes. Desta forma, o processo de desidratação das cadeias de PEO e conseqüentemente a exposição das cadeias hidrofóbicas de PPO com o aumento da temperatura, pode contribuir para diminuir a estabilização da forma reduzida do AO incorporado na micela copolimérica.

### 5.3.2 Estimativas dos parâmetros termodinâmicos

A fim de compreender melhor a interação do AO abaixo e acima da TMC foram estimados os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$ ). Para estimar tais parâmetros, primeiramente determinaram-se as constantes de ligação em várias temperaturas (5,0 a 65,0 °C) pelo método de VPD, obtendo-se as isotermas abaixo para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127, Figura 5.3. Deve-se lembrar de que para este experimento não houve o preparo de formulados. Alíquotas de uma solução estoque com 14% (m/V) de copolímero, foram adicionados diretamente a solução aquosa de AO com KCl, 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Desta forma, avalia-se uma ligação mais superficial nas micelas de copolímeros.







**Figura 5.3.** Curvas de variação da corrente catódica do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em função da [copolímero], ajustada pela Equação 4.1, em várias temperaturas,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $t_m = 0,1 \text{ s}$ .

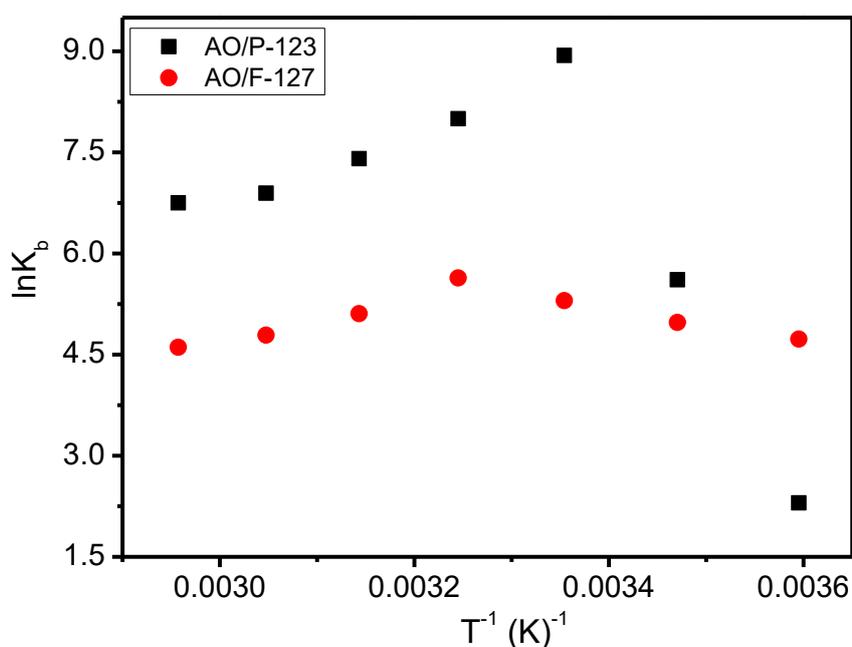
É importante frisar, que a curvatura do ajuste teórico com os pontos experimentais refletem a intensidade da ligação do AO com as micelas de copolímeros. Assim, pequena curvatura reflete em ligação fraca, e grande curvatura ligação forte. A Figura 5.3 mostra um efeito interessante nas isotermas de ligação para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127. Verifica-se que em baixas temperaturas, em especial abaixo da TMC, há preferência de moléculas de AO em ligarem-se aos copolímeros na forma de unímeros ao invés de ficarem solvatados por moléculas de água no meio aquoso, pois os valores de  $K_b$  foram maiores que 1, Tabela 5.3. Contudo, esta ligação é relativamente fraca, mas tende a aumentar com o aumento da temperatura até chegar às proximidades da TMC, onde depois deste ponto a curvatura começa a diminuir, indicando que a ligação começa enfraquecer com o aumento da temperatura. Este fenômeno pode ser visualizado com os valores de constante de ligação ( $K_b$ ) e variação da energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ), Tabela 5.3.

Na Tabela 5.3 verifica-se claramente que a ligação do AO em ambas as micelas tende a aumentar até um máximo e em seguida diminuir. O aumento da ligação esta relacionado com o aumento da interação AO/copolímeros à medida que agregados pré-micelares cada vez maiores se formam até a formação da micela. Alexandridis verificou que a entalpia padrão ( $\Delta H^\circ$ ) de micelização é positiva, contudo o termo  $-T\Delta S^\circ$  é muito negativo, o que conduz a um processo espontâneo (Alexandridis and Alan Hatton 1995). Desta forma, o aumento da temperatura desloca o equilíbrio dinâmico unímero/micela para o lado de formação de mais micelas, e assim uma maior interação com o AO.

**Tabela 5.3.** Valores de constante de ligação ( $K_b$ ) e variação da energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ) em várias temperaturas,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e  $t_m = 0,1 \text{ s}$ .

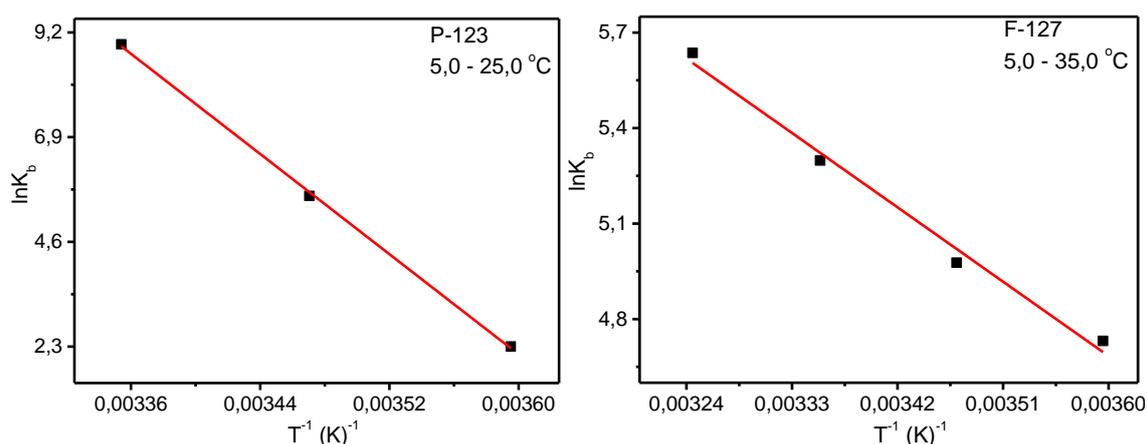
Sistema:	AO/P-123		AO/F-127	
Temp. ( $^\circ\text{C}$ )	$K_b$ ( $\text{mol}^{-1} \text{ L}$ )	$\Delta G^\circ$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$K_b$ ( $\text{mol}^{-1} \text{ L}$ )	$\Delta G^\circ$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
5	$9,99 \pm 0,90$	-5,32	$113 \pm 11$	-10,94
15	$273 \pm 14$	-13,44	$145 \pm 2$	-11,92
25	$7.610 \pm 708$	-22,15	$199 \pm 3$	-13,13
35	$2.990 \pm 88$	-20,50	$280 \pm 9$	-14,44
45	$1.650 \pm 74$	-19,59	$165 \pm 4$	-13,51
55	$987 \pm 55$	-18,81	$120 \pm 2$	-13,06
65	$855 \pm 25$	-18,98	$100 \pm 2$	-12,95

Depois da região da TMC, o aumento da temperatura promove uma desestabilização do sistema, observado pela diminuição da constante de ligação e consequentemente dos valores menos negativos de  $\Delta G^\circ$ , Tabela 5.3. Para compreender melhor os valores encontrados na Tabela acima, aplicou-se o plot de van't Hoff (Equação 5.1), Figura 5.4.



**Figura 5.4.** Plot de van't Hoff para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros.

Verificam-se na Figura 5.4 dois comportamentos termodinâmicos distintos, antes e depois da TMC dos copolímeros. Antes da TMC um perfil de  $\Delta H^\circ > 0$ , região aproximadamente linear de inclinação negativa, e depois da TMC uma região não linear. A região linear pode ser ajustada empregando o modelo de van't Hoff, Figura 5.5.

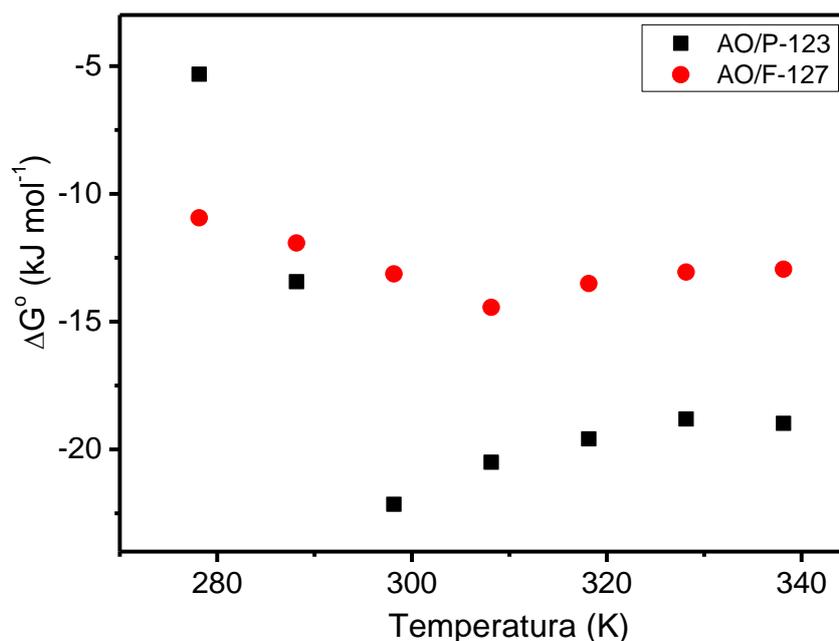


**Figura 5.5.** Plot de van't Hoff para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros.

Verifica-se um comportamento relativamente linear nas faixas de temperatura de 5,0 a 25,0 °C para AO/P-123 e 5,0 a 35,0 °C para AO/F-127. O modelo de van't Hoff assume que os valores  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são constantes na faixa de temperatura investigada. Assim, aplicando a Equação 5.1, por meio dos coeficientes angulares e lineares foram extraídos os valores  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , respectivamente. Tais valores estão apresentados na Tabela 5.4.

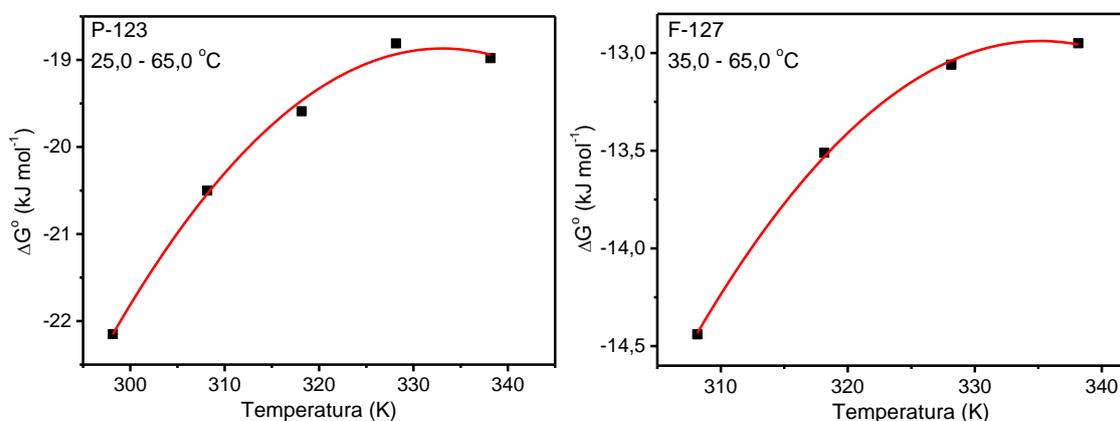
Na região acima da TMC não é possível aplicar o modelo de van't Hoff, pois é uma região não linear. Neste caso, deve se empregar a metodologia proposta por Bhattacharya *et al*, que faz um ajuste dos pontos experimentais de  $\Delta G^\circ$  versus T utilizando uma equação polinomial de segunda ordem (De, Bhattacharya *et al.* 2010), Equação 5.2.

A Figura 5.6 mostra claramente uma região não linear depois da TMC dos copolímeros, onde a metodologia citada acima deve ser aplicada. A Região aproximadamente linear confirma que os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são constantes nesta região, em concordância com a Equação termodinâmica  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$  e passível de empregar o modelo de van't Hoff.



**Figura 5.6.** Plot de  $\Delta G^\circ$  versus T para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros.

Na Figura 5.7, têm-se os ajustes não lineares de  $\Delta G^\circ$  versus T aplicados a região não linear.



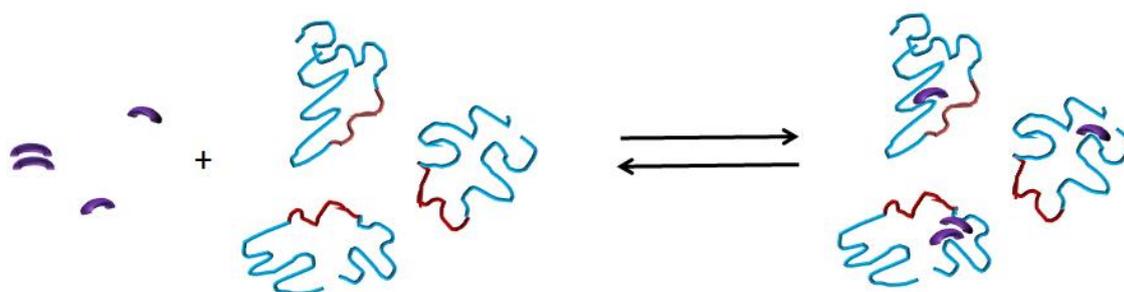
**Figura 5.7.** Plot de  $\Delta G^\circ$  versus T para os sistemas AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/copolímeros.

Na Figura 5.7 se verifica um bom ajuste aplicando-se a Equação 5.2 da metodologia de Bhattacharya. Esta metodologia assume que os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são dependentes da temperatura (De, Bhattacharya *et al.* 2010). Os valores de  $\Delta S^\circ$  foram determinados aplicando a Equação 5.3, e se encontram na Tabela 5.4 juntamente com os valores de  $\Delta G^\circ$  e  $\Delta H^\circ$ .

**Tabela 5.4.** Parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ) em várias temperaturas, 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127.

Sistema:	AO/P-123			AO/F-127		
Temp. (°C)	$\Delta G^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
5	-5,32	+228,68	+840,96	-10,94	+21,58	+116,62
15	-13,44	+228,68	+840,96	-11,92	+21,58	+116,62
25	-22,15	-78,48	-188,93	-13,13	+21,58	+116,62
35	-20,50	-62,15	-135,16	-14,44	-48,55	-110,69
45	-19,59	-45,30	-80,81	-13,51	-35,71	-69,78
55	-18,81	-27,92	-27,76	-13,06	-22,46	-28,65
65	-18,98	-9,99	+26,58	-12,95	-8,80	+12,27

Observa-se na Tabela 5.4, que para ambos os sistemas em baixas temperaturas, em especial abaixo da TMC, os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são independentes da temperatura. Como abaixo da TMC, tem-se predominantemente unímeros, o equilíbrio avaliado é entre moléculas de AO livre e agregadas com unímeros, como pode ser visualizado na Figura 5.8.



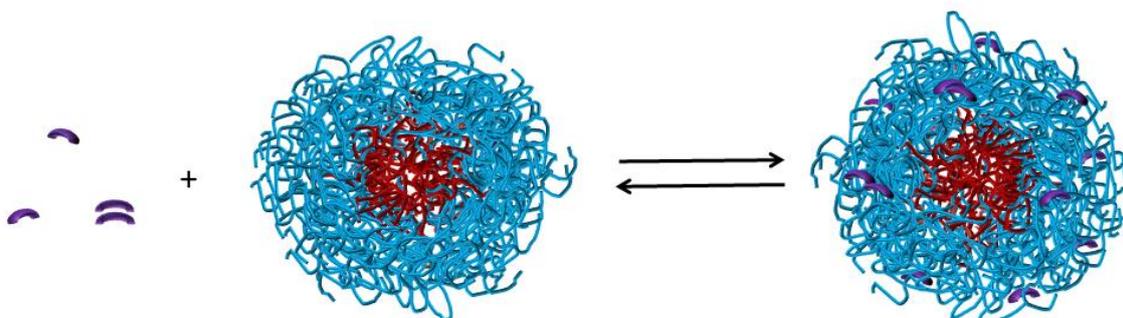
**Figura 5.8.** Representação do equilíbrio do AO ligado a unímeros, abaixo da TMC.

Os valores de  $\Delta G^\circ$  mostram que a associação de moléculas de AO a unímeros é um processo espontâneo, ou seja, moléculas de AO preferem ligarem-se a unímeros ao invés de solvatadas por moléculas de água. Os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  mostram que esta associação é dominada pela entropia, ou seja, mesmo as moléculas de água estabilizando mais o AO livre, pois  $\Delta H^\circ > 0$ , a elevada variação na entropia ( $\Delta S^\circ \gg 0$ ) torna a associação do AO a unímeros um processo termodinamicamente favorável. Esta

grande variação na entropia ocorre devido a maior estruturação de moléculas de água ao redor dos unímeros sozinhos em comparação aos unímeros ligados a moléculas de AO. Assim, pode-se dizer que a interação de moléculas de AO a unímeros quebra o elevado grau de estruturação de moléculas de água ao redor dos unímeros. Isto ocorre provavelmente porque moléculas de AO podem contribuir para redução da hidrofobicidade dos copolímeros no complexo AO/unímero. Comparativamente, a desorganização é maior para o sistema AO/P-123 ( $\Delta S^\circ = 840,96 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), sugerindo que as moléculas de água se organizam muito mais ao redor dos unímeros de P-123 do que nos unímero de F-127 ( $\Delta S^\circ = 116,62 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), isto ocorre possivelmente devido ao maior caráter hidrofóbico dos unímeros de P-123.

Os valores de  $\Delta H^\circ$  aproximadamente 10 vezes maiores para o sistema AO/P-123 ( $\Delta H^\circ = 228,68 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) em comparação ao sistema AO/F-127 ( $\Delta H^\circ = 21,58 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), sugerem uma maior estabilização energética neste último. Contudo, devido ao fator entrópico que é maior para o AO/P-123, a ligação do AO a unímeros de P-123 é um processo mais favorável, com exceção da temperatura de  $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , onde se verificou uma constante de ligação muito baixa para o AO/P-123, Tabela 5.3.

Curiosamente, entre  $25,0 - 55,0 \text{ }^\circ\text{C}$  para o AO/P-123 e  $35,0 - 55,0 \text{ }^\circ\text{C}$  para o AO/P-123, ocorre uma inversão nos sinais dos parâmetros  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , ou seja, a ligação de moléculas de AO aos copolímeros continua sendo espontânea, mas agora governada pela entalpia. Esta inversão provavelmente esta relacionada com a formação das micelas de P-123 e F-127 a  $15,0$  e  $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, valores de TMC encontrados pelo método VPD ( $D_{ap} \times T$ ). Sendo assim, acima da TMC moléculas de AO ligam-se a unímeros e, predominantemente a micelas de copolímeros no meio, de forma que o equilíbrio a ser avaliado pode ser representado pela Figura 5.9.



**Figura 5.9.** Representação do equilíbrio do AO ligado a micela.

Valores de entalpias negativas indicam que o aumento da temperatura desfavorece a ligação de moléculas de AO aos copolímeros, pois neste caso tem-se  $\Delta H^\circ < 0$ , justificando a diminuição de  $K_b$  (Tabela 5.3) com o aumento da temperatura acima da TMC. Além disso, mostram que moléculas de AO, agora são energeticamente estabilizadas quando ligadas aos copolímeros, ou seja, preferem interagir com copolímeros a permanecerem solvatadas por moléculas de água. Já os valores  $\Delta S^\circ < 0$ , mostram que a associação de moléculas de AO aos copolímeros levam a uma maior organização intramicelar para acomodar moléculas de AO, que provavelmente prevalece em relação a qualquer outro efeito entrópico contrário. Esta organização do sistema AO/micela possivelmente esta relacionado com a desidratação e aumento no número de agregação das micelas que ocorre com o aumento da temperatura.

À medida que a temperatura aumenta, acima da TMC, verifica-se uma pequena diminuição da estabilização de moléculas de AO com copolímeros, devido aos valores de  $\Delta H^\circ$  que tornam-se menos negativos. Isto ocorre pois a agitação das moléculas prejudica as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio existentes entre estas espécies. Em relação à variação da entropia, observa-se que a mesma aumenta com o aumento da temperatura acima da TMC, ou seja, fica menos negativa, Tabela 5.4. Isto acontece provavelmente devido ao maior número de graus de liberdade das moléculas de água, AO e das cadeias dos copolímeros com o aumento da temperatura. Assim vemos que, acima da TMC a desidratação e o aumento do número de agregação da micela, que ocorre com o aumento da temperatura, devem contribuir para a diminuição da estabilidade do AO ligado aos copolímeros e contribui para deixar mais desorganizado, como pode ser visualizada nas tendências de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , Tabela 5.4.

Quando a temperatura chega ao extremo de 65,0 °C, o sistema passa a ter uma variação positiva na entropia novamente. Isto ocorre possivelmente devido ao elevado aumento dos graus de liberdade das moléculas de água, AO e cadeias poliméricas. Contudo, o fato de ser o último ponto experimental, pode haver limitações do modelo empregado.

Comparando os sistemas acima da TMC, observa-se uma maior estabilização de moléculas de AO nos copolímeros de P-123, devido aos valores mais negativos de  $\Delta H^\circ$ , praticamente em todas as temperaturas. Este resultado mostra que moléculas de AO interagem mais efetivamente com copolímeros de P-123, provavelmente devido ao

menor efeito de blindagem causado pela água de hidratação presente nos grupos PEO do P-123, que é um copolímero mais hidrofóbico em comparação ao F-127.

Finalmente, os parâmetros termodinâmicos encontrados para os sistemas em questão, mostram um comportamento termodinâmico peculiar, pois uma inversão nos sinais dos parâmetros termodinâmicos foi constatada. Este fato não tem sido comum na literatura envolvendo micelas de copolímeros, que tem reportado valores de  $\Delta H^\circ > 0$  e  $\Delta S^\circ > 0$ , para P-123, F-127 e outros copolímeros, num intervalo de temperatura semelhante ao estudado (Alexandridis and Alan Hatton 1995, Alexandridis, Nivaggioli *et al.* 1995, Bohorquez, Koch *et al.* 1999, Fan, Degen *et al.* 2010, Dutra, Ribeiro *et al.* 2015). Este comportamento pode ser atribuído à natureza específica da interação entre moléculas de AO e os copolímeros P-123 e F-127, na forma de unímeros e/ou micelas.

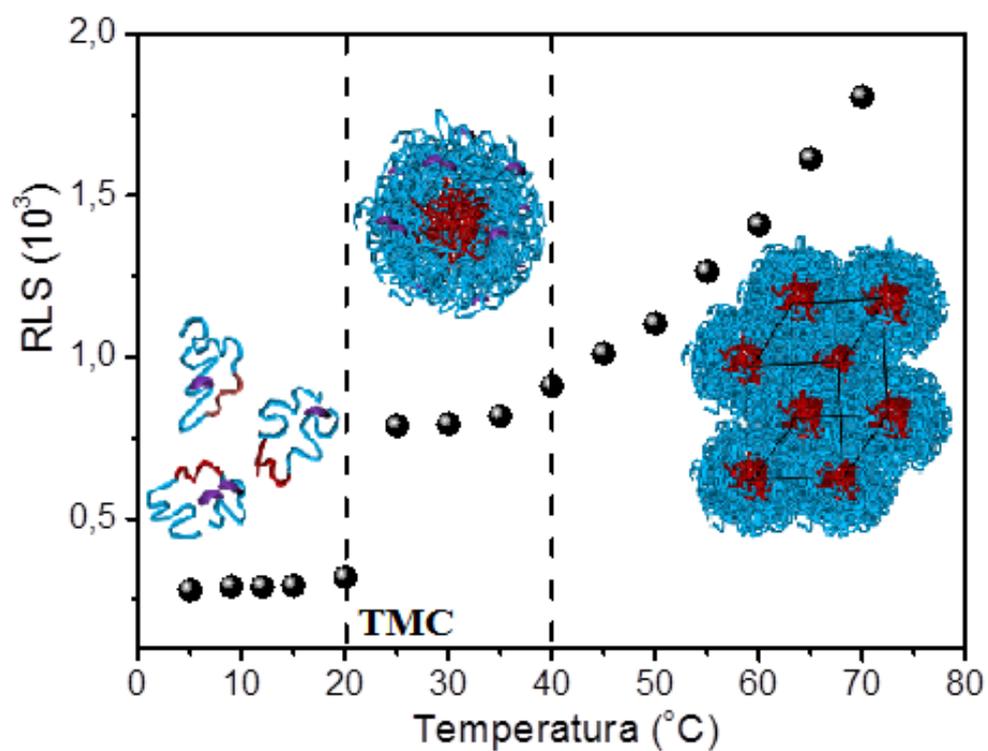
#### 5.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Foi possível observar dois regimes de variação nas propriedades eletroquímicas onde o ponto de inflexão mostrou ser a TMC dos copolímeros. Os valores de TMC concordaram com os valores encontrados na literatura empregando outros métodos. Abaixo da TMC, há unímeros ou pré-agregados micelares pequenos onde moléculas de AO estão interagindo na forma monomérica e/ou agregada. A avaliação do coeficiente de difusão aparente em função da temperatura pelo método eletroquímico, aparentemente é dominada efeito do movimento Browniano na solução, especialmente em temperaturas acima da TMC. Métodos eletroquímicos são viáveis na investigação do efeito da temperatura, assim como são apropriados para determinar a TMC dos copolímeros empregando sonda eletroativa.

Têm-se dois comportamentos termodinâmicos de ligação do AO aos copolímeros P-123 e F-127, mostrando-se um sistema muito peculiar. Abaixo da TMC a formação da micela é entropicamente favorável enquanto que acima da TMC ocorre uma inversão nos parâmetros termodinâmicos de entalpia e entropia, e a espontaneidade passa a ser governada pela entalpia. De fato, moléculas de AO interage diferentemente com unímeros e micelas, assim como altera a organização molecular do meio acima e abaixo da TMC. A VPD se mostrou eficiente também para avaliação dos parâmetros termodinâmicos dos sistemas estudados.

# CAPÍTULO 6

## Estudo Fotofísico da Interação Fenotiazínico-Polaxamero: Implicações no Processo de Autoagregação de Copolímero Coloidal em Solução



## 6.1 INTRODUÇÃO

Os Pluronicos® P-123 e F-127 são dois copolímeros que tem sido extremamente explorado em formulações farmacêuticas como nanopartículas biotransportadoras de fármacos. Em geral, todos os Pluronicos® são termosensíveis e apresentam seu processo de agregação altamente dependente da temperatura (Prasad, Luong *et al.* 1979, Rassing, McKenna *et al.* 1984, Turro and Chung 1984), e numa dada concentração, formam micelas em uma temperatura micelar crítica (TMC). A TMC de copolímeros termosensíveis, tem apresentado grande valia para compreender o mecanismo de micelização de tais surfactantes.

A avaliação dos aspectos estruturais e dinâmicos destes copolímeros tem sido investigada por vários métodos, como por exemplo, calorimetria de varredura diferencial (DSC) (Alexandridis and Holzwarth 1997), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Mortensen and Talmon 1995, Lam, Grigorieff *et al.* 1999), viscosimetria (Glatter, Scherf *et al.* 1994, Hvidt, Joergensen *et al.* 1994), ressonância magnética nuclear (RMN) (Cau and Lacelle 1996, Ma, Guo *et al.* 2006, Ma, Guo *et al.* 2007), espalhamento de nêutrons de baixo angulo (SANS) (Sharma and Bhatia 2004, Mortensen, Batsberg *et al.* 2008), tensão superficial (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994, Wanka, Hoffmann *et al.* 1994), ressonância de spin eletrônico (ESR) (Degtyarev and Schlick 1999), infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) (Su, Liu *et al.* 2002, Su, Wang *et al.* 2002) e espectroscopia Raman (Guo, Wang *et al.* 1999). Contudo, os métodos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Alexandridis, Nivaggioli *et al.* 1995, Jørgensen, Hvidt *et al.* 1997, Bohorquez, Koch *et al.* 1999), absorção de UV-Vis com sondas selecionadas (Lopes and Loh 1998) e fluorescência, onde a sonda empregada é o DPH (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994) são mais difundidos devido ao baixo custo de equipamento e simplicidade na execução do experimento e análise dos resultados.

Uma nova maneira de avaliar a dependência da agregação com a temperatura e realizar a determinação da TMC, via técnicas eletroquímicas, foi explanada no Capítulo 5. Neste Capítulo, exploraremos os aspectos estruturais e dinâmicos do P-123 e F-127 com a variação da temperatura empregando as técnicas óticas tradicionais, tais como, UV-Vis, fluorescência e DLS. Além destas técnicas, a técnica de espalhamento de luz ressonante (RLS) e anisotropia de fluorescência, onde não há muito relato na literatura

e podem ser executadas por um fluorímetro, serão empregadas para ajudar na compreensão dos fenômenos dinâmicos e estruturais dos copolímeros.

## **6.2 MATERIAIS E METODOLOGIA**

### **6.2.1 Materiais**

O AO foi obtido da Nuclear com grau de pureza acima de 97%. O cloreto de potássio (KCl) foi obtido da Merck com grau de pureza acima de 98%. Os Pluronic® P-123 e F-127 foram obtidos da Aldrich, com grau de pureza acima de 99%. A água empregada para o prepara de todas as soluções estoques e de trabalho foi água Milli-Q. O etanol empregado para a produção dos formulados foi de grau PA.

### **6.2.2 Metodologia**

#### **6.2.2.1 Preparo das soluções e formulados**

A solução estoque do AO foi preparada com a introdução de KCl fornecendo uma concentração de  $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para o AO e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para o KCl. A solução de AO foi padronizada utilizando espectrofotômetro UV-Vis usando a lei de Beer e o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) em água que é  $3,04 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  (Braga 2014). As soluções estoques foram guardadas ao abrigo da luz. Antes do uso das soluções estoques, uma padronização foi realizada para certificar-se do valor correto da concentração. No processo de incorporação do AO (confeção dos formulados) via método da dispersão sólida (Figura 4.14) (Zhang, Jackson et al. 1996, van Nostrum 2004) a agitação assim como o controle de temperatura ( $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foi feito no banho do tipo Dubnoff com agitação MA-093, Marconi Ltda. Assim, nos formulados, obteve-se 8% (m/v) de copolímeros,  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO.

#### **6.2.2.2 Avaliação do efeito da temperatura sobre os copolímeros**

Para realizar esta avaliação, formulados de AO/P-123 e AO/F-123 foram preparados com 8% de copolímero,  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AO e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Várias técnicas óticas foram empregadas para compreender o efeito da temperatura sobre os copolímeros, são estas: Espectroscopia de absorção eletrônica (UV-Vis), Espectroscopia de emissão eletrônica (Fluorescência), Anisotropia de Fluorescência Estática, Espalhamento de luz ressonante (RLS) e Espalhamento de luz dinâmico (DLS). As

medidas foram realizadas somente depois de 5 minutos após a estabilização da temperatura.

#### **6.2.2.3 Espectroscopia UV-Visível**

Para estas medidas foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis DU800 com controlador de temperatura de alto desempenho do tipo Peltier da Beckman/Coulter Electronics. Foram adicionados 2,0 mL do formulado foi adicionado a uma cubeta de poliestireno e os gráficos de absorvância *versus* comprimento de onda foram registrados.

#### **6.2.2.4 Espectroscopia de fluorescência**

Nas medidas de emissão de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian/Agilent Technologies com sistema Peltier para controle eletrônico de temperatura. Foram adicionados 2,0 mL do formulado numa cubeta de poliestireno. O Comprimento de onda de excitação foi de 560 nm.

#### **6.2.2.5 Anisotropia de fluorescência (r)**

Estas medidas foram realizadas usando o mesmo equipamento de onde se realizou as medidas de Fluorescência. Foram adicionados 2,0 mL do formulado numa cubeta de poliestireno. O comprimento de onda de emissão do monômero foi monitorado em 646 nm.

#### **6.2.2.6 Espalhamento de luz ressonante (RLS)**

Estas medidas também foram realizadas usando o mesmo equipamento de onde se realizou as medidas de Fluorescência. Foram adicionados 2,0 mL do formulado numa cubeta de poliestireno, com delta ( $\Delta$ ) igual a zero.

#### **6.2.2.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

Para estas medidas foram adicionados 1,0 mL do formulado numa cubeta de poliestireno. Devido às características da amostra, ajustou-se a radiação de baixo ângulo (12,8 °). As medidas foram feitas em triplicatas de 10 repetições.

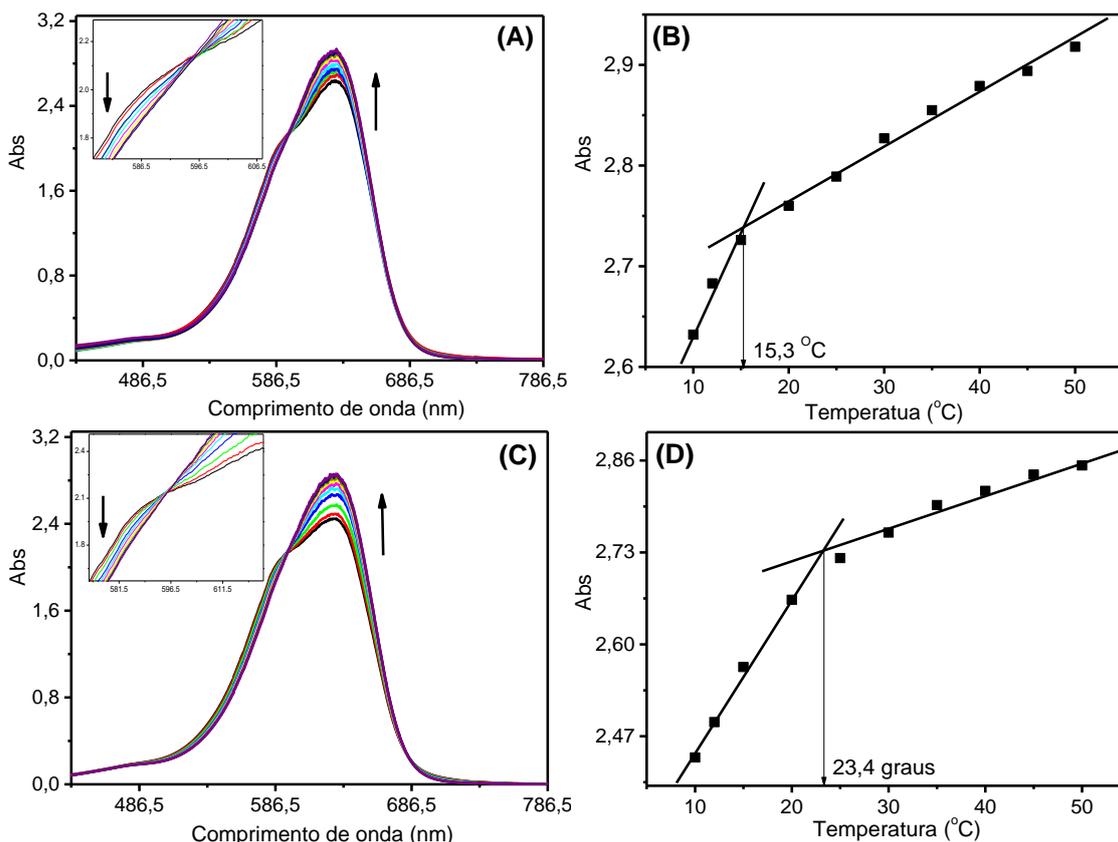
## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 UV-Vis

A utilização dos métodos óticos na avaliação do efeito da temperatura sobre os copolímeros e determinação da TMC, tem como propósito ajudar a elucidar o mecanismo de ligação do AO com os copolímeros em função da temperatura assim como validar os valores de TMC encontrados pelos métodos eletroquímicos discutidos no Capítulo 5. No entanto, nos métodos eletroquímicos, as condições de concentração da sonda ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) poderiam afetar a interpretação molecular dos efeitos de autoagregação de copolímeros e fornecer valores de TMC duvidosos, devido ao efeito de filtro interno. Este efeito ocorre em amostras muito concentradas, onde moléculas absorvem ou reabsorvem a luz transmitida ou emitida das próprias moléculas do meio antes de chegar ao detector (Lakowicz 1999). Para certificar-se que os resultados obtidos não estão tendo sua interpretação distorcida devido ao efeito de filtro interno, realizou-se os experimentos de UV-Vis, Fluorescência, Anisotropia de Fluorescência e RLS em duas condições de concentração: *i*) alta concentração de AO, condição trabalhada nos experimentos de eletroquímica,  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , onde há efeito de filtro interno e *ii*) menor concentração de AO, onde não há efeito de filtro interno,  $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (Braga 2014). Assim, inicia-se com os resultados de UV-Vis.

O AO tem uma banda de absorção eletrônica na região do visível com um máximo de absorção referente a monômeros em 620 nm e, dependendo da concentração, um ombro na região 585 nm referente a espécies autoagregadas (Braga 2014). Assim, as propriedades óticas do AO incorporado em copolímeros foram avaliadas com a variação da temperatura, primeiramente para alta concentração de AO, Figura 6.1.

Na Figura 6.1A e C, observa-se que mesmo o AO formulado, ainda há presença de moléculas autoagregadas no meio, principalmente em baixas temperaturas (Figura inserida). Estes agregados provavelmente estão em pequena quantidade no meio aquoso. Liu observou que unímeros e micelas de copolímeros podem induzir a autoagregação de moléculas hospedes (Liu, Zou *et al.* 2010). Desta forma, não se pode descartar a possibilidade de haver autoagregados de AO ligado a unímeros e micelas como proposto na Figura 4.14 (Capítulo 4).



**Figura 6.1.** Variação da absorvância do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em copolímeros (8%) com a temperatura, KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . **A)** e **B)** Sistema AO/P-123. **C)** e **D)** Sistema AO/F-127. A Figura inserida é uma ampliação da região referente ao sinal de agregado.

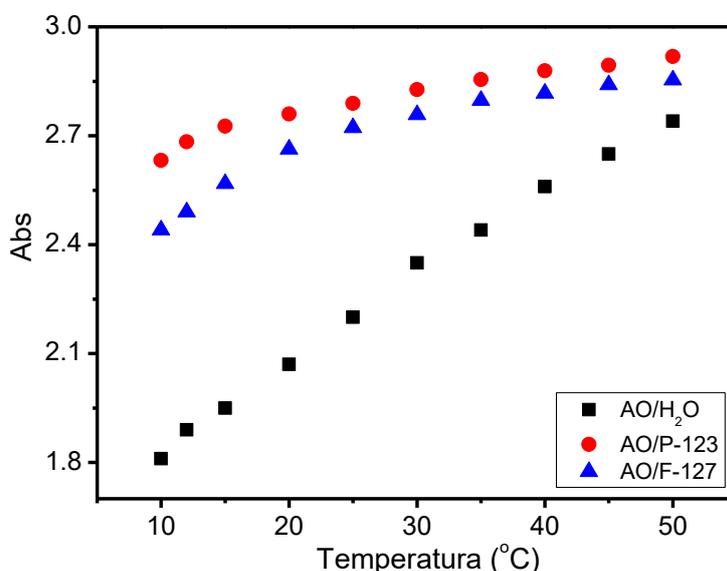
Os espectros de absorvância mostram um aumento da absorvância do pico de monômero (620 nm) do AO concomitantemente com o desaparecimento do pico de agregado (585 nm) com o aumento da temperatura, indicando a monomerização do AO causado pelo aumento da temperatura. Contudo, observam-se dois regimes na variação da absorvância com o aumento da temperatura. Em baixas temperaturas, verifica-se um aumento mais acentuado na absorvância, enquanto que em altas temperaturas o aumento da absorvância é mais gradativo, de forma que se observa um ponto de inflexão em 15,3 e 23,4 °C para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127, respectivamente, que representa a região da TMC dos copolímeros (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994, Wanka, Hoffmann *et al.* 1994).

Abaixo da TMC, os resultados do Capítulo 5 mostraram que moléculas de AO estão preferencialmente ligadas a unímeros, como ilustrado na Figura 5.9 do Capítulo 5. A Figura 6.1A e C mostram que em baixas temperaturas têm-se mais agregados, pois nesta região o sinal de absorvância do agregado é maior. Então, é plausível dizer que as moléculas de AO

estão ligados aos unímeros não somente na forma monomérica, mas podem estar ligadas também na forma agregada, como proposto por Liu (Liu, Zou *et al.* 2010). Assim, o aumento da temperatura tende a monomerizar moléculas de AO no meio aquoso e ligado a unímeros. Desta forma, como a capacidade de monomerização de moléculas de AO dos unímeros é limitada, o aumento da temperatura afetará mais efetivamente na monomerização das moléculas de AO. Acima da TMC também pode haver agregados, porem a formação das micelas contribuem significativamente na monomerização de moléculas de AO, como verificado no Capítulo 2, de forma que o aumento da temperatura afetará menos na monomerização de moléculas de AO.

A não variação do comprimento de onda nos espectros de absorção mostra que o ambiente químico do estado fundamental do AO, antes e depois da TMC, é praticamente o mesmo, indicando que antes da TMC o ambiente interacional das moléculas de AO com os unímeros é equivalente ao do AO incorporado nas micelas de copolímero.

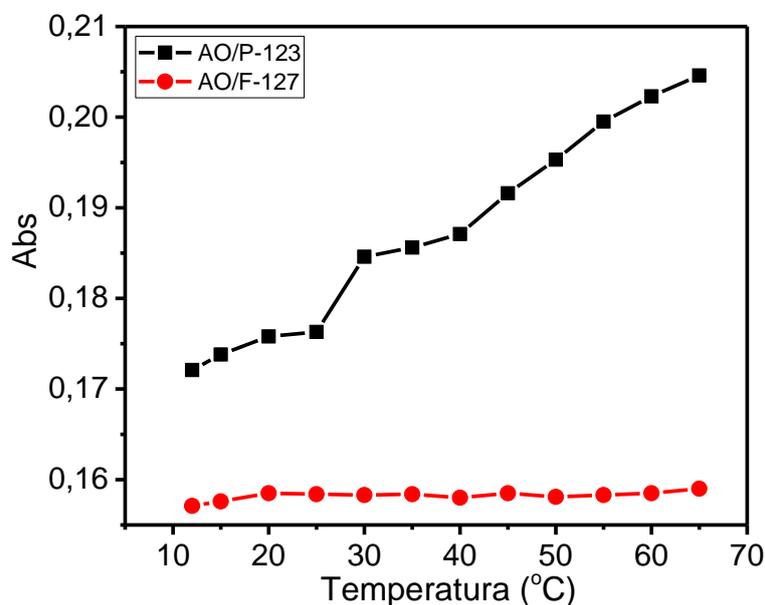
Para verificar o efeito da monomerização do AO em meio aquoso com a temperatura, em comparação aos sistemas formulados, tem-se a Figura 6.2.



**Figura 6.2.** Variação da absorbância do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura, em meio aquoso e em copolímeros (8%) com  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

A Figura 6.2 mostra que em meio aquoso, o aumento da absorbância do AO com a temperatura é linear, enquanto que em meio de copolímeros têm-se dois regimes de variação na absorbância, devido à formação das micelas de P-123 e F-127.

Os experimentos acima foram conduzidos numa faixa de concentração onde há efeito de filtro interno. Como mencionado, também se realizaram os experimentos acima das condições onde este efeito é inexistente, baixa concentração de AO, Figura 6.3.

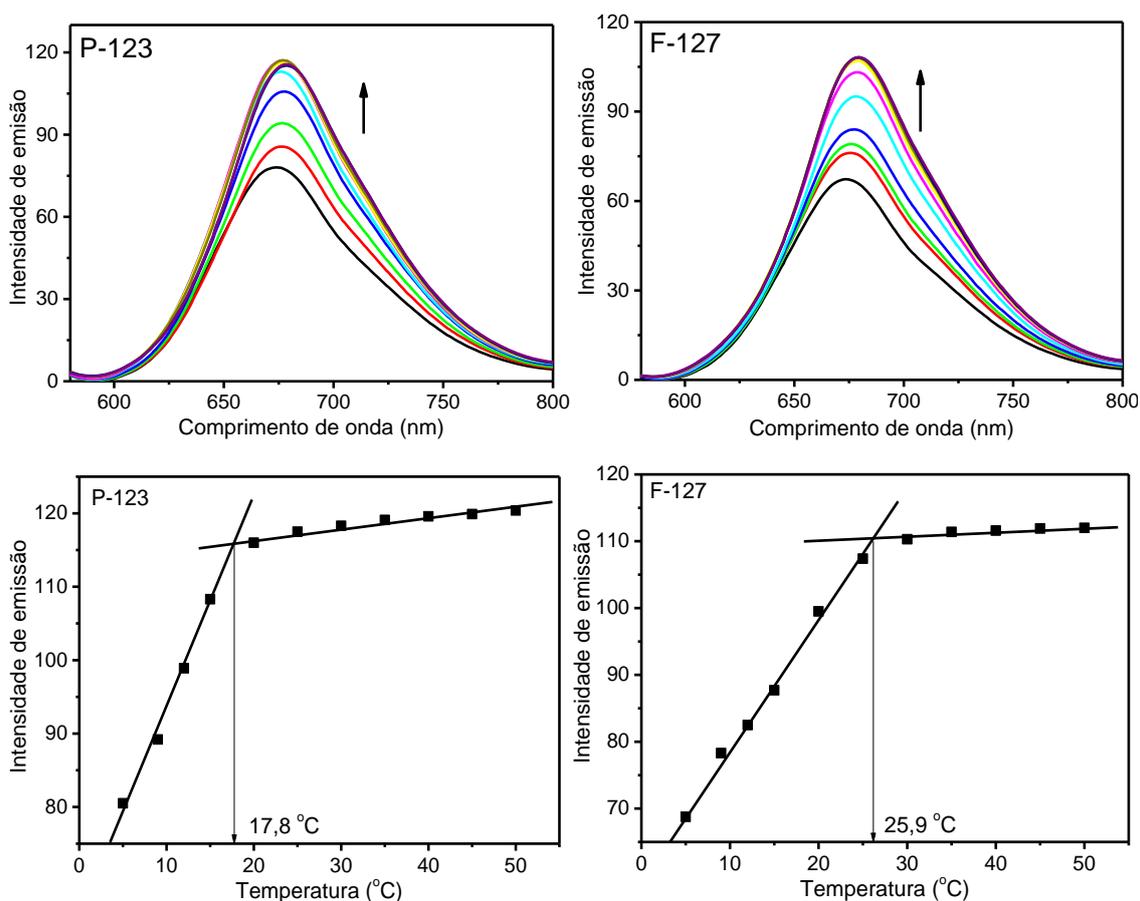


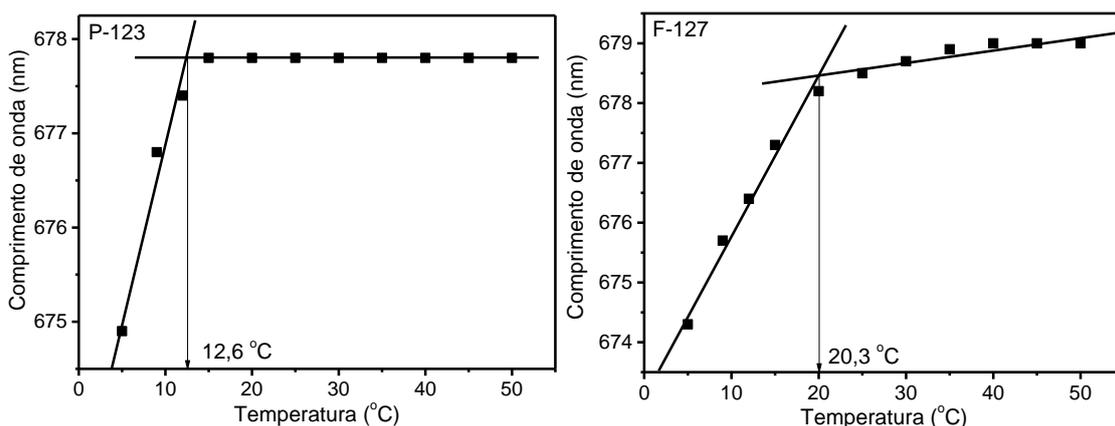
**Figura 6.3.** Variação da absorbância do AO ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura, em meio de copolímeros (8%) e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

Na Figura 6.3, não é possível verificar dois regimes de variação da absorbância como verificado nos resultados anteriores. Observa-se apenas um aumento um pouco mais drástico para o sistema AO/P-123 em torno de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , indicando uma mudança na autoagregação do P-123, que poderia ser a TMC. Contudo, este valor não está em acordo com os dados da literatura que é em torno de  $16,0 \text{ }^\circ\text{C}$  para o P-123 (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994, Wanka, Hoffmann *et al.* 1994). Este resultado mostra que nestas condições de concentração, apesar de resolver o problema de filtro interno, não é possível usar a técnica de UV-Vis para monitorar o processo de agregação dos copolímeros e determinação da TMC de maneira plausível. Além disso, também nos faz questionar se o efeito do filtro interno realmente poderia ser um fator limitante para se avaliar os efeitos de agregação dos copolímeros e determinar a TMC. Para uma melhor compreensão dos fenômenos observados e do efeito do filtro interno empregou-se também a fluorescência, considerada uma técnica óptica extremamente sensível (Lakowicz 1999).

### 6.3.2 Fluorescência

Moléculas de AO exibem emissão considerável de fluorescência, com máximo de emissão da espécie monomérica em meio aquoso na região de 649 nm (Braga 2014). Quando existem autoagregados de AO, o comprimento de onda de emissão pode sofrer um deslocamento batocrômico (para o vermelho), devido à desativação dos estados excitados por colisão (Lakowicz 1999), como pode ser observado nos espectros de emissão apresentados na Figura 6.4, cuja concentração há presença de autoagregados. A sensibilidade da técnica de fluorescência permitiu avaliar mais nitidamente o efeito de monomerização, como observado nos resultados de UV-Vis, e a mudança de microambiente do sistema AO/copolímero causado pela variação da temperatura, como pode ser visualizado na Figura 6.4. Primeiramente realizamos os experimentos nas condições de alta concentração de AO.





**Figura 6.4.** Variação da intensidade de emissão e no comprimento de onda do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura em meio de copolímeros (8%), KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{excitação}} = 560 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 676 \text{ nm}$ .

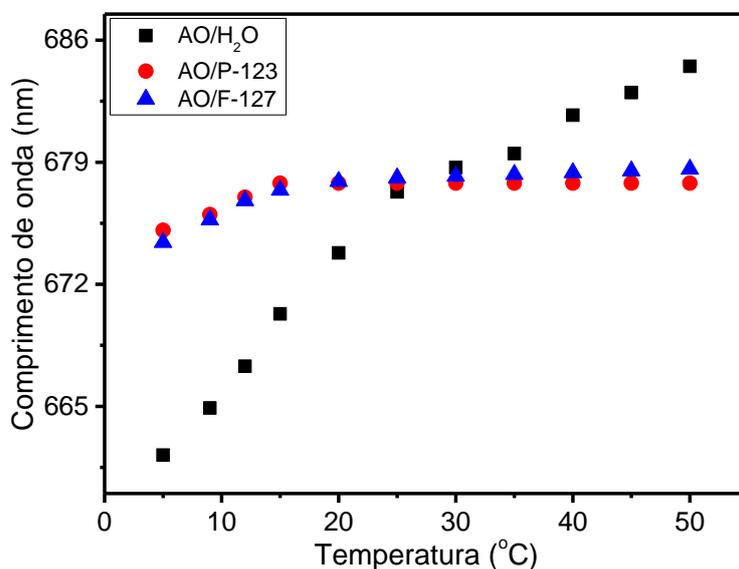
Assim como o observado nos dados de absorção, verificamos um aumento da intensidade de emissão com o aumento da temperatura, onde existem dois regimes na variação, porém neste caso mais pronunciado, indicando também a TMC dos copolímeros. Este resultado também mostra o maior efeito da temperatura na monomerização de autoagregados de AO abaixo da TMC, enquanto que acima, a maior capacidade de monomerização das micelas, torna o efeito da temperatura menos pronunciado. Verifica-se também uma pequena, mais tendenciosa, variação no comprimento de onda de emissão do AO, onde também se observa dois regimes de variação.

Abaixo da TMC, o aumento da temperatura promove um deslocamento batocrômico (para o vermelho) no máximo de intensidade de emissão do AO, indicando que o fenotiazínico tende a interagir mais efetivamente com as cadeias hidrofílicas de PEO dos copolímeros, como reportado na literatura com outras sondas (Valdes-Aguilera and Neckers 1989, Amat-Guerri, Lopez-Gonzalez *et al.* 1990, Zhang, Zhang *et al.* 2010). Contudo, verifica-se um deslocamento mais acentuado do comprimento de onda de emissão com o aumento da temperatura para o sistema AO/P-123 em comparação ao sistema AO/F-127. Este resultado mostra a maior eficiência na desidratação das micelas de P-123, provavelmente devido a sua maior hidrofobicidade.

Acima da TMC, o comprimento de onda não varia (para o P-123) ou varia muito pouco (para o F-127), indicando que o ambiente micelar onde o AO está inserido não varia até a temperatura de  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , mesmo com a desidratação e o aumento do número de

agregação da micela. A pequena variação do comprimento de onda acima da TMC para o sistema AO/F-127, provavelmente esta associada com o fato de micelas de F-127 serem mais hidratadas em relação às micelas de P-123. Isto ocorre devido ao maior número de grupos PEO (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994), o que implica numa micela mais fluida e conseqüentemente com maior mobilidade do AO entre as cadeias poliméricas na interface água/corona. Além disso, pode-se inferir que a desidratação e compactação dos grupos PEO das micelas, que ocorre com o aumento da temperatura (Liang, Guo *et al.* 2007), afeta os microambientes micelares apenas das micelas de F-127.

É importante ressaltar que o AO em meio aquoso também se observa variação do comprimento de onda com o aumento da temperatura, isto ocorre devido ao aumento na eficiência dos processos de relaxamento vibracional (CI) na desativação do estado excitado (Lakowicz 1999). No entanto, abaixo da TMC o ambiente químico do AO, de maneira geral, não é o meio aquoso, pois o comprimento de onda de emissão do AO formulado não é igual ao comprimento de onda do mesmo em meio aquoso, como pode ser observado na Figura 6.5.

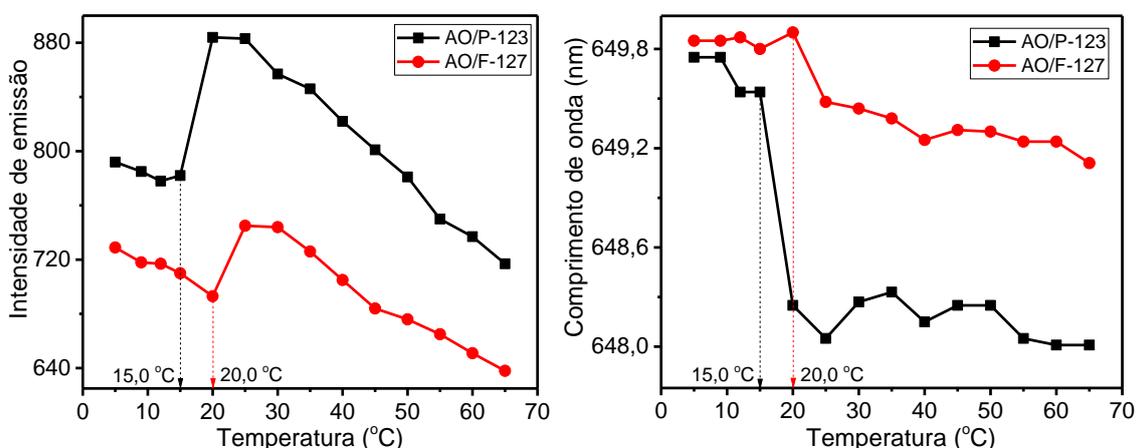


**Figura 6.5.** Variação no comprimento de onda do AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura em meio aquoso e de copolímeros (8%), KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{excitação}} = 560 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 676 \text{ nm}$ .

Este resultado, assim como os resultados de UV-Vis, confirmam os resultados encontrados no Capítulo 5, onde se verificou que abaixo da TMC moléculas de AO

estão preferencialmente ligados a unímeros. Adicionalmente, em baixas temperatura as interações de van der Waals e ligação de hidrogênio com os grupos PEO dos copolímeros, promovem uma maior desativação dos estados excitados em relação ao meio aquoso. Já em altas temperaturas (acima de 30,0 °C – Figura 6.5), o meio micelar protege as moléculas de AO da desativação dos estados excitados por colisão com moléculas de água, que estão com elevado grau de agitação.

A avaliação do efeito da temperatura em baixa concentração do AO, encontra-se abaixo na Figura 6.6.



**Figura 6.6.** Variação da intensidade de emissão e no comprimento de onda do AO (6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com a temperatura em meio de copolímeros (8%), KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{excitação}} = 560 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 676 \text{ nm}$ .

Verifica-se um comportamento diferente na intensidade e comprimento de onda de emissão com a temperatura nas condições de baixa concentração de AO. Com relação às intensidades de emissão, observa-se uma diminuição com o aumento da temperatura até a região da TMC, onde neste ponto, tem-se um aumento da emissão e depois começa a diminuir novamente. Nesta condição de concentração, supostamente há apenas monômeros de AO, e o aumento da temperatura não provocará a monomerização como visto anteriormente, mas provocará a desativação dos estados excitados, por colisão com moléculas de água, que reduzirá a intensidade de emissão das moléculas de AO. Quando a micela é formada nas temperaturas de 15,0 e 20,0 °C para o P-123 e F-127, respectivamente, as moléculas de AO são incorporadas nas micelas e conseqüentemente protegidas das desativações por moléculas de água e, portanto é observado um aumento na intensidade de emissão nesta região.

Comparativamente, moléculas de AO em P-123 apresentam maior intensidade de emissão do que em F-127, em toda a faixa de temperatura, sugerindo que copolímeros de P-123 protegem mais eficazmente as moléculas de AO das moléculas de água, pois são mais hidrofóbicos.

Com relação à variação do comprimento de onda, verifica-se que é pequeno porém tendencioso. Observa-se uma mudança de comportamento na mesma região de temperatura encontrado na variação da intensidade de emissão, confirmando a formação da micela. Contudo, o comportamento também é diferente do observado com o experimento feito em condições de alta concentração de AO. Abaixo da TMC, o comprimento de onda de emissão permanece praticamente constante com o aumento da temperatura, mostrando que o ambiente químico é o mesmo nesta região, ou seja, moléculas de AO interagindo preferencialmente com unímeros.

Quando a micela é formada, moléculas de AO são transferidas do ambiente químico dos unímeros para o ambiente químico micelar. No ambiente micelar o comprimento de onda permanece aproximadamente constante com o aumento da temperatura. Além disso, verifica-se que o comprimento de onda de emissão do sistema AO/F-127 está numa região menos energética em relação ao sistema AO/P-123. Este resultado sugere que em F-127 as moléculas de AO sofrem mais processos de desativação do estado excitado. Isto ocorre possivelmente devido ao maior grau de hidratação existente nos copolímeros de F-127, ou seja, as moléculas de AO estão mais expostas às moléculas de água, especialmente acima da TMC no F-127. Desta forma, micelas de F-127 tem um maior número de moléculas de água capazes de interagir com moléculas de AO e causar sua desativação. Adicionalmente, uma variação mais drástica no comprimento de onda é observado para o sistema AO/P-123, indicando a maior capacidade do P-123 em mudar o ambiente químico do AO pelo processo de incorporação na formação da micela.

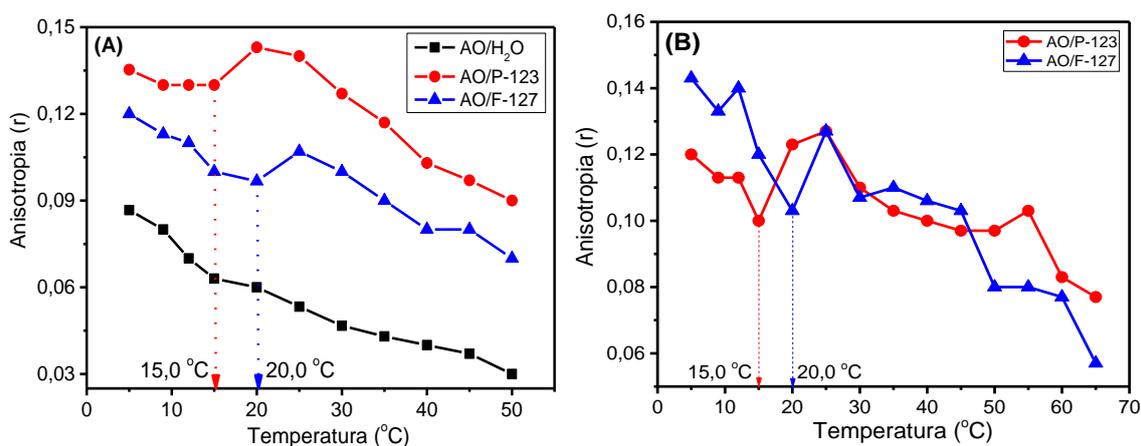
Os valores de TMC encontrados nas condições de baixa concentração de AO, são semelhantes aos valores encontrados em alta concentração, sugerindo que o efeito de filtro interno não contribui para atrapalhar ou inviabilizar a determinação da TMC nestas condições. No entanto, a interpretação do efeito da autoagregação dos copolímeros com o aumento da temperatura é diferente.

No espectrofluorímetro também é possível avaliar a anisotropia de fluorescência, que vem sendo pouco empregada para avaliação de processos de autoagregação de

copolímeros. Assim para ajudar na compreensão dos sistemas realizaram-se experimentos de anisotropia em alta e baixa concentração de AO.

### 6.3.3 Anisotropia de fluorescência ( $r$ )

A técnica de anisotropia se baseia na excitação seletiva do fluoróforo pela luz polarizada, onde a molécula absorve preferencialmente os fótons provenientes da luz polarizada devido ao alinhamento do vetor elétrico ao momento de transição da molécula, conduzindo a uma emissão de fluorescência polarizada (Lakowicz 1999). Desta forma, para avaliar a mobilidade do AO encapsulado nas micelas de P-123 e F-127, medidas de anisotropia de fluorescência estática ( $r$ ) foram realizadas, concomitantemente aos experimentos de absorção eletrônica e emissão de fluorescência. Abaixo segue a variação da anisotropia de fluorescência do AO em função da temperatura nas condições de alta e baixa concentração, Figura 6.7.



**Figura 6.7.** Variação da anisotropia de fluorescência ( $r$ ) do AO com a temperatura em copolímeros (8%), KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\text{excitação}} = 600$  nm e  $\lambda_{\text{emissão}} = 646$  nm. **A)** [AO] = 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **B)** [AO] = 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Observa-se na Figura 6.7A, em alta concentração de AO, que a anisotropia do AO em meio aquoso tende a diminuir com o aumento da temperatura, isto acontece devido ao aumento da rotação difusional das moléculas de AO, tendo em vista que a viscosidade do meio aquoso tende a diminuir com o aumento da temperatura (Lakowicz 1999). Quando o AO está incorporado nos copolímeros a mesma diminuição é observada, porém um desvio na tendência é observada em 15,0 e 20,0 °C para AO/P-123 e AO/F-127, respectivamente. Estes valores coincidem com os valores de TMC encontrados anteriormente.

Abaixo da TMC, a mobilidade do AO em P-123 e F-127 diminui com o aumento da temperatura. Contudo, abaixo da TMC o AO se encontra preferencialmente ligado aos unímeros, pois nesta região o AO em copolímeros possui maior anisotropia em comparação ao AO no meio aquoso, Figura 6.7A, o que está em harmonia com os resultados de fluorescência. Quando a micela é formada (na TMC) as moléculas de AO, agora incorporadas, estão mais imobilizadas, e conseqüentemente apresentam um aumento na anisotropia. Depois da TMC, a anisotropia tende a diminuir novamente com o aumento da temperatura, devido a maior mobilidade do AO dentro da micela, Figura 6.7. Adicionalmente, verifica-se que praticamente em todas as temperaturas, a anisotropia do AO incorporado em micelas de P-123 é maior do que a anisotropia do mesmo incorporado em micelas de F-127, especialmente nas condições de alta concentração de AO, Figura 6.7A. Este resultado sugere que as moléculas de AO estão mais imobilizadas nas micelas de P-123, provavelmente devido a maior compactação dos grupos PEO, pois apresentam um menor grau de hidratação em relação aos grupos PEO das micelas de F-127. Esta maior compactação, torna o microambiente das micelas de P-123 mais denso e viscoso em relação às micelas de F-127.

Na Figura 6.7B, em baixa concentração de AO, o mesmo comportamento é observado na variação da anisotropia de fluorescência com o aumento da temperatura. No entanto, uma variação maior na anisotropia é observada quando a micela é formada. Novamente, o efeito de filtro interno não alterou o valor de TMC dos copolímeros, e neste caso, também não alterou a interpretação da avaliação da autoagregação dos copolímeros com a temperatura.

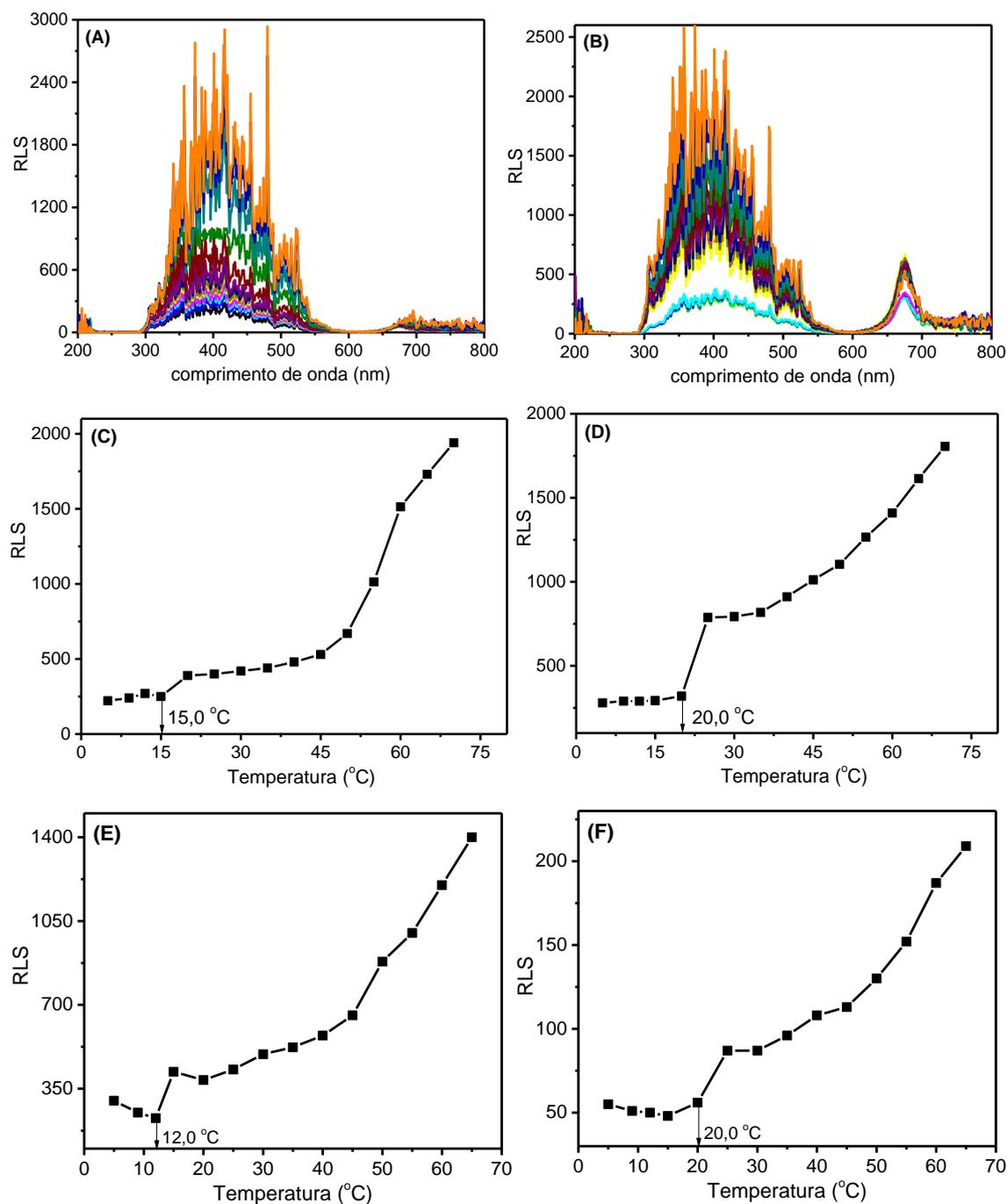
Curiosamente, o aumento da temperatura promove diminuição na anisotropia de fluorescência estática, o que não era de se esperar, sabendo que o aumento da temperatura implica numa desidratação da micela tornando-a mais compacta, o que ocasionaria uma maior mobilização do AO entre os grupos PEO e conseqüentemente maior anisotropia. Este resultado sugere que pode haver efeitos de tempo de vida no processo de desativação dos estados excitados do AO.

Fica evidente a possibilidade de realizar a determinação da TMC por anisotropia de fluorescência, fornecendo resultados para confirmar fatores como mobilidade da sonda observados de maneira discreta nos resultados de fluorescência.

Como há tendência dos copolímeros em sofrer autoagregação com o aumento da temperatura, levando a formação de micelas, estudos de RLS foram realizados para avaliar a existência de espécies espalhadoras de luz.

### 6.3.4 RLS

Tendo em vista que os copolímeros são macromoléculas relativamente grandes, e que unímeros, pré-agregados micelares e micelas podem apresentar espalhamento de luz, medidas de espalhamento de luz ressonante (RLS) foram conduzidos para verificar o grau de espalhamento provocado pelos sistemas AO/P-123 e AO/F-127 com o aumento da temperatura, nas condições de baixa e alta concentração de AO, Figura 6.8



**Figura 6.8.** Avaliação da intensidade do espalhamento de luz (RLS) em função da temperatura, 8% dos copolímeros e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl,  $\lambda_{\text{RLS}} = 400$ . **A)** RLS do AO/P-123, [AO] = 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **B)** RLS do AO/F-123, [AO] = 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **C)** RLS *versus* temperatura do AO/P-123, [AO] = 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **D)** RLS *versus* temperatura do AO/F-127, [AO] = 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **E)** RLS *versus* temperatura do AO/P-123, [AO] = 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **F)** RLS *versus* temperatura do AO/F-127, [AO] = 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Nas Figuras 6.8A e B observa-se um sinal evidente de espalhamento na região de 400 nm que é característico do espalhamento proveniente de moléculas de copolímeros autoagregadas. Além disso, verifica-se um sinal de RLS na região de 680 nm referente à fluorescência residual do AO, como observado no Capítulo 2.

A Figura 6.8C, D, E e F verifica-se uma região de mudança na intensidade de espalhamento na região de 15,0 e 20,0 °C para os sistemas AO/P-123 e AO/F-127, respectivamente. É interessante ressaltar que abaixo da TMC o espalhamento é praticamente constante, indicando a não formação de pré-agregados micelares grandes. Na região da TMC, a intensidade de espalhamento aumenta, pois micelas poliméricas são formadas. Contudo, a variação na intensidade de espalhamento, na TMC, é maior para o sistema AO/F-127, o que está em concordância com a literatura (Alexandridis, Holzwarth et al. 1994). Alexandridis relata que micelas de F-127, mesmo tendo menor número de agregação em relação às micelas de P-123, apresentam maior raio hidrodinâmico, pois possuem maior número de unidade de PEO, e conseqüentemente, maior capacidade de hidratação.

Depois da TMC, até a temperatura de 45,0 °C, verifica-se um aumento gradativo do espalhamento de luz apenas para o AO/F-127, enquanto que para o AO/P-123 o espalhamento permaneceu praticamente constante. O aumento da temperatura provoca um efeito dual no tamanho da micela, ou seja, a desidratação, que conduz a uma redução do raio hidrodinâmico (Miller and Drabik 1984, Attwood, Collett et al. 1985) e o aumento do número de agregação, que leva a um aumento do raio hidrodinâmico (Linse and Malmsten 1992). Assim, para o F-127 o efeito do aumento do número de agregação foi predominante nesta faixa de temperatura, pois se verificou um aumento no raio hidrodinâmico e conseqüentemente no espalhamento de luz. Já para o P-123, provavelmente os efeitos se anulam, de modo que o raio hidrodinâmico permanece aproximadamente constante dentro desta faixa de temperatura, pois não houve muita

variação no espalhamento de luz, como observado por Alexandridis (Alexandridis and Alan Hatton 1995).

Ao aumentar a temperatura para valores superiores a 45,0 °C, verifica-se um aumento mais acentuado no espalhamento de luz para ambas as micelas, sugerindo uma autoagregação micelar, especialmente para as micelas de P-123, onde ocorre um aumento mais acentuado em relação às micelas de F-127. Tal autoagregação é perfeitamente factível, tendo em vista que o aumento da temperatura promove a desidratação das micelas de copolímeros e conseqüentemente uma exposição dos grupos hidrofóbicos de PPO ao meio aquoso, induzindo a autoagregação micelar (Fan, Degen *et al.* 2010). Como as micelas de P-123 são mais hidrofóbicas, estas tenderão a sofrer autoagregação micelar mais facilmente com o aumento da temperatura, podendo formar autoagregados com formato cúbico e cilíndrico, como foi ilustrado na Figura 5.1 (Capítulo 5)

Fica evidente a possibilidade de realizar a determinação da TMC por RLS. Comparando os sistemas nas condições de alta (Figura 6.8C e D) e baixa (Figura 6.8E e F) concentração de AO, nota-se o mesmo comportamento dos resultados e um valor de TMC praticamente idêntico. Tais resultados mostram que o efeito de filtro interno não afeta a interpretação nem a determinação da TMC dos sistemas empregando RLS.

Nas técnicas até aqui estudadas, verificou-se que a avaliação do efeito da temperatura na autoagregação de copolímeros forneceu interpretações diferentes, dependendo da concentração da sonda, apenas para a técnica de fluorescência. No entanto, a visualização da TMC foi possível em todas as técnicas, inclusive em alta concentração de AO. Este fato sugere que o efeito de filtro interno, não atrapalha e nem impossibilita a determinação da TMC, pois os valores foram muito próximos aos valores encontrados nas condições de baixa concentração de AO, como pode ser visualizado na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1.** Valores de TMC para os copolímeros (8%) com AO em baixa ( $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e alta ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, empregando-se várias técnicas.

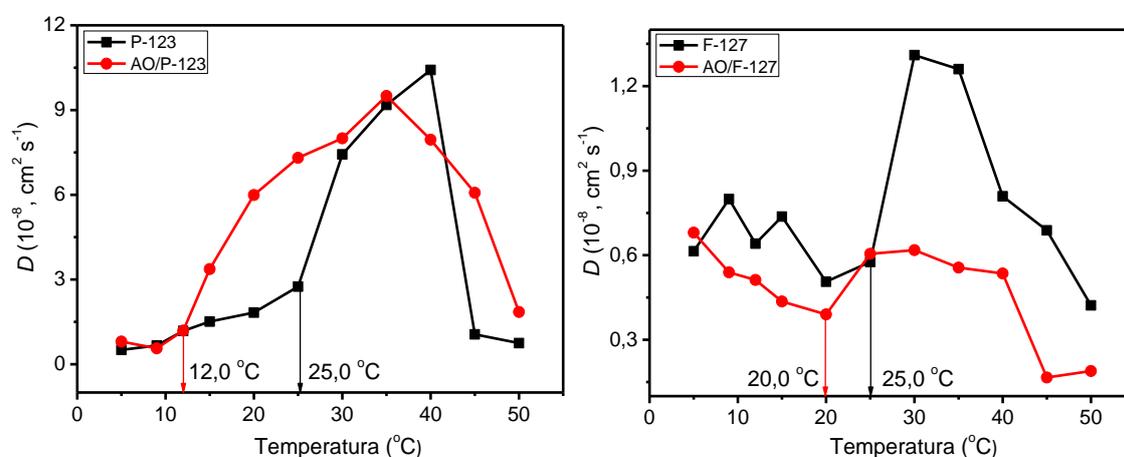
TMC (°C)	Baixa concentração		Alta concentração	
	P-123	F-127	P-123	F-127
Técnicas	P-123	F-127	P-123	F-127
*Fluorescência	15,0	20,0	15,2	23,1
Anisotropia	15,0	20,0	15,0	20,0
RLS	12,0	20,0	15,0	20,0
UV-Vis	25,0	-	15,3	23,4

\*Valores de TMC encontrados pela média dos valores encontrados nos gráficos de intensidade e comprimento de onda em função da temperatura.

Partículas que causam espalhamento podem ser visualizadas com experimentos de DLS e obter maiores informações sobre os sistemas coloidais. Assim a técnica de DLS foi empregada.

### 6.3.5 DLS

A fim de caracterizar melhor as partículas coloidais que originaram os sinais de espalhamento de luz observados nos experimentos de RLS, foram realizadas medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Esta técnica permitiu avaliar o coeficiente de difusão e o raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) das partículas através da Equação de Stokes-Einstein. Na Figura 6.9 tem-se a variação dos coeficientes de difusão das partículas coloidais em função da temperatura.



**Figura 6.9.** Variação do coeficiente de difusão das micelas de copolímeros (8%) com a temperatura, na presença e na ausência de AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

Uma vantagem desta técnica é que não há a necessidade de uma sonda para avaliar o espalhamento de luz dinâmico, podendo-se fazer comparações do tamanho da partícula coloidal na presença e na ausência do AO, Figura 6.9. Verifica-se uma mudança de variação no coeficiente de difusão das partículas na região da TMC. É interessante observar que os valores de TMC dos copolímeros diminuem na presença do AO, o que está em concordância ao relatado por Basak e Bandyopadhyay recentemente com F-127 e Ibuprofeno (Basak e Bandyopadhyay 2013). Este resultado indica que o fenotiazínico em copolímeros pode favorecer a formação da micela.

Abaixo da TMC, os valores de coeficiente de difusão aparentam pouca variação, considerando as flutuações do método, o que confirma os dados de RLS onde mostraram baixo espalhamento de luz, pois provavelmente não há formação de pré-agregados micelares grandes. Acima da TMC, tem-se um aumento acentuado do coeficiente de difusão, o que poderia sugerir uma drástica diminuição do raio hidrodinâmico da micela nesta região. No entanto, este fenômeno é atribuído ao aumento do movimento Browniano das espécies em solução com o aumento da temperatura. Na faixa de temperatura de 30,0 a 40,0 °C, observa-se uma queda drástica do coeficiente de difusão, devido ao elevado aumento do tamanho da partícula nesta região de temperatura. Este resultado reforça a hipótese dos sistemas AO/P-123 e AO/F-127 estarem assumindo um empacotamento cúbico e cilíndrico em temperaturas muito acima da TMC, como sugerido pelos resultados de RLS.

Através dos valores dos coeficientes de difusão das partículas coloidais, é possível extrair o raio hidrodinâmico das mesmas empregando a Equação de Stokes-Einstein, como mencionado anteriormente. Estes valores estão apresentados na Tabela 6.2 para a temperatura de 30,0 °C.

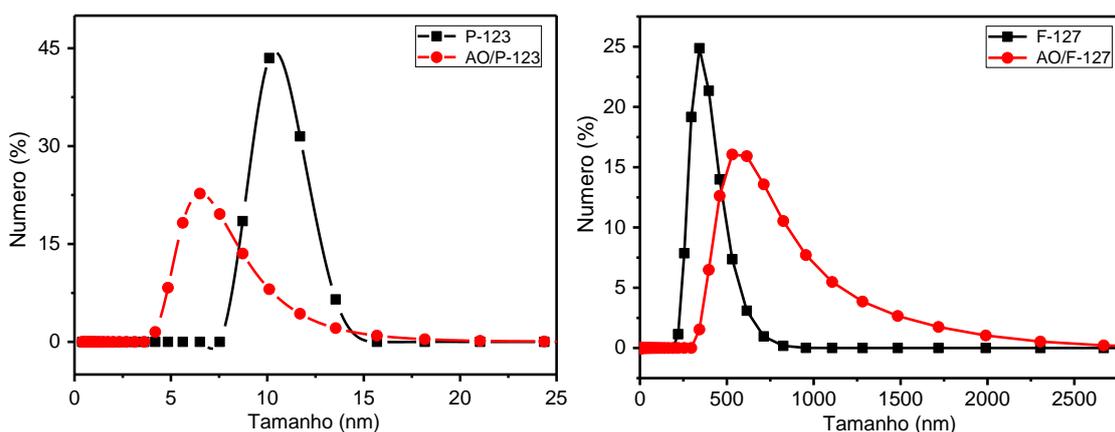
**Tabela 6.2.** Valores dos raios hidrodinâmicos ( $R_H$ ) (Kadam, Yerramilli et al. 2009) das micelas de copolímeros (8%) na presença e ausência de AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl a  $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Sistemas:	P-123	AO/P-123	F-127	AO/F-127
$R_H$ (nm)	37,43	34,77	212,31	450,04
* $R_H$ (nm)	8,5	10,7	10,3	14,6

\*Referente a valores da literatura nas condições de 1% de copolímeros, na ausência e presença de Carbamazepina (CBZ), na ausência de sal a  $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$  (Kadam, Yerramilli et al. 2009).

Os valores maiores em relação aos da literatura podem estar relacionados com a porcentagem de copolímeros, quem afetam drasticamente o raio de hidratação, sendo o F-127 o mais afetado por ser uma micela mais hidrofílica.

Ficam confirmados na Tabela 6.2, que micelas de F-127 são maiores em relação a micelas de P-123, como relatado na literatura (Alexandridis, Holzwarth *et al.* 1994). Observa-se também, que a presença de AO praticamente não altera o tamanho da micela de P-123, porem altera muito o tamanho da micela de F-127. Kuperkar e Kumar verificaram que a adição de moléculas (aditivos) em meio coloidal de copolímero promove um aumento no raio hidrodinâmico das micelas (Ganguly, Kuperkar *et al.* 2012, ANDRÉS F., HÉCTOR *et al.* 2014, Dey, Kumar *et al.* 2014). Tal efeito tem sido postulado por Kumar, que propõe uma substituição de moléculas de água de hidratação dos grupos hidrofílicos PEO por moléculas que estão sendo incorporadas, ocasionando um aumento na hidrofobicidade da micela. Este efeito de desidratação melhora as interações intramicelares atrativas, o que promove a formação de clusters micelar grandes (Dey, Kumar *et al.* 2014). Para a micela de P-123, por ser uma micela mais densa e compacta, como verificado nos resultados de anisotropia, a presença do AO provavelmente não afeta de maneira significativa o raio hidrodinâmico da mesma. O efeito da mudança do tamanho da micela com a incorporação de moléculas de AO pode ser visualizado também na Figura 6.10.

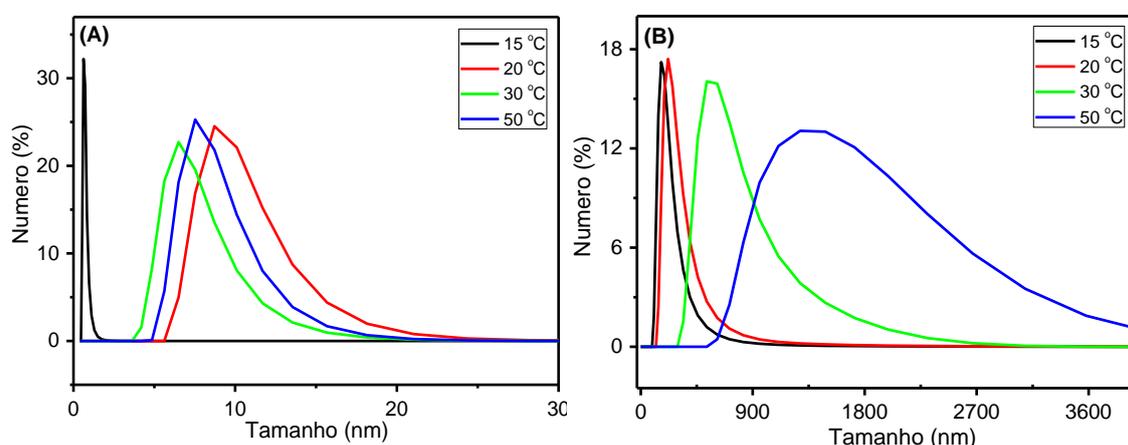


**Figura 6.10.** Medidas de DLS de copolímeros (8%) a 30,0 °C, na presença e na ausência de AO (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de KCl.

Considerando a flutuação da técnica e a escala utilizada em ambos os gráficos, o tamanho da micela de P-123 não muda muito na incorporação do AO. Já a micela de

F-127 tem um aumento considerável em seu tamanho. Além disso, verifica-se que a incorporação do AO promove um alargamento da curva da distribuição do tamanho. Este fato sugere que a incorporação do AO nas micelas de copolímeros causa uma maior distribuição nos tamanhos das mesmas no meio.

Uma avaliação na distribuição do tamanho das micelas com AO incorporado em função da temperatura também foi realizada, Figura 6.11. Os resultados mostram um aumento do tamanho e na distribuição das espécies no meio com o aumento da temperatura. Comparando os sistemas, o aumento é notavelmente maior para o sistema AO/F-127. Com relação ao aumento do tamanho, este resultado confirma que o aumento da temperatura influencia mais no aumento do número de agregação em relação à desidratação da micela, para o F-127, como verificado nos resultados de RLS.



**Figura 6.11.** Medidas de DLS de copolímeros (8%) em função da temperatura, na presença de AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. **A)** AO/P-123. **B)** AO/F-127.

Na Tabela 6.3 segue os valores de TMC encontrados por todas as técnicas óticas e de espalhamento de luz discutidas acima e as técnicas eletroquímicas discutidas no Capítulo 5, apenas para a condição de alta concentração de AO. Nas técnicas onde foi possível observar a TMC pela variação de mais de uma propriedade, calculou-se a TMC média.

**Tabela 6.3.** Valores de TMC para os copolímeros (8%) com AO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, empregando-se várias técnicas.

TMC (°C)		
Técnicas	P-123	F-127
VPD	17,3	23,3
VC	20,0	25,0
UV-Vis	15,3	23,4
Fluorescência	15,2	23,1
Anisotropia	15,0	20,0
RLS	15,0	20,0
DLS	12,0	20,0
DSC*	16,0	24,0

\*Nas condições de 1% de copolímeros sem KCl (Alexandridis, Holzwarth et al. 1994, Wanka, Hoffmann et al. 1994).

Os resultados mostram uma concordância com os valores de TMC encontrados empregando as técnicas eletroquímicas, sendo que dentre elas a técnica de VPD apresentou melhores valores. Os valores de TMC encontrados estão próximos aos encontrados por Alexandridis e Wanka, em condições experimentais semelhantes, empregando fluorescência tendo DPH como sonda e DSC. Desta forma, fica confirmado a viabilidade de se empregar técnicas eletroquímicas, em especial a VPD, na determinação da TMC, mostrando uma sensibilidade equivalente à técnica de fluorescência, considerada uma das técnicas óticas com maior sensibilidade no meio científico. Adicionalmente, as técnicas eletroquímicas mostraram-se úteis na avaliação do comportamento molecular dos sistemas AO/copolímeros com a temperatura.

#### 6.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Nas condições de alta concentração, moléculas de AO no formulado, dependendo da temperatura, podem existir na forma autoagregada, ligadas a unímeros e/ou micelas de P-123 e F-127. A monomerização do AO em copolímeros ocorre em função do aumento da temperatura e da formação da micela. Micelas de F-127 são mais

fluidas, enquanto que micelas de P-123 são mais compactas, permitindo baixa mobilidade do AO incorporado.

Abaixo da TMC, tem-se unímeros ou pré-agregados micelares pequenos onde moléculas de AO estão interagindo na forma monomérica e/ou agregada. Acima da TMC, moléculas de AO interagem preferencialmente na forma monomérica com micelas, sendo que neste último caso, a população de entidades com tamanhos diferentes aumentam com o aumento da temperatura, especialmente para o F-127. Na região de temperatura intermediária, o tamanho das micelas com AO incorporado é modulado pelo efeito de desidratação e aumento do número de agregação, sendo que para o AO/F-127 este último efeito predomina. A incorporação de AO em micelas de P-123 e F-127, tende a reduzir o valor das TMC e aumentar o tamanho apenas das micelas de F-127.

Acima da TMC o micro ambiente do AO não é alterado significativamente, mesmo com a desidratação da micela, com o aumento da temperatura. Nesta região, o AO fica mais protegido de moléculas de água incorporado em micelas de P-123. Acima de 40,0 °C ocorre autoagregação micelar.

Nas condições de baixa concentração, apenas a técnica de UV-Vis não foi muito eficiente para avaliar os efeitos de autoagregação de copolímeros e consequentemente na determinação da TMC. Os experimentos realizados em alta concentração, apesar do efeito do filtro interno, aparentemente não afetam a interpretação molecular, contudo não altera os valores na determinação da TMC. Na comparação entre as condições efeito de filtro interno e ausência deste efeito, a interpretação molecular foi diferente apenas para a técnica de fluorescência, porem os valores de TMC foram semelhantes.

As técnicas de anisotropia de fluorescência e RLS, que são pouco empregadas, se mostraram úteis fornecendo informações valiosas sobre a mobilidade da sonda e autoagregação micelar.

Os valores de TMC encontrados pelos métodos óticos estão em concordância com os determinados por métodos eletroquímicos, principalmente em relação à VPD.

# **CAPÍTULO 7**

## Conclusão final e Perspectivas Futuras

O estudo da dinâmica molecular de moléculas de fenotiazínicos em meio aquoso e de copolímeros foi possível de ser investigada empregando técnicas eletroquímicas para suportar e complementar as observações verificadas por métodos óticos. Os copolímeros modificam as propriedades óticas, e especialmente, eletroquímicas do AO, possibilitando extrair novas informações a respeito da interação entre moléculas de AO e copolímeros de P-123 e F-127, e a auto agregação destes copolímeros em função da temperatura. As técnicas óticas validaram o método eletroquímico para a determinação da TMC.

Os métodos eletroquímicos forneceram um grande número de informações sobre os sistemas. Tais informações podem contribuir para a elucidação dos mecanismos de ligação entre fármacos e micelas e ajudar a entender processos de autoagregação de moléculas pequenas e grandes, formando estruturas supramoleculares, contribuindo assim para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas e novos materiais. A utilização de técnicas óticas juntamente com as técnicas eletroquímicas, refinaram os resultados e ajudaram significativamente na compreensão molecular dos fenômenos observados.

O presente estudo pode ser ampliado de muitas maneiras. Pode-se empregar a técnica de SAXS, para avaliar melhor o processo de autoagregação dos copolímeros com e sem AO incorporado em função da concentração e temperatura com intuito de confirmar os diferentes formatos dos copolímeros no meio.

Também é válido investigar as propriedades termodinâmicas de ligação com outra molécula sonda, com diferentes características estruturais, para compreender melhor comportamentos termodinâmicos peculiar nos sistemas AO/copolímeros.

É relevante avaliar a capacidade de liberação controlada de moléculas de AO incorporadas em copolímeros via técnicas eletroquímicas. Para isso, modificações no processo de formulação devem ser realizadas.

Os copolímeros não são eletroativos, portanto, houve a necessidade de uma sonda eletroquímica para avaliar sua autoagregação em função da temperatura. Existe a possibilidade de ancorar espécies eletroativas nos unímeros, tornando-os assim eletroativos. Assim, a mesma avaliação poderia ser executada, porem sem a utilização da sonda, fornecendo informações importantes sobre as interações dos unímeros em meio aquoso e aglomerado numa micela.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bard, Allen J., *et al.* Electrochemical methods: fundamentals and applications. Vol. 2. New York: Wiley, 1980.

Aaron, J.-J., M. Maafi, C. Kersebet, C. Párkányi, M. S. Antonious and N. Motohashi (1996). "A solvatochromic study of new benzo[a]phenothiazines for the determination of dipole moments and specific solute—solvent interactions in the first excited singlet state." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **101**(2): 127-136.

Abel, E. W., N. J. Long, K. G. Orrell, A. G. Osborne and V. Šik (1991). "Dynamic NMR studies of ring rotation in substituted ferrocenes and ruthenocenes." Journal of organometallic chemistry **403**(1-2): 195-208.

Al-Majmaie, R., N. Alattar, D. Zerulla and M. Al-Rubeai (2012). Toluidine blue O-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cultured colon cancer. SPIE Photonics Europe, International Society for Optics and Photonics.

Al-Majmaie, R., N. Alattar, D. Zerulla and M. Al-Rubeai (2012). Toluidine blue O-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cultured colon cancer.

Alexandridis, P. and T. Alan Hatton (1995). "Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **96**(1): 1-46.

Alexandridis, P. and J. F. Holzwarth (1997). "Differential scanning calorimetry investigation of the effect of salts on aqueous solution properties of an amphiphilic block copolymer (Ploxamer)." Langmuir **13**(23): 6074-6082.

Alexandridis, P., J. F. Holzwarth and T. A. Hatton (1994). "Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association." Macromolecules **27**(9): 2414-2425.

Alexandridis, P., T. Nivaggioli and T. A. Hatton (1995). "Temperature effects on structural properties of Pluronic P104 and F108 PEO-PPO-PEO block copolymer solutions." Langmuir **11**(5): 1468-1476.

Amat-Guerri, F., M. Lopez-Gonzalez and R. Sastre (1990). "Spectrophotometric determination of ionization and isomerization constants of Rose Bengal, eosin Y and some derivatives." Dyes and Pigments **13**(3): 219-232.

Andrés F., O., C. Héctor, E. Luis and A. Betsabe (2014). "Solubilization of P-alkylphenols in pluronics F-68 and F-127 micelles: partition coefficients and effect of solute on the aggregate structure." Journal of the Chilean Chemical Society **59**: 2451-2454

Anglister, J. and I. Steinberg (1983). "Resonance Rayleigh scattering of cyanine dyes in solution." The Journal of Chemical Physics **78**(9): 5358-5368.

Attwood, D., J. H. Collett and C. J. Tait (1985). "The micellar properties of the poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution." International Journal of Pharmaceutics **26**(1): 25-33.

Barbosa, L. R., R. Itri, W. Caetano, D. de Sousa Neto and M. Tabak (2008). "Self-assembling of phenothiazine compounds investigated by small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance spectroscopy." The Journal of Physical Chemistry B **112**(14): 4261-4269.

Barrado, E., R. Couto, M. Quinaz, J. Lima and Y. Castrillejo (2014). "Electrochemical behaviour of ferrocene in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, EMIMBF 4, at 298K." Journal of Electroanalytical Chemistry **720**: 139-146.

Basak, R. and R. Bandyopadhyay (2013). "Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and pH." Langmuir **29**(13): 4350-4356.

Ben-Naim, A. (1980). Hydrophobic Interactions.

Berardi, M. (2010). Análogos fluorescentes de agentes antiparasitários: interações com agregados anfífilos, Universidade de São Paulo.

Blankschtein, D., G. M. Thurston and G. B. Benedek (1986). "Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions." The Journal of chemical physics **85**(12): 7268-7288.

Bohorquez, M., C. Koch, T. Trygstad and N. Pandit (1999). "A study of the temperature-dependent micellization of pluronic F127." Journal of colloid and interface science **216**(1): 34-40.

Braga, G. (2014). “Propriedades Físico Químicas do Fenotiazínico Azul de Ortotoluidina em sistemas homogêneos e copoliméricos de P-123 e F-127” Dissertação de Mestrado.

Brainina, K. Z. (1987). "Advances in voltammetry." Talanta **34**(1): 41-50.

Brett, C. M. A., Brett, Ana M. O. (1996). Electroquímica, Princípios, Métodos e Aplicações. New York, Oxford University Press Inc.

Brett, C. M. A. and A. M. Oliveira-Brett (2011). "Electrochemical sensing in solution—origins, applications and future perspectives." Journal of Solid State Electrochemistry **15**(7): 1487-1494.

Brown, W., K. Schillen, M. Almgren, S. Hvidt and P. Bahadur (1991). "Micelle and gel formation in a poly (ethylene oxide)/poly (propylene oxide)/poly (ethylene oxide) triblock copolymer in water solution: dynamic and static light scattering and oscillatory shear measurements." The Journal of Physical Chemistry **95**(4): 1850-1858.

Buschmann, H.-J. and E. Schollmeyer (2002). "Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review." Journal of cosmetic science **53**(3): 185-192.

Butler, J. (1924). "Studies in heterogeneous equilibria. Part II.—The kinetic interpretation of the nernst theory of electromotive force." Transactions of the Faraday Society **19**(March): 729-733.

Cau, F. and S. Lacelle (1996). "<sup>1</sup>H NMR Relaxation Studies of the Micellization of a Poly (ethylene oxide)-Poly (propylene oxide)-Poly (ethylene oxide) Triblock Copolymer in Aqueous Solution." Macromolecules **29**(1): 170-178.

Chakraborty, A., S. Ahmed and S. K. Saha (2010). "Electrochemical Studies of Progressively Alkylated Thiazine Dyes on a Glassy Carbon Electrode (GCE) in Water, Ethanol, and Triton X-100 Media†." Journal of Chemical & Engineering Data **55**(5): 1908-1913.

Chandrashekar, B., B. K. Swamy, K. V. Mahesh, U. Chandra and B. Sherigara (2009). "Electrochemical studies of bromothymol blue at surfactant modified carbon paste electrode by using cyclic voltammetry." Int. J. Electrochem. Sci **4**: 471-480.

Charlton, I. D. and A. P. Doherty (2000). "Voltammetry as a tool for monitoring micellar structural evolution?" Analytical chemistry **72**(4): 687-695.

Cheema, M. A., S. Barbosa, P. Taboada, E. Castro, M. Siddiq and V. Mosquera (2006). "A thermodynamic study of the amphiphilic phenothiazine drug thioridazine hydrochloride in water/ethanol solvent." Chemical Physics **328**(1-3): 243-250.

Chen, Z., A. Lohr, C. R. Saha-Moller and F. Wurthner (2009). "Self-assembled [small pi]-stacks of functional dyes in solution: structural and thermodynamic features." Chemical Society Reviews **38**(2): 564-584.

Chen, Z., A. Lohr, C. R. Saha-Möller and F. Würthner (2009). "Self-assembled  $\pi$ -stacks of functional dyes in solution: structural and thermodynamic features." Chemical Society Reviews **38**(2): 564-584.

Chen, Z., V. Stepanenko, V. Dehm, P. Prins, L. D. Siebbeles, J. Seibt, P. Marquetand, V. Engel and F. Würthner (2007). "Photoluminescence and Conductivity of Self-Assembled  $\pi$ - $\pi$  Stacks of Perylene Bisimide Dyes." Chemistry—A European Journal **13**(2): 436-449.

Chevalier, Y. and T. Zemb (1990). "The structure of micelles and microemulsions." Reports on Progress in Physics **53**(3): 279.

Chiappetta, D. A. and A. Sosnik (2007). "Poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **66**(3): 303-317.

Chung, C. Y. S., S. i. Tamaru, S. Shinkai and V. W. W. Yam (2015). "Supramolecular Assembly of Achiral Alkynylplatinum (II) Complexes and Carboxylic  $\beta$ -1, 3-Glucan into Different Helical Handedness Stabilized by Pt... Pt and/or  $\pi$ - $\pi$  Interactions." Chemistry—A European Journal **21**(14): 5447-5458.

- Cincotta, L., J. W. Foley, T. MacEachern, E. Lampros and A. H. Cincotta (1994). "Novel Photodynamic Effects of a Benzophenothiazine on Two Different Murine Sarcomas." Cancer Research **54**(5): 1249-1258.
- Croy, S. R. and G. S. Kwon (2004). "The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin." J Control Release **95**(2): 161-171.
- Čudina, O., J. Brborić, I. Janković, K. Karljiković-Rajić and S. Vladimirov (2008). "Study of valsartan interaction with micelles as a model system for biomembranes." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **65**(1): 80-84.
- De, M., S. C. Bhattacharya, S. P. Moulik and A. K. Panda (2010). "Interfacial composition, structural and thermodynamic parameters of water/(surfactant+ n-butanol)/n-heptane water-in-oil microemulsion formation in relation to the surfactant chain length." Journal of Surfactants and Detergents **13**(4): 475-484.
- de Menezes, H. D., G. B. Rodrigues, S. d. P. Teixeira, N. S. Massola, L. Bachmann, M. Wainwright and G. U. L. Braga (2014). "In Vitro Photodynamic Inactivation of Plant-Pathogenic Fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with Novel Phenothiazinium Photosensitizers." Applied and Environmental Microbiology **80**(5): 1623-1632.
- de Souza, D., S. A. Machado and L. A. Avaca (2003). "Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos." Química Nova **26**(1): 81-89.
- Degtyarev, Y. N. and S. Schlick (1999). "Diffusion coefficients of small molecules as guests in various phases of Pluronic L64 measured by one-dimensional electron spin resonance imaging." Langmuir **15**(15): 5040-5047.
- Devanathan, M. and J. OLM (1963). Bockris and K. MULLER. Proc. Roy. Soc., London A.
- Dey, J., S. Kumar, S. Nath, R. Ganguly, V. Aswal and K. Ismail (2014). "Additive induced core and corona specific dehydration and ensuing growth and interaction of Pluronic F127 micelles." Journal of colloid and interface science **415**: 95-102.
- Di Pietro, G., M. Palombo and S. Capuani (2014). "Internal magnetic field gradients in heterogeneous porous systems: comparison between Spin-Echo and Diffusion Decay Internal Field (DDIF) method." Applied Magnetic Resonance **45**(8): 771-784.
- Donnelly, R. F., P. A. McCarron, M. M. Tunney and A. David Woolfson (2007). "Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O." J Photochem Photobiol B **86**(1): 59-69.
- Dutra, L. M. U., M. E. N. P. Ribeiro, I. M. Cavalcante, D. H. A. d. Brito, L. d. M. Semião, R. F. d. Silva, P. B. A. Fechine, S. G. Yeates and N. M. P. S. Ricardo (2015). "Binary mixture micellar systems of F127 and P123 for griseofulvin solubilisation." Polímeros **25**(5): 433-439.
- Edward, J. T. (1970). "Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation." J. chem. Educ **47**(4): 261.

Enache, M., D. Bulcu, I. Serbanescu and E. Volanschi (2007). "Interaction of actinomycin D with anionic surfactant, sodium dodecyl sulphate: spectral and electrochemical investigations." Rev. Roum. Chim **52**(8-9): 725-731.

Erdey-Gruz, T. and M. Volmer (1930). "Zur theorie der wasserstoffüberspannung." Z. Phys. Chem. A **150**: 203.

Erdogan, D. A., I. H. Taşdemir, N. Erk and E. Kiliç (2011). "Electrochemical behavior of Moclobemide at mercury and glassy carbon electrodes and voltammetric methods for its determination." Collection of Czechoslovak Chemical Communications **76**(5): 423-442.

Faeder, J. and B. Ladanyi (2000). "Molecular dynamics simulations of the interior of aqueous reverse micelles." The Journal of Physical Chemistry B **104**(5): 1033-1046.

Fan, L., M. Degen, N. Grupido, S. Bendle and P. Pennartz (2010). "Effects of molecular weight, temperature and salt on the self assembly of triblock copolymer solutions." Materials Science and Engineering: A **528**(1): 127-136.

Ferreira, T. L., O. A. El Seoud and M. Bertotti (2004). "A microelectrode voltammetric study of the diffusion of CTABr aggregates in aqueous solutions." Electrochimica acta **50**(4): 1065-1070.

Foster, B., T. Cosgrove and B. Hammouda (2009). "Pluronic triblock copolymer systems and their interactions with ibuprofen." Langmuir **25**(12): 6760-6766.

Friedlander, S. K. (1977). "Smoke, dust and haze: Fundamentals of aerosol behavior." New York, Wiley-Interscience, 1977. 333 p. 1.

Ganguly, R., K. Kuperkar, P. Parekh, V. Aswal and P. Bahadur (2012). "Phenol solubilization in aqueous Pluronic® solutions: Investigating the micellar growth and interaction as a function of Pluronic® composition." Journal of colloid and interface science **378**(1): 118-124.

Ghanadzadeh, A., A. Zeini, A. Kashef and M. Moghadam (2008). "Concentration effect on the absorption spectra of oxazine1 and methylene blue in aqueous and alcoholic solutions." Journal of Molecular Liquids **138**(1): 100-106.

Glatter, O., G. Scherf, K. Schillen and W. Brown (1994). "Characterization of a poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide) triblock copolymer (EO27-PO39-EO27) in aqueous solution." Macromolecules **27**(21): 6046-6054.

Gogoi, S., H. Borah, R. R. Dutta and P. Puzari (2015). "Evaluation of Diffusion Coefficient of Thiocholine in Enzyme-Loaded Polypyrrole Composite Film through Different Methods and Electrode Polarization." The Journal of Physical Chemistry B **119**(13): 4749-4757.

Goldmints, I., F. K. von Gottberg, K. A. Smith and T. A. Hatton (1997). "Small-angle neutron scattering study of PEO-PPO-PEO micelle structure in the unimer-to-micelle transition region." Langmuir **13**(14): 3659-3664.

Goldmints, I., G.-e. Yu, C. Booth, K. A. Smith and T. A. Hatton (1999). "Structure of (deuterated PEO)-(PPO)-(deuterated PEO) block copolymer micelles as determined by small angle neutron scattering." Langmuir **15**(5): 1651-1656.

Gosser, D. K. (1993). Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms, VCH New York.

Gouy, M. (1910). "Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte." J. Phys. Theor. Appl. **9**(1): 457-468.

Grahame, D. C. (1947). "The electrical double layer and the theory of electrocapillarity." Chemical reviews **41**(3): 441-501.

Guang, J., R. Hopson and P. G. Williard (2015). "Diffusion Coefficient-Formula Weight (D-FW) Analysis of 2H Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY)." The Journal of organic chemistry **80**(18): 9102-9107.

Guo, C., J. Wang, H.-z. Liu and J.-y. Chen (1999). "Hydration and conformation of temperature-dependent micellization of PEO-PPO-PEO block copolymers in aqueous solutions by FT-Raman." Langmuir **15**(8): 2703-2708.

Guzmán, M., F. F. García, J. Molpeceres and M. R. Aberturas (1992). "Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer gels as sustained release vehicles for subcutaneous drug administration." International Journal of Pharmaceutics **80**(1): 119-127.

Hagiwara, K., M. Akita and M. Yoshizawa (2015). "An aqueous molecular tube with polyaromatic frameworks capable of binding fluorescent dyes." Chemical Science **6**(1): 259-263.

Hammouda, B. (2010). "SANS from Pluronic P85 in d-water." European Polymer Journal **46**(12): 2275-2281.

Haque, M. A., M. M. Rahman and M. A. B. H. Susan (2011). "Aqueous electrochemistry of anthraquinone and its correlation with the dissolved states of a cationic surfactant." Journal of Solution Chemistry **40**(5): 861-875.

Hashmi, S. N., X. Hu, C. E. Immoos, S. J. Lee and M. W. Grinstaff (2002). "Synthesis and Characterization of  $\pi$ -Stacked Phenothiazine-Labeled Oligodeoxynucleotides." Organic letters **4**(26): 4571-4574.

Hecht, E. and H. Hoffmann (1995). "Kinetic and calorimetric investigations on micelle formation of block copolymers of the poloxamer type." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **96**(1): 181-197.

Helmholtz, H. v. (1853). "Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche." Annalen der Physik **165**(6): 211-233.

Henstridge, M. C., E. Laborda, E. J. Dickinson and R. G. Compton (2012). "Redox systems obeying Marcus-Hush-Chidsey electrode kinetics do not obey the Randles-

Ševčík equation for linear sweep voltammetry." Journal of Electroanalytical Chemistry **664**: 73-79.

Hiemenz, P. C. (1986). Principles of Colloid and Surface Chemistry.

Hioka, N., R. K. Chowdhary, N. Chansarkar, D. Delmarre, E. Sternberg and D. Dolphin (2002). "Studies of a benzoporphyrin derivative with Pluronics." Canadian Journal of Chemistry **80**(10): 1321-1326.

Hoffmann, A. A., S. L. P. Dias, E. V. Benvenutti, E. C. Lima, F. A. Pavan, J. R. Rodrigues, R. Scotti, E. S. Ribeiro and Y. Gushikem (2007). "Cationic dyes immobilized on cellulose acetate surface modified with titanium dioxide: factorial design and an application as sensor for NADH." Journal of the Brazilian Chemical Society **18**: 1462-1472.

Horenc, D. A. a. A. T. (1983). Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology.

Hrabe, J., G. Kaur and D. N. Guilfoyle (2007). "Principles and limitations of NMR diffusion measurements." Journal of medical physics/Association of Medical Physicists of India **32**(1): 34.

Huang, C. Z., K. A. Li and S. Y. Tong (1996). "Determination of nucleic acids by a resonance light-scattering technique with  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tetrakis [4-(trimethylammonium) phenyl] porphine." Analytical chemistry **68**(13): 2259-2263.

Huang, C. Z., K. A. Li and S. Y. Tong (1997). "A Resonance Light-Scattering Analysis of the Suprahelical Helices of Nucleic Acids Induced by 5, 10, 15, 20-Tetrakis (4-(trimethylammonio) phenyl) porphine." Bulletin of the Chemical Society of Japan **70**(8): 1843-1849.

Huang, C. Z., Y. F. Li, N. Li, K. A. Li and S. Y. Tong (1998). "Spectral Characteristics of the Aggregation of ALPHA., BETA., GAMMA., DELTA.-Tetrakis (p-sulfophenyl) porphyrin in the Presence of Proteins." Bulletin of the Chemical Society of Japan **71**(8): 1791-1797.

Huang, C. Z., Y. F. Li and X. D. Liu (1998). "Determination of nucleic acids at nanogram levels with safranin T by a resonance light-scattering technique." Analytica chimica acta **375**(1): 89-97.

Huang, C. Z., J. X. Zhu, K. A. Li and S. Y. TONG (1997). "Determination of Albumin and Globulin at Nanogram Levels by a Resonance Light-Scattering Technique with ALPHA., BETA., GAMMA., DELTA.-Tetrakis (4-sulfophenyl) porphine." Analytical sciences **13**(2): 263-268.

Hunter, R. J. (1987). Foundations of Colloid Science.

Hutchison, J. E., T. A. Postlethwaite, C.-h. Chen, K. W. Hathcock, R. S. Ingram, W. Ou, R. W. Linton, R. W. Murray, D. A. Tyvoll and L. L. Chng (1997). "Electrocatalytic activity of an immobilized cofacial diporphyrin depends on the electrode material." Langmuir **13**(7): 2143-2148.

Hvidt, S., E. B. Joergensen, W. Brown and K. Schillen (1994). "Micellization and gelation of aqueous solutions of a triblock copolymer studied by rheological techniques and scanning calorimetry." The Journal of Physical Chemistry **98**(47): 12320-12328.

Israelachvili, J. N. (2011). Intermolecular and surface forces: revised third edition, Academic press.

Jiao, K., Q.-J. Li, W. Sun and Z.-Y. Wang (2005). "Electrochemical studies of the recognition interaction of Rhodamine B with DNA." Chinese Chemical Letters **16**(3): 382-384.

Jones, M.-C. and J.-C. Leroux (1999). "Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **48**(2): 101-111.

Jørgensen, E. B., S. Hvidt, W. Brown and K. Schillen (1997). "Effects of salts on the micellization and gelation of a triblock copolymer studied by rheology and light scattering." Macromolecules **30**(8): 2355-2364.

Kabanov, A. V., E. V. Batrakova and V. Y. Alakhov (2002). "Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 759-779.

Kabanov, A. V., E. V. Batrakova, N. S. Melik-Nubarov, N. A. Fedoseev, T. Y. Dorodnich, V. Y. Alakhov, V. P. Chekhonin, I. R. Nazarova and V. A. Kabanov (1992). "A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain." Journal of Controlled Release **22**(2): 141-157.

Kadam, Y., U. Yerramilli and A. Bahadur (2009). "Solubilization of poorly water-soluble drug carbamazepine in Pluronic® micelles: Effect of molecular characteristics, temperature and added salt on the solubilizing capacity." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **72**(1): 141-147.

Kamei, D. T., D. I. Wang and D. Blankshtein (2002). "Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems." Langmuir **18**(8): 3047-3057.

Kamyabi, M. A. and M. A. Shafiee (2012). "Electrocatalytic oxidation of dopamine, ascorbic acid and uric acid at poly(2, 6 diaminopyridine) on the surface of carbon nanotubes/gc electrodes." Journal of the Brazilian Chemical Society **23**(4): 593-601.

Kasha, M., H. Rawls and M. Ashraf El-Bayoumi (1965). "The exciton model in molecular spectroscopy." Pure and Applied Chemistry **11**(3-4): 371-392.

Kastler, M., W. Pisula, D. Wasserfallen, T. Pakula and K. Müllen (2005). "Influence of Alkyl Substituents on the Solution-and Surface-Organization of Hexa-p erihexabenzocoronenes." Journal of the American Chemical Society **127**(12): 4286-4296.

Kedar, U., P. Phutane, S. Shidhaye and V. Kadam (2010). "Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **6**(6): 714-729.

Kissinger, P. and W. R. Heineman (1996). Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded, CRC press.

Kwon, G. S. (2003). "Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **20**(5): 357-403.

Lakowicz, J. (1999). Principles of fluorescence microscopy, Kluwer Academic, New York.

Lam, Y.-M., N. Grigorieff and G. Goldbeck-Wood (1999). "Direct visualisation of micelles of Pluronic block copolymers in aqueous solution by cryo-TEM." Physical Chemistry Chemical Physics **1**(14): 3331-3334.

Laviron, E. (1979). "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems." Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry **101**(1): 19-28.

Lei, T., Z.-H. Guo, C. Zheng, Y. Cao, D. Liang and J. Pei (2012). "How does a supramolecular polymeric nanowire form in solution?" Chemical Science **3**(4): 1162-1168.

Leiras, S., F. Freire, E. Quiñoá and R. Riguera (2015). "Reversible assembly of enantiomeric helical polymers: from fibers to gels." Chemical Science **6**(1): 246-253.

Liang, X., C. Guo, J. Ma, J. Wang, S. Chen and H. Liu (2007). "Temperature-dependent aggregation and disaggregation of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer in aqueous solution." The Journal of Physical Chemistry B **111**(46): 13217-13220.

Lin, S. Y. and Y. Kawashima (1985). "The influence of three poly(oxyethylene)poly(oxypropylene) surface-active block copolymers on the solubility behavior of indomethacin." Pharm Acta Helv **60**(12): 339-344.

Linse, P. and M. Malmsten (1992). "Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions." Macromolecules **25**(20): 5434-5439.

Liu, J., A. Zou and B. Mu (2010). "Toluidine blue: Aggregation properties and distribution behavior in surfactin micelle solution." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **75**(2): 496-500.

Liu, W. and R. Guo (2006). "Interaction between flavonoid, quercetin and surfactant aggregates with different charges." J Colloid Interface Sci **302**(2): 625-632.

Lopes, J. R. and W. Loh (1998). "Investigation of self-assembly and micelle polarity for a wide range of ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide block copolymers in water." Langmuir **14**(4): 750-756.

Ma, J.-h., C. Guo, Y.-l. Tang and H.-z. Liu (2007). "<sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigations on the micellization and gelation of PEO-PPO-PEO block copolymers in aqueous solutions." Langmuir **23**(19): 9596-9605.

- Ma, J., C. Guo, Y. Tang, J. Wang, L. Zheng, X. Liang, S. Chen and H. Liu (2006). "Microenvironmental and conformational structure of triblock copolymers in aqueous solution by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy." Journal of colloid and interface science **299**(2): 953-961.
- Macchioni, A., G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia and D. Zuccaccia (2008). "Determining accurate molecular sizes in solution through NMR diffusion spectroscopy." Chemical Society Reviews **37**(3): 479-489.
- Mackay, R. A. (1994). "Electrochemistry in association colloids." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **82**(1): 1-28.
- Mahmud, I., A. Samed, M. A. Haque and M. A. B. H. Susan (2011). "Electrochemical behavior of anthraquinone in aqueous solution in presence of a non-ionic surfactant." Journal of Saudi Chemical Society **15**(3): 203-208.
- Malmsten, M. and B. Lindman (1992). "Self-assembly in aqueous block copolymer solutions." Macromolecules **25**(20): 5440-5445.
- Mariani, G., D. Moldenhauer, R. Schweins and F. Gröhn (2016). "Elucidating Electrostatic Self-Assembly: Molecular Parameters as Key to Thermodynamics and Nanoparticle Shape." Journal of the American Chemical Society **138**(4): 1280-1293.
- Marrink, S. J. and A. E. Mark (2003). "Molecular dynamics simulation of the formation, structure, and dynamics of small phospholipid vesicles." Journal of the American Chemical Society **125**(49): 15233-15242.
- Mata, J. P., P. R. Majhi, C. Guo, H. Z. Liu and P. Bahadur (2005). "Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media." Journal of Colloid and Interface Science **292**(2): 548-556.
- Mayerhöffer, U. and F. Würthner (2012). "Cooperative self-assembly of squaraine dyes." Chemical Science **3**(4): 1215-1220.
- Metzroth, T., A. Hoffmann, R. Martín-Rapún, M. M. Smulders, K. Pieterse, A. R. Palmans, J. A. Vekemans, E. Meijer, H. W. Spiess and J. Gauss (2011). "Unravelling the fine structure of stacked bipyridine diamine-derived C 3-discotics as determined by X-ray diffraction, quantum-chemical calculations, Fast-MAS NMR and CD spectroscopy." Chemical Science **2**(1): 69-76.
- Miller, G. A. (1978). "Fluctuation theory of the resonance enhancement of Rayleigh scattering in absorbing media." The Journal of Physical Chemistry **82**(5): 616-618.
- Miller, S. C. and B. R. Drabik (1984). "Rheological properties of poloxamer vehicles." International Journal of Pharmaceutics **18**(3): 269-276.
- Miranda, J. C. d., T. E. A. Martins, F. Veiga and H. G. Ferraz (2011). "Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs." Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences **47**(4): 665-681.
- Miyata, K., R. J. Christie and K. Kataoka (2011). "Polymeric micelles for nano-scale drug delivery." Reactive and Functional Polymers **71**(3): 227-234.

- Molina, Á., E. Laborda, E. I. Rogers, F. Martínez-Ortiz, C. Serna, J. G. Limon-Petersen, N. V. Rees and R. G. Compton (2009). "Theoretical and experimental study of Differential Pulse Voltammetry at spherical electrodes: Measuring diffusion coefficients and formal potentials." Journal of Electroanalytical Chemistry **634**(2): 73-81.
- Mortensen, K., W. Batsberg and S. Hvidt (2008). "Effects of PEO-PPO diblock impurities on the cubic structure of aqueous PEO-PPO-PEO pluronic micelles: fcc and bcc ordered structures in F127." Macromolecules **41**(5): 1720-1727.
- Mortensen, K. and Y. Talmon (1995). "Cryo-TEM and SANS microstructural study of pluronic polymer solutions." Macromolecules **28**(26): 8829-8834.
- Nelson, A. and T. Cosgrove (2004). "Dynamic Light Scattering Studies of Poly(ethylene oxide) Adsorbed on Laponite: Layer Conformation and Its Effect on Particle Stability." Langmuir **20**(24): 10382-10388.
- Nguyen, T.-Q., R. Martel, P. Avouris, M. L. Bushey, L. Brus and C. Nuckolls (2004). "Molecular interactions in one-dimensional organic nanostructures." Journal of the American Chemical Society **126**(16): 5234-5242.
- Ni, C. L. and F. C. Anson (1985). "Relation between the potentials where adsorbed and unadsorbed cobalt (III) tetrakis (N-methylpyridinium-4-yl) porphyrin is reduced and those where it catalyzes the electroreduction of dioxygen." Inorganic Chemistry **24**(26): 4754-4756.
- Nilsson, M., C. Cabaleiro-Lago, A. J. Valente and O. Söderman (2006). "Interactions between gemini surfactants, 12-s-12, and  $\beta$ -cyclodextrin as investigated by NMR diffusometry and electric conductometry." Langmuir **22**(21): 8663-8669.
- Ohlow, M. J. and B. Moosmann (2011). "Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure." Drug Discovery Today **16**(3-4): 119-131.
- Ong, S.-A., E. Toorisaka, M. Hirata and T. Hano (2005). "Biodegradation of redox dye Methylene Blue by up-flow anaerobic sludge blanket reactor." Journal of hazardous materials **124**(1): 88-94.
- Osteryoung, J. G. and R. A. Osteryoung (1985). "Square wave voltammetry." Analytical Chemistry **57**(1): 101A-110A.
- Paduszek, B. and M. K. Kalinowski (1983). "Redox behaviour of phenothiazine and phenazine in organic solvents." Electrochimica Acta **28**(5): 639-642.
- Pasternack, R. F., C. Bustamante, P. J. Collings, A. Giannetto and E. J. Gibbs (1993). "Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique." Journal of the American Chemical Society **115**(13): 5393-5399.
- Pasternack, R. F. and P. J. Collings (1995). "Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation." Science **269**(5226): 935.
- Pasternack, R. F., K. F. Schaefer and P. Hambright (1994). "Resonance light-scattering studies of porphyrin diacid aggregates." Inorganic Chemistry **33**(9): 2062-2065.

- Peloi, L. S., C. E. G. Biondo, E. Kimura, M. J. Politi, M. V. C. Lonardoni, S. M. A. Aristides, R. C. C. Dorea, N. Hioka and T. G. V. Silveira (2011). "Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*." Experimental parasitology **128**(4): 353-356.
- Peng, L., A. Feng, M. Huo and J. Yuan (2014). "Ferrocene-based supramolecular structures and their applications in electrochemical responsive systems." Chemical Communications **50**(86): 13005-13014.
- Perez, L. A., J. T. Rogers, M. A. Brady, Y. Sun, G. C. Welch, K. Schmidt, M. F. Toney, H. Jinnai, A. J. Heeger and M. L. Chabinyc (2014). "The role of solvent additive processing in high performance small molecule solar cells." Chemistry of Materials **26**(22): 6531-6541.
- Perussi, J. R. (2007). "Inativação fotodinâmica de microrganismos." Química Nova **30**: 988-994.
- Popescu, O. and A. Grigoriu (2012). "Inclusion complexes of promethazine with monochlorotriazinyl- $\beta$ -cyclodextrin." Cellulose Chemistry and Technology **46**(5): 295.
- Prasad, K. N., T. T. Luong, A. T. F. Paris, C. Vaution, M. Seiller and F. Puisieux (1979). "Surface activity and association of ABA polyoxyethylene—polyoxypropylene block copolymers in aqueous solution." Journal of Colloid and Interface science **69**(2): 225-232.
- Raj, C. R. and R. Ramaraj (1996). "Electrochemistry and photoelectrochemistry of phenothiazine dye— $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes." Journal of Electroanalytical Chemistry **405**(1): 141-147.
- Rassing, J. and D. Attwood (1982). "Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene—polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution." International Journal of Pharmaceutics **13**(1): 47-55.
- Rassing, J., Mackenna, W., Bandyopadhyay, S., and Eyring, E. (1984). J. Mol. Liquid. **27**: 165-178.
- Rassing, J., W. McKenna, S. Bandyopadhyay and E. Eyring (1984). "Ultrasonic and <sup>13</sup>C-NMR studies on gel formation in aqueous solutions of the ABA block polymer Pluronic RF 127." Journal of molecular liquids **27**(3-4): 165-178.
- Reddy, N. K., P. J. Fordham, D. Attwood and C. Booth (1990). "Association and surface properties of block-copoly-(oxyethylene/oxypropylene/oxyethylene) L64." Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions **86**(9): 1569-1572.
- Rusling, J. F. (1997). "Molecular aspects of electron transfer at electrodes in micellar solutions." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **123**: 81-88.
- Sarkar, M. and S. Poddar (1999). "Spectral studies of methyl violet in aqueous solutions of different surfactants in supermicellar concentration region." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **55**(9): 1737-1742.

- Schenning, A. P. and E. Meijer (2005). "Supramolecular electronics; nanowires from self-assembled  $\pi$ -conjugated systems." Chemical communications(26): 3245-3258.
- Schenning, A. P. H. J. and E. W. Meijer (2005). "Supramolecular electronics; nanowires from self-assembled [small pi]-conjugated systems." Chemical Communications(26): 3245-3258.
- Schmolka, I. R. (1977). "A review of block polymer surfactants." Journal of the American Oil Chemists' Society **54**(3): 110-116.
- Seiler, P. and J. Dunitz (1982). "Low-temperature crystallization of orthorhombic ferrocene: structure analysis at 98 K." Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry **38**(6): 1741-1745.
- Sezgin, Z., N. Yüksel and T. Baykara (2006). "Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs." European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **64**(3): 261-268.
- Sharma, M., H. Bansal and P. K. Gupta (2005). "Virulence of Pseudomonas aeruginosa Cells Surviving Photodynamic Treatment with Toluidine Blue." Current Microbiology **50**(5): 277-280.
- Sharma, P. K. and S. R. Bhatia (2004). "Effect of anti-inflammatories on Pluronic® F127: micellar assembly, gelation and partitioning." International journal of pharmaceutics **278**(2): 361-377.
- Shen, Z., Y. Jiang, T. Wang and M. Liu (2015). "Symmetry Breaking in the Supramolecular Gels of an Achiral Gelator Exclusively Driven by  $\pi$ - $\pi$  Stacking." Journal of the American Chemical Society **137**(51): 16109-16115.
- Shetty, A. S., J. Zhang and J. S. Moore (1996). "Aromatic  $\pi$ -Stacking in Solution as Revealed through the Aggregation of Phenylacetylene Macrocycles." Journal of the American Chemical Society **118**(5): 1019-1027.
- Singh, R., N. Bharti, J. Madan and S. Hiremath (2010). "Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review." J. Pharm. Sci. Technol **2**(3): 171-183.
- Siva, S., S. K. Nayaki and N. Rajendiran (2015). "Fabrication of cyclodextrins-procainamide supramolecular self-assembly: Shape-shifting of nanosheet into microtubular structure." Carbohydrate polymers **122**: 123-134.
- Skoog, D., F. Holler and T. Nieman (2002). Análise instrumental, Porto Alegre: Bookman.
- Stern, O. (1924). "Zur theorie der elektrolytischen doppelschicht." Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie **30**(21-22): 508-516.
- Su, Y.-l., H.-z. Liu, J. Wang and J.-y. Chen (2002). "Study of salt effects on the micellization of PEO-PPO-PEO block copolymer in aqueous solution by FTIR spectroscopy." Langmuir **18**(3): 865-871.

- Su, Y.-l., J. Wang and H.-z. Liu (2002). "FTIR spectroscopic investigation of effects of temperature and concentration on PEO-PPO-PEO block copolymer properties in aqueous solutions." Macromolecules **35**(16): 6426-6431.
- Sudeshna, G. and K. Parimal (2010). "Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: A review." European Journal of Pharmacology **648**(1-3): 6-14.
- Tanford, C. (1980). The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes.
- Tanford, C. (1980). The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes 2d Ed, J. Wiley.
- Tasdemir, I. H., A. Ece and E. Kilic (2012). "Experimental and theoretical study on the electrochemical behavior of zofenopril and its voltammetric determination." Current Pharmaceutical Analysis **8**(4): 339-348.
- Toader, A. M. and E. Volanschi (2007). "Electrochemical and spectral study of the hemin-surfactant interaction in solution." Revue Roumaine de Chimie **52**(1-2): 159-167.
- Tsai, T., H. F. Chien, T. H. Wang, C. T. Huang, Y. B. Ker and C. T. Chen (2011). "Chitosan augments photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria." Antimicrob Agents Chemother **55**(5): 1883-1890.
- Turro, N. J. and C. Chung (1984). "Photoluminescent probes for water soluble polymers. Pressure and temperature effects on a polyol surfactant." Macromolecules **17**(10): 2123-2126.
- Valdes-Aguilera, O. and D. Neckers (1989). "Aggregation phenomena in xanthenes dyes." Accounts of Chemical Research **22**(5): 171-177.
- Valente, A. J., M. Nilsson and O. Söderman (2005). "Interactions between n-octyl and n-nonyl  $\beta$ -D-glucosides and  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins as seen by self-diffusion NMR." Journal of colloid and interface science **281**(1): 218-224.
- van Nostrum, C. F. (2004). "Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy." Advanced drug delivery reviews **56**(1): 9-16.
- Vetter, K. J. (2013). Electrochemical kinetics: theoretical aspects, Elsevier.
- Wang, J. (2006). Analytical electrochemistry, John Wiley & Sons.
- Wang, S. and D. Du (2004). "Differential pulse voltammetry determination of ascorbic acid with ferrocene-L-cysteine self-assembled supramolecular film modified electrode." Sensors and Actuators B: Chemical **97**(2): 373-378.
- Wang, W., J. J. Han, L.-Q. Wang, L.-S. Li, W. J. Shaw and A. D. Li (2003). "Dynamic  $\pi$ - $\pi$  stacked molecular assemblies emit from green to red colors." Nano Letters **3**(4): 455-458.

Wanka, G., H. Hoffmann and W. Ulbricht (1994). "Phase diagrams and aggregation behavior of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene)-poly (oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions." Macromolecules **27**(15): 4145-4159.

Winnik, F. M., M. P. Breton and W. Riske (1992). Ink compositions, Google Patents.

Winnik, F. M., A. R. Davidson, J. W. P. Lin and M. D. Croucher (1992). Inks containing block copolymer micelles, Google Patents.

Yang, L., P. Alexandridis, D. C. Steytler, M. J. Kositzka and J. F. Holzwarth (2000). "Small-angle neutron scattering investigation of the temperature-dependent aggregation behavior of the block copolymer Pluronic L64 in aqueous solution." Langmuir **16**(23): 8555-8561.

Yazdani, O., M. Irandoust, J. B. Ghasemi and S. Hooshmand (2012). "Thermodynamic study of the dimerization equilibrium of methylene blue, methylene green and thiazole orange at various surfactant concentrations and different ionic strengths and in mixed solvents by spectral titration and chemometric analysis." Dyes and Pigments **92**(3): 1031-1041.

Ye, T., Y. He and E. Borguet (2006). "Adsorption and electrochemical activity: An in situ electrochemical scanning tunneling microscopy study of electrode reactions and potential-induced adsorption of porphyrins." The Journal of Physical Chemistry B **110**(12): 6141-6147.

Yu, G.-E., Y. Deng, S. Dalton, Q.-G. Wang, D. Attwood, C. Price and C. Booth (1992). "Micellisation and gelation of triblock copoly(oxyethylene/oxypropylene/oxyethylene), F127." Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions **88**(17): 2537-2544.

Zhang, G., S. Shuang, C. Dong and J. Pan (2003). "Study on the interaction of methylene blue with cyclodextrin derivatives by absorption and fluorescence spectroscopy." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **59**(13): 2935-2941.

Zhang, W., M. Chen and G. Diao (2011). "Preparation and electrochemical behavior of water-soluble inclusion complex of ferrocene with  $\beta$ -cyclodextrin polymer." Electrochimica Acta **56**(14): 5129-5136.

Zhang, X., J. K. Jackson and H. M. Burt (1996). "Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol." International Journal of Pharmaceutics **132**(1): 195-206.

Zhang, X. F., I. Zhang and L. Liu (2010). "Photophysics of halogenated fluoresceins: involvement of both intramolecular electron transfer and heavy atom effect in the deactivation of excited states." Photochemistry and photobiology **86**(3): 492-498.

Zhou, Z. and B. Chu (1988). "Light-scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution." Journal of Colloid and Interface Science **126**(1): 171-180.

Zhu, W., R. Zheng, X. Fu, H. Fu, Q. Shi, Y. Zhen, H. Dong and W. Hu (2015). "Revealing the Charge-Transfer Interactions in Self-Assembled Organic Cocystals:

Two-Dimensional Photonic Applications." Angewandte Chemie International Edition  
54(23): 6785-6789.