



Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Dissertação de Doutoramento

Consequências do Polimorfismo das  
Ceras Cuticulares Para a Função de  
Barreira da Cutícula Vegetal

---

Estudos em Sistemas Modelo

Laura Cristina da Silva Carreto

Faro, 2003



TESES  
SD



Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

# Consequências do Polimorfismo das Ceras Cuticulares Para a Função de Barreira da Cutícula Vegetal

---

Estudos em Sistemas Modelo

Laura Cristina da Silva Carreto

Faro, 2003

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

3243 T.

10/03/04 54233

577

CAR \* Con

1

Dissertação apresentada  
para obtenção do grau de  
Doutor em Química  
na especialidade de Bioquímica

---

*À minha família e aos meus amigos,  
infalíveis inspiradores, conspiradores e  
fornecedores de planos B.*

*Obrigada, por acreditarem que sempre  
consigo alcançar aquilo a que me  
proponho e por me acompanharem  
incansavelmente durante o caminho.*

## Agradeço,

Ao Professor Doutor Winchil Vaz, reconhecido mentor e orientador deste projecto, pelo acolhimento no seu laboratório e pelas inúmeras reflexões em ciência exacta e metafísica com que me desafiou, acendendo muitas luzes no meu espírito.

Aos meus colegas de laboratório, pela solicitude com que me ouviram, ajudaram, incentivaram e acompanharam sempre, mesmo depois do trabalho, no *Tropical*.

À D. Conceição Veloso, pela sua amizade e ajuda no bom funcionamento do laboratório.

À Professora Doutora Anabela Fernandes, pela sua contribuição e pelos recursos que disponibilizou no Instituto Superior Técnico de Lisboa para o desenvolvimento deste trabalho, bem como pela confiança e amizade demonstradas.

Ao Professor Doutor Rui Fausto pela disponibilização dos meios técnicos do seu laboratório de espectroscopia de infravermelho.

Ao Dr. João Cecílio, pela competente e indispensável ajuda técnica no laboratório de espectroscopia de infravermelho.

À Dra. Catarina Borrego, pelo seus ensinamentos e tempo dedicado às análises de espectroscopia de absorção atómica.

À Professora Doutora Mariete e suas colaboradoras, pela simpatia e disponibilização do equipamento de cromatografia gasosa.

Ao Professor Doutor António Calado, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pela sua contribuição na obtenção das imagens de microscopia electrónica de varrimento.

À Doutora Conceição Mateus, na qualidade de Professora da Área Departamental de Química da Universidade do Algarve, além de amiga, pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, à Fundação para a Ciência e Tecnologia, e ao programa PRODEP, pelo apoio logístico e financeiro concedido para a realização deste projecto.

# Índice

Introdução	1
Enquadramento do Trabalho Apresentado	
Capítulo 1	5
A Cutícula Vegetal, uma Barreira Difusional	
1.1 Origem, Estrutura e Composição.....	5
1.2 Função.....	10
1.3 Uma Barreira Difusional Heterogénea .....	12
1.3.1 Propriedades das ceras cuticulares.....	16
1.3.2 Modelo de organização molecular das ceras cuticulares .....	18
1.3.3 Factores que influenciam o transporte por dissolução na cutícula .....	20
1.3.4 Propriedades da matriz de cutina.....	22
1.3.5 Permeabilidade cuticular a electrólitos.....	24
1.3.6 Coexistência de mecanismos de transporte transcuticular .....	26
1.4 Investigação Necessária para Compreender a Cutícula .....	27
1.5 Contexto e Objectivos da Investigação Apresentada.....	30
1.6 A Cutícula de Tomate .....	31
Capítulo 2	37
Transporte Transcuticular de Iões e Pequenas Moléculas Polares	
2.1 Transporte Transcuticular .....	37
2.2 Membranas de Dissolução e Membranas Porosas.....	39
2.2.1 Transporte transcuticular por dissolução.....	43
2.2.2 Transporte transcuticular através de poros .....	44
2.2.3 Barreiras energéticas no transporte transcuticular.....	46
2.2.4 Selectividade e tortuosidade da cutícula.....	46
2.3 Objectivo do Trabalho.....	47
2.4 Métodos e Técnicas.....	49
2.4.1 Desenvolvimento de uma célula de permeação .....	46
2.4.2 Determinação de permeância e coeficiente aparente de difusão.....	50
2.4.3 Potenciometria.....	52
2.4.4 Espectrofotometria de absorção atómica.....	56
2.4.5 Cromatografia gasosa.....	58
2.5 Execução Experimental.....	60
2.5.1 Isolamento de membranas cuticulares.....	60

2.5.2 Verificação da integridade membranas .....	61
2.5.3 Medição de fluxo de iões .....	62
2.5.4 Medição de fluxo de álcoois .....	64
2.5.5 Calorimetria diferencial de varrimento .....	65
2.6 Resultados .....	65
2.6.1 Isolamento de membranas cuticulares .....	65
2.6.2 Teste de uma célula de permeação .....	66
2.6.3 Influência do gradiente de concentração na determinação de $P$ .....	69
2.6.4 Permeância e coeficiente aparente de difusão para protões .....	70
2.6.5 Controlo da integridade física das membranas .....	73
2.6.6 Permeância a uma série de catiões e aniões .....	73
2.6.7 Permeância a $H^+$ e a $Na^+$ em função da temperatura .....	77
2.6.8 Permeância a vários álcoois .....	80
2.6.9 Permeância a álcoois em função da temperatura .....	82
2.7 Discussão .....	84

## Capítulo 3 99

### Comportamento de Fases de uma Mistura Modelo para as Ceras da Cutícula Vegetal

3.1 A Barreira de Ceras Cuticulares .....	99
3.1.1 Sistema modelo de ceras cuticulares .....	101
3.1.2 Polimorfismo de $n$ -álcoois .....	102
3.2 Objectivo do Trabalho .....	104
3.3 Métodos e Técnicas .....	104
3.3.1 Calorimetria diferencial de varrimento .....	104
3.3.2 Espectroscopia vibracional com transformada de Fourier .....	106
3.3.3 Características de um sistema eutético .....	108
3.4 Execução Experimental .....	110
3.4.1 Reagentes .....	110
3.4.2 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) .....	110
3.4.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) .....	112
3.5 Resultados dos estudos com 1-Tetradecanol e 1-Octadecanol .....	114
3.5.1 Comportamento termotrópico dos álcoois puros .....	114
3.5.2 Caracterização de fases cristalinas por FTIR .....	117
3.5.3 Composição relativa de fases em função da temperatura .....	123
3.5.4 Estabilidade do sólido rotacional nos álcoois puros .....	125
3.6 Resultados dos estudos da Mistura (1-Tetradecanol + 1-Octadecanol) .....	130
3.6.1 Comportamento termotrópico observado por DSC .....	130
3.6.2 Comportamento de fases observado por FTIR .....	136
3.6.3 Efeito da perdeuteração de um dos componentes da mistura .....	138
3.6.4 Estudos de FTIR para a mistura $X_{18} = 0,50$ .....	140
3.6.5 Estudos de FTIR para a mistura $X_{18} = 0,09$ .....	144

3.6.6 Diagrama de fases da mistura.....	146
3.6.7 Estabilidade do sólido rotacional na mistura.....	147
3.7 Conclusão.....	149
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>153</b>
Transporte em Cutículas Modelo de Diferentes Composições de Ceras	
4.1 Estudos em Modelos da Cutícula Vegetal.....	153
4.2 Concepção de um Modelo para a Cutícula Vegetal.....	155
4.2.1 Base estrutural de cutina.....	156
4.2.2 Reconstituição do conteúdo em ceras .....	156
4.2.3 Composição em ceras.....	158
4.2.4 Propriedades das Cutículas Modelo .....	159
4.3 Método de Reconstituição de Ceras em Cutículas Modelo.....	160
4.4 Execução Experimental.....	162
4.4.1 Obtenção de cutículas reconstituídas.....	162
4.4.2 Quantificação de ceras depositadas à superfície de cutículas reconstituídas.....	163
4.4.3 Determinação de permeância e coeficiente aparente de difusão.....	164
4.4.4 Medição de fluxo de $H^+$ e de $Na^+$ .....	164
4.4.5 Medição de fluxo de álcoois .....	164
4.5 Resultados .....	164
4.5.1 Reconstituição de ceras .....	164
4.5.2 Permeância e coeficiente aparente de difusão para $H^+$ .....	168
4.5.3 Influência da temperatura em $P_{Na^+}$ .....	171
4.5.4 Influência da temperatura em $P_{álcool}$ .....	173
4.6. Discussão .....	175
<b>Conclusões Gerais</b> .....	<b>185</b>
e Perspectivas de Investigação Futura	
<b>Anexo A</b> .....	<b>195</b>
Mobilidade Electroforética de Alguns Iões	
A.1 Tabela de Mobilidade Electroforética e Raio Iónico Hidrodinâmico.....	195
<b>Anexo B</b> .....	<b>197</b>
Polimorfismo e Metaestabilidade	
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>201</b>

Apresenta-se uma perspectiva geral do trabalho de investigação realizado, realçando os aspectos que levaram à concepção do projecto de modelizar a cutícula vegetal com vista a colmatar algumas das lacunas no conhecimento sobre o transporte por difusão passiva que ocorre nesta membrana. Contextualizam-se os capítulos de resultados experimentais no âmbito dos objectivos globais que este trabalho se propõe alcançar.

---

# Introdução

## Enquadramento do Trabalho Apresentado

### Introdução

Muito embora a especiação das plantas vasculares se tenha traduzido na evolução de uma larga variedade de cutículas, algumas das características que determinam a função desta membrana, encontrada a revestir as partes não lenhificadas das plantas, foram conservadas evolutivamente. Não se conhecem excepções à regra de que a cutícula vegetal é uma estrutura de dupla-face, composta por dois meios distintos tanto em composição como em estrutura molecular, ambos acessíveis à difusão de permeantes. São eles, uma matriz polimérica de cutina, concentrada no lado mais interno da cutícula, e as ceras cuticulares, acumuladas junto da superfície externa.

Apesar do que se conhece acerca da cutícula vegetal, continuam por esclarecer algumas questões pertinentes acerca da forma como é permeada por difusão passiva, estando a maior parte delas relacionadas com a incompleta definição da sua estrutura molecular. Se é facto que, tanto a matriz de cutina, como as ceras, representam um papel importante para as propriedades vedantes desta membrana, cada um deles deverá contribuir de uma maneira

própria para essa finalidade, em medida das suas diferenças de composição e estrutura. Qual a medida da contribuição de cada um destes componentes maioritários da cutícula para o transporte transcucular de um dado permeante, é uma questão para a qual não existe, ainda, completa resposta.

Com o objectivo de colocar o leitor a par do conhecimento actual sobre a questão do transporte transcucular, apresenta-se, no **Capítulo 1**, uma compilação do actual estado de conhecimento sobre a cutícula vegetal, chamando-se a atenção para o que há ainda a investigar sobre a matéria. O mesmo capítulo constitui, também, uma introdução ao trabalho que se procurou desenvolver no âmbito da investigação apresentada nos capítulos seguintes.

Até há cerca de uma década, era largamente aceite que o mecanismo de transporte transcucular implicava a dissolução e difusão de permeantes no meio apolar da cutícula, num processo análogo ao registado na difusão passiva em membranas poliméricas de natureza apolar. Os factores que afectam este processo de permeação são, como previsto, alterações de temperatura ou presença de compostos que fluidizam as ceras na membrana, e têm sido alvo de uma caracterização bastante extensa, principalmente em virtude da sua relevância para a compreensão do processo de permeação de compostos químicos utilizados na protecção de colheitas. No entanto, enquanto este mecanismo de permeação permite interpretar a permeabilidade da cutícula a um dado permeante em função da sua capacidade de dissolução e mobilidade na membrana, não explica, por exemplo, as elevadas taxas de permeação de iões inorgânicos que se conhecem desde há muito, em consequência das quais as plantas podem perder quantidades significativas de sais a partir da sua superfície.

Em resultado de investigação da permeabilidade cuticular à água, recolheram-se evidências experimentais que apontam para a existência de um mecanismo de permeação cuticular alternativo ao de dissolução na membrana cuticular, o qual é dependente do gradiente de potencial hídrico estabelecido através da membrana, uma característica encontrada para o transporte por difusão em membranas porosas. Resultados experimentais mostraram que se observa um tipo de transporte transcucular dependente de poros existentes na matriz cuticular, ao que tudo indica, formados por grupos polares aí existentes. No entanto, este processo de transporte transcucular carece de uma melhor caracterização quanto à sua aplicabilidade e factores condicionantes.

Enquanto que a completa compreensão da permeação da cutícula vegetal por várias classes de compostos permeantes passa pela realização de estudos em função da variação sistemática de factores que regulam as suas propriedades, a realização de tais estudos acarreta várias dificuldades, sobretudo devidas à complexidade da cutícula vegetal. Por exemplo, sendo sabido que as ceras cuticulares desempenham um papel importante na determinação da permeabilidade cuticular e sendo, em consequência, interessante realizar estudos de transporte transcúticular em função da composição de fases do sistema, seria necessário, para o efeito, conhecer o comportamento de fases das ceras presentes na cutícula. No entanto, tal procedimento seria, na prática, impossível devido à complexidade de composição de uma mistura de ceras natural.

No contexto de realizar estudos de transporte transcúticular em condições bem definidas, julgou-se ser bastante útil conceber um sistema modelo da cutícula, simplificado e com características, como a composição de ceras, mais facilmente controláveis. A abordagem seguida para a simplificação da cutícula consistiu, pois, em substituir as ceras naturais de uma cutícula por uma mistura de ceras de comportamento de fases previamente estudado. É o resultado desse esforço que se apresenta no âmbito deste relatório.

A concepção de uma membrana modelo da cutícula vegetal teve de passar, necessariamente, pela decomposição da membrana natural nas suas características essenciais, de modo a reconhecer quais as funções básicas da cutícula natural que devem estar presentes no modelo de membrana cuticular. Entendeu-se que, para representar o sistema natural, o exemplar mais simples desta membrana teria de possuir uma matriz polimérica como base estrutural, além de ceras nela depositadas. Considerou-se, adicionalmente, que a complexidade da composição e estrutura da matriz de cutina e o seu papel fundamental para as funções da cutícula não seriam facilmente mimetizados por um polímero sintético. Por esse motivo, optou-se por utilizar uma matriz de cutina obtida de uma cutícula natural, optando-se pela cutícula de tomate como dadora desta estrutura. Os motivos desta escolha foram vários e incluem, por um lado, a disponibilidade de alguma literatura sobre a estrutura e propriedades da cutícula deste fruto e, por outro, devem-se à sua resistência mecânica e a facilidade de obtenção de material vegetal para o seu isolamento.

Numa primeira fase do trabalho, comparam-se as características de permeabilidade de uma cutícula natural e da sua matriz polimérica, obtida por extracção das ceras naturais. O objectivo foi o de destacar a contribuição das ceras da contribuição do polímero de cutina

para a permeabilidade total da cutícula. Tendo já em vista o trabalho de modelização planeado, a cutícula de tomate foi considerada como o modelo do comportamento de uma cutícula natural. No âmbito dos estudos, primeiro numa cutícula natural e depois em membranas modelo, optou-se por testar um conjunto de permeantes cujas propriedades de transporte transcúticular têm sido pouco estudadas: iões e pequenas moléculas polares. A escolha recaiu sobre uma série de catiões e aniões inorgânicos monovalentes, variando em dimensões e diferindo em sinal de carga iónica, bem como numa série de álcoois, com cadeias de 1 a 4 átomos de carbono, na qual se observa um aumento progressivo de volume molecular e de lipofilicidade. O objectivo desta escolha foi o de colmatar a reduzida caracterização do transporte de permeantes pouco solúveis na cutícula e os resultados deste estudo comparativo são apresentados no **Capítulo 2**.

O passo seguinte na concepção do modelo de cutícula foi o de promover a substituição das ceras da membrana natural por uma mistura de ceras sintética cujo comportamento de fases fosse conhecido e se assemelhasse ao de uma mistura mais complexa de ceras naturais. A escolha de uma mistura de ceras modelo recaiu sobre uma mistura binária de dois álcoois primários de cadeia longa, 1-tetradecanol e 1-octadecanol. O comportamento termotrópico desta mistura sintética de ceras foi caracterizado no âmbito dos trabalhos relatados no **Capítulo 3**, os quais resultaram na obtenção do diagrama de fases para a referida mistura.

Após os estudos de transporte na cutícula natural e da caracterização de uma mistura de ceras simplificada, foram iniciados os esforços para a obtenção de uma cutícula modelo, na qual se substituíssem as ceras naturais por ceras sintéticas. Este objectivo foi alcançado promovendo a reconstituição do conteúdo de ceras na matriz cuticular de tomate segundo um processo gradual e controlado, no qual se tentou imitar o processo natural de deposição de ceras na cutícula. A estratégia seguida para realizar este objectivo é relatada no **Capítulo 4**. Nele se apresentam e discutem os resultados dos esforços de modelação da cutícula com várias composições de ceras, comparando-se nas membranas modelo vários parâmetros aferidos previamente na cutícula natural de tomate e respectiva matriz cuticular.

Apresenta-se um breve resumo acerca das funções da cutícula vegetal, chamando a atenção para a importância desta membrana na conquista do ambiente terrestre pelas plantas vasculares, a qual se estende para além da protecção contra a excessiva evaporação de água. Caracteriza-se química e morfológicamente a cutícula, com particular incidência nas propriedades de transporte da matriz de cutina e das ceras cuticulares. Apresentam-se os mecanismos de transporte transcuticular conhecidos, de dissolução na membrana e de difusão através de poros polares, referindo-se os factores que os influenciam. Contextualiza-se o objectivo deste trabalho no actual estado de conhecimento do transporte através da cutícula.

---

# Capítulo 1

## A Cutícula Vegetal, uma Barreira Difusional

### 1.1 Origem, Estrutura e Composição

Um dos maiores desafios colocado às plantas que colonizam o ambiente terrestre é o de manterem o seu conteúdo hídrico. A cutícula vegetal é a estrutura responsável por limitar a excessiva evaporação de água do tecido epitelial das plantas terrestres e é encontrada a revestir superficialmente todas as suas partes não lenhificadas.

O fóssil mais antigo de uma cutícula foi encontrado num estrato rochoso datado de há mais de 400 milhões de anos, na forma de uma película com uma das faces lisa e outra apresentando um relevo acentuado. Em analogia com o que se observa nas plantas vasculares contemporâneas, a face lisa da cutícula pré-histórica corresponderá, provavelmente, à superfície externa das cutículas contemporâneas, onde se acumulam compostos alifáticos de cadeias longas, também designados por ceras, enquanto que a face rugosa estaria em contacto

com as células da epiderme (Edwards *et al.*, 1996). O registo fóssil mostra que a evolução da cutícula acompanhou a evolução e disseminação das plantas terrestres, e esta é a prova mais concreta da importância crucial desta estrutura para a conquista do ambiente terrestre pelas plantas vasculares.

Em sintonia, todos os organismos que coabitam o ambiente terrestre com as plantas, como os insectos e os animais, desenvolveram estruturas isoladoras análogas à cutícula vegetal. Tal como a cutícula dos insectos (Rourke e Gibbs, 1999), ou o *stratum corneum*, ou pele, dos animais (Potts e Francoeur, 1990), a cutícula das plantas deve as suas propriedades isoladoras em grande parte ao seu conteúdo em lípidos de elevado peso molecular, que na cutícula vegetal são denominados ceras. Demonstrou-se já que a remoção das ceras da cutícula vegetal se traduz sempre num aumento da permeabilidade cuticular, tanto a água (Schönherr, 1976a; 1982) como a compostos orgânicos (Schönherr e Baur, 1994; 1996; Riederer e Schreiber, 1995; Baur *et al.*, 1999), aumento esse que pode ascender a várias ordens de grandeza.

Desde os primeiros estudos realizados sobre a estrutura da cutícula vegetal, sabe-se que as ceras não se distribuem uniformemente pela cutícula, acumulando-se sobretudo junto à sua superfície externa (Sitte e RENNIER, 1963). A maior parte das cutículas apresenta mesmo depósitos consideráveis de ceras depositados na superfície, constituindo a camada de ceras epicuticulares, cuja espessura é variável entre cutículas de espécies diferentes. Estas ceras superficiais podem ser facilmente extraídas com uma rápida lavagem com solventes orgânicos (Riederer e Markstädter, 1996) obtendo-se, como resultado, extractos de ceras constituídos maioritariamente por hidrocarbonetos de cadeia longa ( $C_{29}$  e  $C_{31}$ ) e seus derivados, como álcoois secundários ou cetonas (Tabela 1.1), além de triterpenoides, esteróis e flavonóides em quantidades minoritárias. Frequentemente, encontram-se também nos extractos de ceras epicuticulares compostos alifáticos com um número par de átomos de carbono, predominando nesta classe os álcoois primários, aldeídos e ácidos gordos, usualmente entre  $C_{22}$  e  $C_{34}$ . Ainda é possível encontrar nesses extractos, embora em proporções minoritárias, compostos com cadeias hidrocarbonadas mais curtas, entre  $C_{12}$  e  $C_{18}$  (Baker, 1982).

Uma fracção minoritária das ceras da cutícula tem uma localização interna, concentrando-se numa região de aparência lamelada localizada sob a camada de ceras epicuticulares (Jeffree, 1996). Estas ceras internas, designadas por ceras intracuticulares, são mais difíceis de extrair do que as ceras epicuticulares e podem diferir bastante destas. As ceras

intracuticulares mais abundantes são os ácidos gordos com número par de átomos de carbono entre  $C_{12}$  e  $C_{18}$  (Baker, 1982).

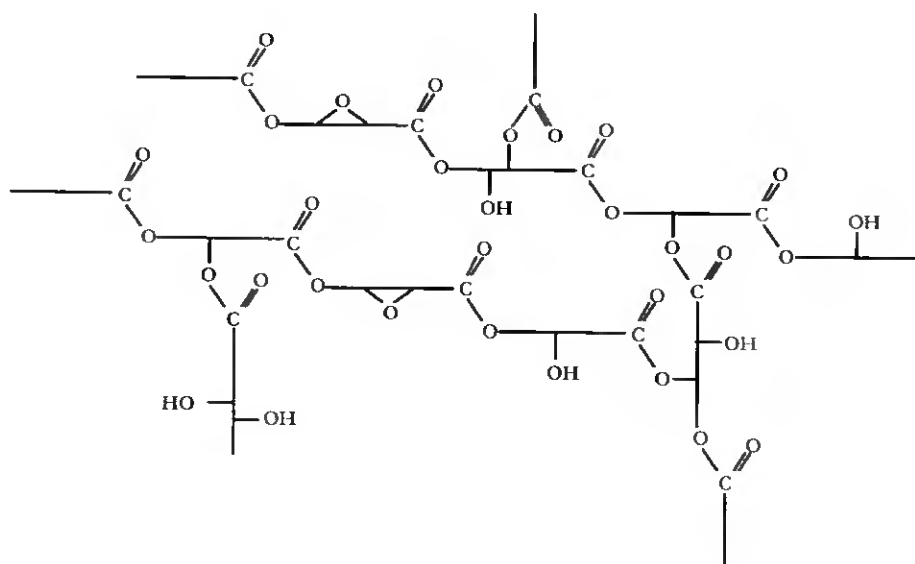
**Tabela 1.1.** Classes e componentes encontrados em proporções maioritárias em extractos de ceras epicuticulares (adaptada de Baker, 1982).

Classe de componentes	Gama	Componente mais abundante
Número par de átomos de carbono		
Ácidos (cadeia curta)	$C_{12}$ - $C_{18}$	hexadecanóico; octadecanóico
Ácidos (cadeia longa)	$C_{20}$ - $C_{32}$	hexacosanóico; octacosanóico
Aldeídos	$C_{22}$ - $C_{32}$	hexacosanal; octacosanal; triacontanal
Álcoois primários	$C_{22}$ - $C_{32}$	hexacosanol; octacosanol; triacontanol
Ésteres alquílicos	$C_{36}$ - $C_{72}$	hexacosil- e octacosilésteres dos ácidos hexa-, octa-, eicosa- e docosanoico
Número ímpar de átomos de carbono		
Hidrocarbonetos	$C_{17}$ - $C_{35}$	nonacosano; hentriacontano; tritriacontano
Álcoois secundários	$C_{21}$ - $C_{33}$	nonacosanol; hentriacontanol
Cetonas	$C_{23}$ - $C_{33}$	nonacosanona; hentriacontanona
$\beta$ -dicetonas	$C_{29}$ - $C_{33}$	hentriacontano-14,16-diona; tritriacontano-16,18-diona
Hidroxi- $\beta$ -dicetonas	$C_{29}$ - $C_{33}$	derivados de hentriacontano-14,16-diona
Constituintes cíclicos		
Ácidos triterpenóicos		ácido ursólico; ácido oleanólico
Triterpenois		$\beta$ -amirína, $\alpha$ -amirína; lupeol
Ésteres triterpenóicos		acetato de $\beta$ -amirenil, acetato de taraxeril;
Cetonas triterpenoicas		Taraxerona; lupeno-3-ona

As proporções relativas dos compostos encontrados como ceras diferem marcadamente de espécie para espécie. Porém, é difícil de escalonar essa variabilidade dado que a percentagem relativa de ceras da cutícula é, também, muito variável. Como exemplos, refere-se que nas folhas de plantas herbáceas, que possuem cutículas delicadas, como *Lactuca sativa* L. (alface) ou *Spinacea oleracea* L. (espinafre), podemos encontrar depósitos de ceras com entre 5 e  $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ , enquanto que em folhas de *Allium porrum* L. (alho), *Allium cepa* L. (cebola) ou de *Brassica* sp. (couve), que possuem cutículas em rápida expansão, os depósitos de ceras atingem 30 a  $60 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Por sua vez, nas folhas de *Ceratonia siliquoa* L. (alfarrobeira) ou de *Olea europaea* L. (oliveira), árvores nativas de regiões com fracos recursos hídricos, são encontrados depósitos de ceras excepcionalmente espessos, entre 60 e  $300 \mu\text{g cm}^{-2}$ , podendo ainda encontrar-se plantas que habitam zonas de deserto cujas cutículas possuem depósitos de ceras ainda superiores a estes (Baker, 1982).

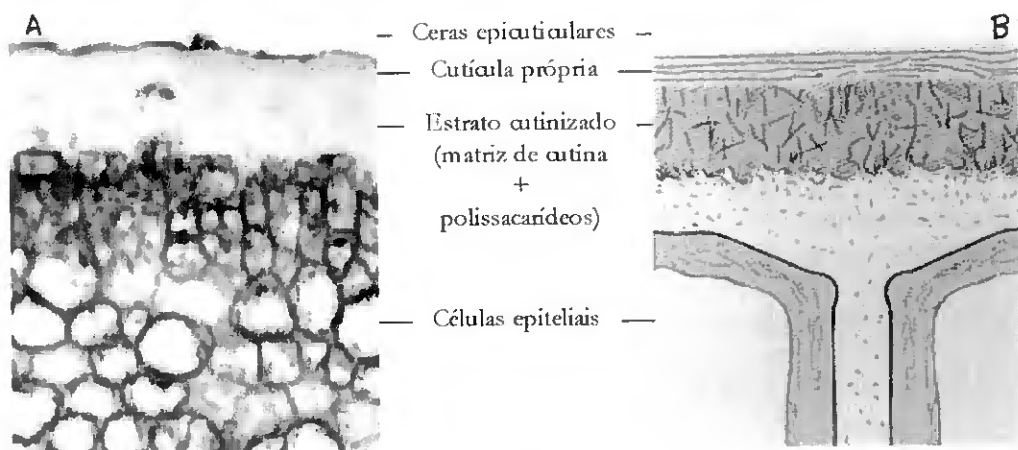
Após a extracção total das ceras, obtém-se uma fracção da cutícula que é insolúvel em solventes orgânicos ou aquosos. Esta é constituída pelo polímero de cutina, um poliéster de ácidos gordos polihidroxilados, com 16 ou 18 átomos de carbono. Os polímeros de cutina encontrados em cutículas de diferentes plantas variam entre si na proporção relativa de componentes com 16 e 18 átomos de carbono. Os compostos encontrados mais vulgarmente como monómeros no polímero de cutina são os ácidos 9,16- e 10,16-dihidroxihexadecanóico, na série de  $C_{16}$ , enquanto que na série de  $C_{18}$  se encontram, como os mais abundantes, o ácido 9,10,18-trihidroxioctadecanóico e o ácido 18-hidroxi-9,10-epoxioctadecanóico (Holloway, 1994).

Muito pouco é conhecido acerca da estrutura molecular do biopolímero de cutina. Sabe-se que a síntese dos monómeros ocorre nas células da epiderme, sob o controlo de enzimas específicas, mas a expansão do polímero é feita no meio extracelular (Kolattukudy, 2001). Aparentemente, não se encontra qualquer relação quimiotaxonómica entre os vários tipos de cutina, pois mesmo plantas pertencendo a famílias taxonomicamente distantes podem possuir polímeros de cutina com uma composição semelhante (Holloway, 1994). A estrutura tridimensional do polímero de cutina depende, obviamente, do comprimento das cadeias hidrocarbonadas dos monómeros, bem como do número e posição dos grupos funcionais hidróxilo e epóxido esterificáveis neles presentes. Na Figura 1.1, apresenta-se um esquema de uma possível estrutura do polímero de cutina.



**Figura 1.1.** Representação esquemática da estrutura molecular de um polímero de cutina (adaptada de Holloway, 1994).

O conceito de que a cutícula é uma estrutura com camadas diferenciadas, em ontogenia, composição e estrutura molecular, não é recente, considerando as referências citadas por Jeffrey (1996). O modelo estrutural predominante interpreta a cutícula como uma membrana em bicamada, na qual a face mais afastada das células da epiderme é rica em compostos alifáticos, solúveis ou polimerizados, enquanto que a face mais interna consiste no polímero de cutina e uma quantidade substancial de polissacarídeos que se prolongam a partir da parede celular das células da epiderme. O estrato mais superficial não contém resíduos de celulose, e é designado por *cutícula própria*, enquanto que o estrato rico em cutina, localizado imediatamente abaixo, é por vezes referido como *estrato cutinizado* (Jeffrey, 1996). A cutina torna a membrana cuticular particularmente inerte e resistente a hidrólise ácida, pelo que a membrana pode ser facilmente separada das células da epiderme em forma intacta, quer por métodos químicos de hidrólise ácida, quer por digestão enzimática dos polissacarídeos que a ligam à parede celular das células da epiderme. Uma representação esquemática da cutícula é apresentada na Figura 1.2, com destaque para a sua estratificação.



**Figura 1.2.** Corte transversal (A) e representação esquemática (B) de uma cutícula (Imagem de microscopia óptica obtida em [www.botany.hawaii.edu](http://www.botany.hawaii.edu); esquema adaptado de Taiz e Zeiger, 1998).

Observações da cutícula recorrendo à técnica de microscopia electrónica (Holloway, 1982; Jeffrey, 1996) mostram que existe uma grande variabilidade na estrutura cuticular entre espécies vegetais. Embora a matriz de cutina e as ceras cuticulares sejam um elemento comum, algumas cutículas apresentam um aspecto amorfo, como é o caso da cutícula de *Zea mays* (milho), outras apresentam lamelas paralelas na região da cutícula própria, como no caso da

cutícula de folhas de *Beta vulgaris* (beterraba). Outras cutículas podem apresentar um aspecto reticulado, como a de folhas de *Citrus limon* (limoeiro). Porém, na maior parte dos casos, observa-se uma cutícula com estrutura mista, como no caso das folhas de *Malus pumila* (macieira), cuja cutícula possui uma região externa amorfa e uma região interna reticulada, ou no caso da *Agave americana* (piteira), que possui uma cutícula polilamelada na região externa e reticulada na região interna. As referidas lamelas podem ser classificadas em dois tipos, no que respeita às suas propriedades quando observadas por microscopia electrónica: as opacas, provavelmente compostas de cutina, e as translúcidas, que contêm provavelmente ceras intracuticulares. Ambos os tipos de lamelas são observados na região da cutícula própria, alternando entre si.

## 1.2 Função

A cutícula é entendida, acima de tudo, como uma camada isoladora que impede a excessiva evaporação de água pela planta. No entanto, esta é uma interpretação simplista desta estrutura tão complexa e tão variável de planta para planta. Além de membrana impermeabilizadora, a cutícula constitui, também, uma primeira barreira contra a invasão dos tecidos vegetais por fungos (Mendgen, 1996) ou insectos (Juniper, 1995; Eigenbrode, 1996), ou, ainda, contra os efeitos nocivos da exposição intensa e prolongada à radiação solar (Barnes e Cardoso-Vilhena, 1996). É interessante constatar que a cutícula fornece, também, um meio de comunicação entre as plantas e os insectos, permitindo, por exemplo, a emissão de compostos voláteis que atraem insectos, estimulando assim a polinização cruzada (Schiestl *et al.*, 2000), ou proporcionando relações simbióticas entre plantas e insectos não nocivos, impedindo, por exemplo, a fixação de insectos não simbiontes (Federle *et al.*, 1997).

A cutícula oferece uma grande superfície através da qual pode ocorrer o fluxo não específico de massa entre a planta e a atmosfera. Apesar de as trocas gasosas necessárias para o metabolismo serem realizadas principalmente através de estomas<sup>1</sup>, há que considerar que

---

<sup>1</sup> Estruturas especializadas presentes na superfície das plantas cuja abertura é regulada metabolicamente pelas denominadas células-guarda, as quais produzem a abertura estomática. Estando envolvidos na regulação da incorporação de CO<sub>2</sub> a partir da atmosfera em períodos de intensa fotossíntese, estabelece-se, também, através deles, um fluxo de água requerido para a ascensão de nutrientes através dos vasos de xilema desde as raízes até às partes aéreas das plantas.

podem também ocorrer por intermédio da cutícula. Também as emissões de compostos voláteis que atraem insectos, de que são exemplo os perfumes florais, se processam necessariamente por difusão destes compostos através da cutícula, uma vez que estes são produzidos pelas células da epiderme (Kolossova *et al.*, 2001) e não se conhecem estruturas especializadas para a sua canalização até à superfície das plantas.

A cutícula é, apesar de tudo, permeável à água (Kerstiens, 1996a, b) e, mesmo que ofereça mais resistência ao fluxo de água do que os estomas (Woodward, 1998), a sua contribuição para as perdas totais de água por transpiração não será certamente desprezável em virtude da sua extensão superficial elevada. O papel fisiológico da transpiração cuticular é, pois, um assunto que merece discussão, podendo esta desempenhar um papel fisiológico importante, como a manutenção do potencial hídrico das plantas em ocasiões em que os estomas se encontrem fechados ou ausentes, do que são exemplo os frutos, nos quais a transpiração cuticular pode regular o fornecimento de nutrientes necessários para o seu rápido desenvolvimento. De facto, as taxas de transpiração cuticular de frutos são geralmente superiores às encontradas em folhas (Schreiber e Riederer, 1996b).

Numa outra perspectiva, é também possível que a cutícula participe na regulação fisiológica da resposta dos estomas a diferenças de pressão de vapor de água entre a superfície da planta e o ar, influenciando o metabolismo das células-guarda. Por outro lado, a evaporação de água através da cutícula pode desempenhar um papel importante na regulação da temperatura superficial das plantas, a qual sofre alterações de grande amplitude dependendo da temperatura atmosférica, irradiação solar e taxa de transpiração, variando entre -20 e 50 °C mesmo em climas temperados (Nito *et al.*, 1979; Kuraishi e Nito, 1980). Finalmente, sabe-se que algumas plantas absorvem água através da cutícula, mesmo na ausência de estruturas especializadas, muito embora se desconheça a importância relativa desta forma de hidratação dos tecidos vegetais (Kerstiens, 1996b).

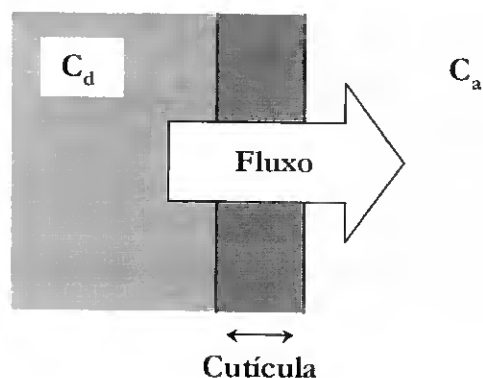
A importância da permeabilidade cuticular estende-se, porém, para além do seu papel no equilíbrio hídrico das plantas. Reconhece-se a ocorrência de remoção de iões, compostos aromáticos, factores de crescimento ou mesmo de alguns hidratos de carbono a partir da superfície das plantas em consequência da sua prolongada lavagem por acção de chuva, orvalho ou nevoeiro (Tuckey, 1970), em quantidades significativas para a sobrevivência das plantas. No caso de plantas que povoam ambientes com elevada concentração salina, por exemplo, a remoção de excesso de sais que se acumulam à sua superfície é potencialmente

benéfica para o metabolismo da planta, enquanto que uma lavagem excessiva da superfície das plantas pode provocar carências nutritivas ao nível do equilíbrio de concentração iónica nas suas zonas mais periféricas.

A acumulação e conseqüente efeito de poluentes atmosféricos, como as chuvas ácidas, metais pesados ou compostos voláteis, está, também ela, dependente do transporte transcüticular. A cutícula é, ainda, a principal barreira à penetração de pesticidas e agentes protectores de colheitas (Kirkwood, 1999), alguns dos quais exercem a sua função no interior da planta. A compreensão do processo de permeação transcüticular é, pois, de extremo interesse, quer do ponto de vista ecofisiológico quer do ponto de vista económico.

### 1.3 Uma Barreira Difusional Heterogénea

A cutícula é uma barreira de natureza polimérica e hidrofóbica e, como acontece em membranas semelhantes, a sua transposição implica que um dado permeante se dissolva no meio membranar e nele difunda a favor de um gradiente de concentração (Figura 1.3). Este transporte passivo é, no entanto, distinto daquele que se realiza através dos estomas, o qual ocorre por difusão do permeante numa fase gasosa contínua entre o interior da planta e a atmosfera.



**Figura 1.3.** Representação esquemática do transporte transcüticular direccionado segundo um gradiente de potencial entre dois meios separados pela cutícula:  $C_d$  representa a concentração de permeante no meio dador, onde o potencial químico ou electroquímico é superior, e  $C_a$  representa a concentração de permeante no meio aceitante. O fluxo através da membrana decorrerá até que se dissipe o potencial de membrana e se atinja o equilíbrio.

Uma membrana de dissolução é tanto mais permeável quanto maior for a solubilidade e a mobilidade de um dado permeante nela. A permeabilidade de membranas de dissolução pode ser comparada em termos de permeância,  $P$  ( $m s^{-1}$ ), uma medida da velocidade a que um

gado permeante se desloca na membrana. A permeância é uma função da solubilidade e da mobilidade de um permeante na membrana, segundo a expressão (Crank e Park, 1968):

$$P = \frac{DK_p}{\Delta x} \quad (1.1)$$

onde  $D$  ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) representa o coeficiente de difusão do permeante na membrana,  $K_p$  (adimensional), é o coeficiente de partição do permeante entre a membrana e o meio externo, e  $\Delta x$  (m), corresponde à espessura da membrana, considerando que esta é homogénea.

A permeância de uma membrana a um dado permeante corresponde ao factor de proporcionalidade que relaciona o fluxo de permeante,  $J$  ( $\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), normalizado para uma área de membrana unitária, e a amplitude do gradiente de concentração separado pela membrana,  $\Delta C$  ( $\text{mol m}^{-3}$ ), segundo a equação (Schreiber *et al.*, 1996a):

$$J = P\Delta C \quad (1.2)$$

A permeância pode ser determinada experimentalmente com medições de fluxo transmembranar, conhecendo-se  $\Delta C$  e a área de membrana em que se efectua a medição..

A prova mais contundente de que a cutícula se comporta como uma membrana hidrofóbica de dissolução-difusão relativamente ao transporte de compostos orgânicos, incluindo alguns utilizados como pesticidas, é dada pela excelente correlação que se encontra entre a permeabilidade cuticular e o coeficiente de partição octanol/água (Kerler e Schönherr, 1988), ou o coeficiente de partição cutícula/água (Schreiber e Schönherr, 1992), deste tipo de permeantes. A permeabilidade da membrana cuticular a compostos orgânicos é também dependente da sua mobilidade na cutícula, como se demonstra pelo decréscimo exponencial da permeância da membrana na medida em que aumenta o volume molar do permeante (Baur *et al.*, 1996; Baur *et al.*, 1999a).

Tudo indica que compostos orgânicos e água permeiam a cutícula utilizando o mesmo mecanismo de dissolução e difusão no meio hidrofóbico da membrana. Isso mesmo é atestado pela boa correlação entre a permeabilidade à água de cutículas de várias espécies de

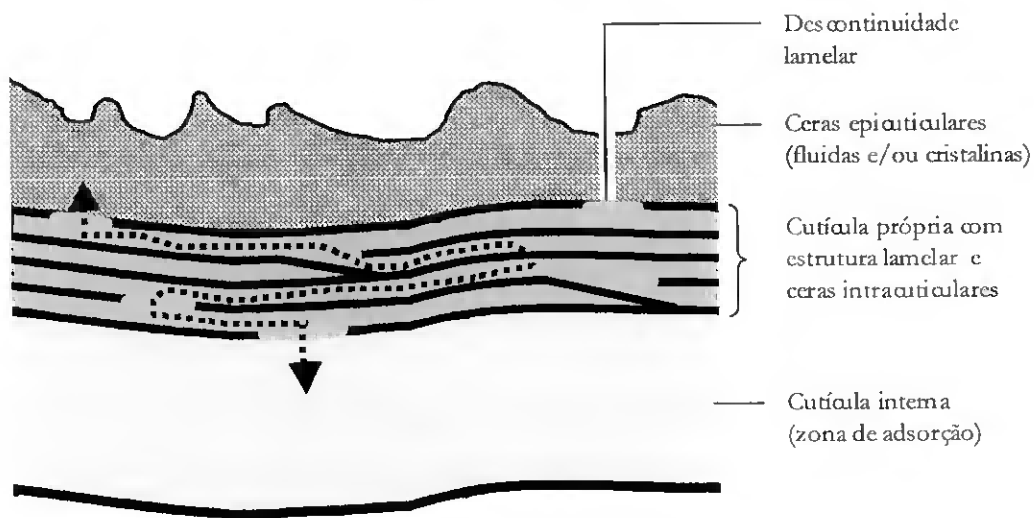
plantas e o coeficiente de difusão de ácido octadecanóico em extractos de ceras das mesmas cutículas (Schreiber e Riederer, 1996a). O mesmo é, também, concluído através do registo de uma boa correlação entre a permeabilidade à água e a vários compostos orgânicos, tanto em cutículas da mesma espécie de planta como entre cutículas de espécies diferentes (Niedler *et al.*, 1998).

A cutícula não é, no entanto, uma barreira homogénea (Figura 1.2), e a difusão de um dado permeante não ocorre num meio bem definido e de fácil caracterização química ou estrutural. Comparando a taxa de desadsorção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético a partir das superfícies interna e externa de diferentes cutículas, concluiu-se que a superfície interna se apresenta cerca de 50 a 80 vezes menos limitante à difusão deste composto do que a superfície externa (Schönherr e Riederer, 1988). Em experiências semelhantes, comparando-se a mobilidade de diferentes compostos orgânicos em cutículas e na sua matriz de cutina, em cutículas de espécies diferentes, foram obtidos resultados qualitativamente semelhantes (Baur *et al.*, 1999a). A cutícula contém, pois, uma assimetria difusional, estabelecida entre a região composta essencialmente pelo polímero de cutina, menos limitante à difusão, e a superfície externa, onde se concentram as ceras cuticulares, que oferece maior resistência à mobilidade de solutos. A região onde predomina a cutina é interpretada essencialmente como um compartimento de acumulação ou de absorção de permeantes, em oposição à região mais externa da cutícula, que é considerada como a camada que é, efectivamente, a barreira difusional da cutícula (Bauer e Schönherr, 1992; Baur *et al.*, 1999a).

Numa membrana de composição e morfologia tão heterogénea como a cutícula, o percurso de difusão de um dado permeante entre a superfície de adsorção e a superfície de desadsorção não corresponderá simplesmente à espessura da membrana, podendo mesmo ser bastante superior a ela, consoante a sua tortuosidade. Comparando a mobilidade de vários compostos orgânicos na superfície externa de cutículas em função do aumento do volume molar do permeante, foi possível obter-se uma indicação do factor de selectividade da barreira difusional cuticular e compara-lo entre membranas. Extrapolando a mesma correlação para o caso de um permeante de volume molar zero, pode obter-se uma indicação relativa da tortuosidade da barreira difusional da cutícula e compara-la entre várias membranas. Os resultados de vários estudos neste âmbito (Baur, 1996; Buchholz *et al.*, 1998; Baur *et al.*, 1999a) foram unânimes em demonstrar que as diferenças de mobilidade de solutos orgânicos em cutículas de diferentes espécies não se devem a diferenças na selectividade das membranas, mas sim a uma diferente tortuosidade do percurso de difusão, consequência da presença de

ceras. A extracção das ceras cuticulares, traduz-se numa diminuição da tortuosidade do meio acessível para a difusão, não afectando a selectividade inicial da membrana.

Em resumo, a cutícula pode ser interpretada como um cumulativo de regiões química e morfologicamente distintas, que diferem também no que diz respeito a propriedades de transporte (Baur *et al.*, 1999a), podendo ser dividida em (pelo menos) três regiões (Figura 1.4): 1) a cutícula interna, constituída fundamentalmente pela matriz de cutina e polissacarídeos, que funciona como uma zona de adsorção pouco limitante ao transporte transcúticular; 2) a cutícula própria, uma região onde se encontram as ceras intracuticulares distribuídas em estratos de aspecto lamelar, provavelmente responsável pelo grau de tortuosidade da membrana devido a descontinuidades nestes estratos; e 3) a região das ceras epicuticulares, cuja composição pode ser bastante distinta da das ceras intracuticulares (Jetter *et al.*, 2000), onde a difusão depende das propriedades da camada cerosa.



**Figura 1.4.** Representação esquemática de uma secção transversal da cutícula, na qual se distinguem três zonas de diferente composição e propriedades de transporte: as ceras epicuticulares, a cutícula própria e a cutícula interna (adaptada de Baur *et al.*, 1999a).

Com o objectivo de encontrar uma relação entre a composição e estrutura molecular da cutícula e as suas propriedades de barreira difusional, tem-se estudado a permeabilidade desta membrana sob várias perspectivas e testando vários tipos de permeantes. Curiosamente, não foi até agora encontrada nenhuma correlação directa entre a mobilidade de solutos orgânicos, ou mesmo o índice de tortuosidade da barreira difusional, e a espessura das membranas cuticulares estudadas, quer estas sejam cutículas ou matrizes cuticulares desprovidas de ceras.

De facto, as tentativas de relacionar a permeância de cutículas de plantas provenientes de ambientes diferentes com factores como a espessura da membrana, composição, quantidade ou o estado físico das ceras cuticulares têm-se revelado infrutíferas (Becker *et al.*, 1986; Geyer e Schönherr, 1990; Schreiber e Riederer, 1996b; Baur *et al.*, 1999a).

Considerando que a zona de interligação entre a matriz de cutina e as ceras cuticulares não constitui um ambiente de difusão distinto com expressão na permeabilidade global da cutícula, as propriedades de transporte da cutícula deverão ser, sobretudo, determinadas pelas propriedades de cada uma das regiões principais que a compõem, como são a matriz de cutina e as ceras cuticulares. Uma vez que estas possuem propriedades químicas, físicas e estruturais bastante distintas, é de esperar que influenciem as propriedades de barreira da cutícula também de uma forma distinta.

### 1.3.1 Propriedades das ceras cuticulares

É generalizada a aceitação de que grande parte da resistência cuticular à difusão é conferida pelas ceras cuticulares (Schreiber *et al.*, 1996a), apesar de estas serem constituintes minoritários da cutícula (Baker, 1982). A extracção das ceras cuticulares traduz-se, invariavelmente, num aumento da permeabilidade cuticular, tanto à água como a compostos orgânicos, aumento esse que pode ascender a várias ordens de grandeza (Schönherr, 1982; Riederer e Schreiber, 1995; Buchholz *et al.*, 1998).

Na Tabela 1.2, apresenta-se, a título de exemplo, a permeância da cutícula e da matriz cuticular de *Citrus aurantium* L. (laranjeira) relativamente a água e a vários compostos orgânicos. Nela se pode constatar, também, que existe uma óbvia correlação entre a permeabilidade da membrana a um dado permeante e a respectiva solubilidade num meio apolar, dada pelo respectivo coeficiente de partição entre octanol e água.

Em conformidade com os exemplos da Tabela 1.2, sendo a permeância da matriz de cutina,  $P_{\text{matriz}}$ , 10 a 1000 vezes superior à permeância da respectiva cutícula,  $P_{\text{cutícula}}$ , esta última deve ser efectivamente determinada pela permeância das ceras cuticulares,  $P_{\text{ceras}}$ . A relação entre a resistência à difusão representada pelos dois meios, cutina e ceras, é bem ilustrada se estes forem considerados como resistências em série, sendo a resistência total da cutícula dada pela soma das resistências parciais da matriz e das ceras, correspondentes ao inverso da respectiva permeância:

$$\frac{1}{P_{cutícula}} = \frac{1}{P_{matriz}} + \frac{1}{P_{ceras}} \quad (1.3)$$

Das observações anteriores, torna-se óbvio, também, que não é a espessura da cutícula que determina o percurso de difusão efectivo de solutos na membrana, uma vez que é na região onde se concentram as ceras cuticulares que é limitada a cinética de difusão na membrana. Como já visto, esta limitação é devida ao aumento do percurso de difusão, ou tortuosidade, da cutícula nesta região (Schönherr e Baur, 1994; Baur *et al.*, 1996; Baur *et al.*, 1999a).

**Tabela 1.2.** Permeância de cutículas ( $P_{cutícula}$ ) e de matrizes cuticulares ( $P_{matriz}$ ) de folhas de *Citrus aurantium* L. a água e a alguns compostos orgânicos, e sua relação com o coeficiente de partição octanol/água,  $K_{o/a}$ , dos permeantes (adaptada de Kerler e Schönherr, 1988 e de Riederer e Schreiber, 1995).

Composto <sup>a</sup>	log $K_{o/a}$	$P_{cutícula}$ ( $\times 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ )	$P_{matriz}$ ( $\times 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ )	$P_{matriz}/P_{cutícula}$
Água	-	8,3	1,6	188
4-Nitrofenol	1,92	1,6	22	1330
2,4-D	2,50	1,8	14	503
Atrazina	2,64	1,0	2,2	222
2,4,5-T	3,40	5,2	29	558
Pentaclorofenol	4,07	400	160	41
Hexaclorobenzeno	5,47	8600	1750	20
Perileno	6,50	1600	160	9,8
Dietilhexilftalato	7,86	3200	300	9,3

<sup>a</sup>2,4-D, ácido 2,4-diclofenoxiacético; 2,4,5-T, ácido 2,4,5-triclofenoxiacético.

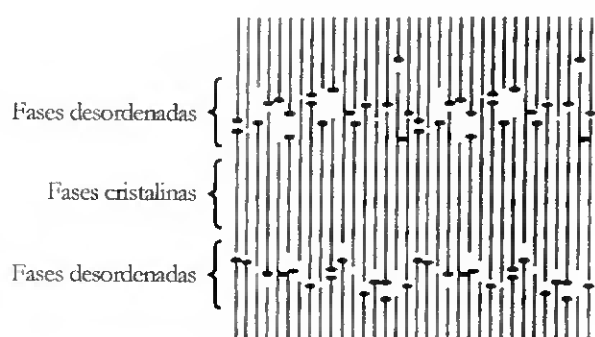
Existe uma relação estreita entre as propriedades de barreira de cutículas intactas e as propriedades de transporte das ceras cuticulares extraídas e recristalizadas separadamente da cutícula. A correlação entre a mobilidade e o volume molar de um permeante na região mais limitante à difusão passiva (região externa) numa cutícula é idêntica à observada quando se efectuam estudos semelhantes em extractos de ceras respectivos (Schreiber e Schönherr, 1993; Schreiber *et al.*, 1996b). Por outro lado, conhecendo os coeficientes de difusão e de partição ceras/água de um dado composto orgânico num extracto de ceras cuticulares, é possível

determinar, com bastante aproximação, a permeabilidade das respectivas cutículas, utilizando a espessura membranar como factor normalizador (Kirsch *et al.*, 1997).

### 1.3.2 Modelo de organização molecular das ceras cuticulares

Estudos de dinâmica molecular de misturas de ceras extraídas de várias cutículas revelaram que estas podem ser encontradas em fases cristalinas e em fases não cristalinas, também designadas por amorfas, pelo menos a temperaturas vulgarmente encontradas no meio ambiente (Riederer e Schreiber, 1995).

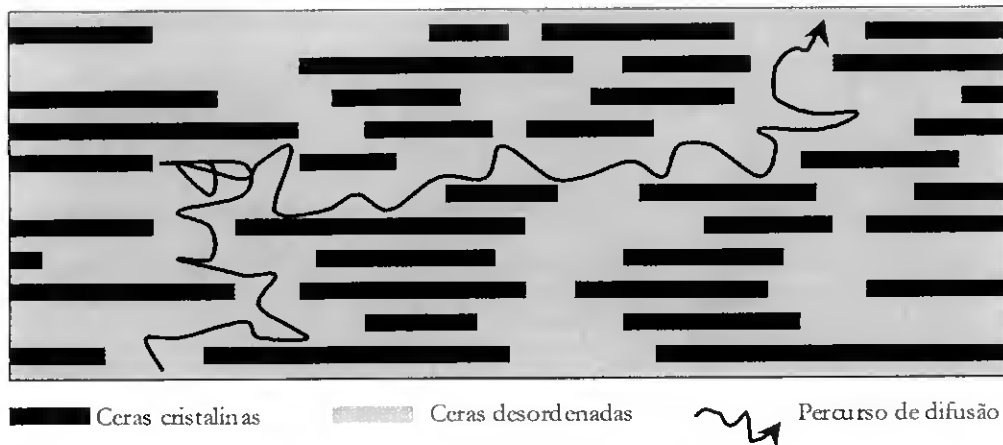
Num modelo proposto para a organização molecular das ceras (Reynhardt e Riederer, 1991, 1994), entende-se que as fases cristalinas, constituídas por cadeias alifáticas longas ordenadas paralelamente, se encontram distribuídas numa matriz constituída por fases onde não se observa um empacotamento ordenado como o encontrado em cristais, consideradas por isso como fases desordenadas. Estas fases desordenadas não apresentam características de um líquido isotrópico, pois possuem algum grau de ordem. Provavelmente, corresponderão a regiões de elevada mobilidade de cadeias alifáticas como, por exemplo, onde são segregados os extremos das cadeias alifáticas de diferentes tamanhos ou grupos funcionais polares de modo a reduzir energia do sistema. Isso mesmo é o que se pretende representar, de um modo esquemático, na Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Modelo molecular de empacotamento das ceras cuticulares, distinguindo-se regiões onde se concentram as extremidades das cadeias alifáticas, correspondentes a fases desordenadas, e regiões de ordenamento molecular elevado, correspondentes a fases de ceras cristalinas (adaptada de Reynhardt e Riederer, 1994).

Em consequência do elevado grau de empacotamento e da reduzida dinâmica molecular nas fases cristalinas, entende-se que a difusão de solutos através das ceras cuticulares deverá ser significativa só nas regiões de fases desordenadas, onde o deficiente empacotamento das cadeias hidrocarbonadas permite um elevado grau de mobilidade. Assim sendo, a difusão

através da camada cerosa da cutícula dependerá das propriedades de percolação das fases desordenadas das ceras cuticulares, conforme esquematizado na Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Modelo da barreira difusional das ceras cuticulares, constituída por fases de ceras cristalinas rodeadas por uma matriz de ceras em fases desordenadas, através das quais pode ocorrer a difusão de solutos. A presença de fases cristalinas aumenta a tortuosidade do percurso de difusão nas ceras (adaptada de Riederer e Schreiber, 1995).

Na generalidade, em materiais semicristalinos, como no caso de membranas de polietileno, a permeabilidade e a mobilidade de moléculas de água decresce à medida que aumenta o grau de cristalinidade do polímero (Klute, 1959). A quantidade e dimensão das regiões cristalinas, obstáculos à difusão, tem como consequência o aumento do percurso que um determinado permeante deve percorrer, o qual passa a exceder a espessura da camada em causa. Algumas tentativas de comparar a extensão do percurso difusional na cutícula mostraram, acima de tudo, que este varia entre cutículas de espécies diferentes e que as diferenças de permeabilidade que são observadas entre cutículas de espécies diferentes são essencialmente devidas a diferenças no grau de tortuosidade estimado para a camada de ceras cuticulares, não estando relacionadas com uma diferente selectividade, a qual é, de resto, muito semelhante entre cutículas (Baur *et al.*, 1996; Buchholz *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Factores que influenciam o transporte por dissolução na cutícula

De acordo com o modelo de permeação cuticular que interpreta o transporte transcuticular como dependente da dissolução e difusão de permeantes nas ceras cuticulares, um aumento da solubilidade ou da mobilidade de um dado permeante na membrana traduzir-se-à num aumento da permeabilidade da membrana a esse mesmo permeante (Equação 1.1).

O aumento da permeabilidade cuticular em função da temperatura é comum no caso de compostos orgânicos e de água como permeantes, e é interpretado como resultado do aumento de fluidez de fases de ceras desordenadas e/ou de uma eventual diminuição da quantidade de ceras em fases cristalinas da cutícula, com as respectivas implicações na redução da tortuosidade da membrana. Para a difusão de solutos lipofílicos obtêm-se energias de activação entre 70 e 189 kJ mol<sup>-1</sup> (Baur *et al.*, 1997a; Buchholz e Schönherr, 2000). Já no que diz respeito a água, foram observados valores entre 26 e 61 kJ mol<sup>-1</sup> em folhas de cinco espécies diferentes, *Vinca major* L., *Prunus laurocerasus* L. (cerejeira), *Forsythia intermedia* L., *Citrus aurantium* L. e *Hedera helix* L. (hera), a temperaturas inferiores a 30 °C (Schönherr *et al.*, 1979; Schreiber, 2001). Nestas cutículas, registou-se a ocorrência de uma transição de fase a temperaturas entre 30 e 40 °C, a qual aumentou a permeabilidade membranar. Acima da temperatura de transição, também a energia de activação para o transporte transcuticular de água aumentou, situando-se, então, nestas mesmas cutículas, entre 67 e 122 kJ mol<sup>-1</sup>. Em contraste com os resultados obtidos para a permeação de água, não existem indicações de ocorrência de transições de fase quando se monitoriza a permeabilidade de cutículas a compostos lipofílicos em função da temperatura (Baur *et al.*, 1997a; Buchholz e Schönherr, 2000).

As observações anteriores apontam para a ocorrência de uma alteração estrutural na membrana a temperaturas entre 30 e 40 °C que afecta a permeabilidade da cutícula a água mas não a solutos orgânicos. Uma vez que tudo aponta para que as propriedades de barreira da cutícula sejam essencialmente determinadas pelas ceras cuticulares, observações idênticas foram inicialmente atribuídas a transições de fase das ceras cuticulares induzidas pela temperatura (Eckl e Gruler, 1980). No entanto, foi demonstrado posteriormente que essa transição era registada tanto na cutícula como na sua matriz de cutina, sendo esta transição uma consequência da expansão de volume destas membranas (Schreiber e Schönherr, 1990) e não uma transição do tipo sólido-líquido das ceras da membrana. De acordo com esta

conclusão, está, também, a observação de que a fusão de extractos de ceras cuticulares de cutículas de mais de vinte espécies vegetais decorre a temperaturas de cerca de 65 °C ou superiores (Schreiber e Riederer, 1996b).

Além da temperatura, também compostos que fluidizam as ceras da membrana aumentam a permeabilidade da cutícula e o seu efeito no transporte transcuticular é interpretado à luz do modelo de dissolução-difusão na camada cerosa. Estes compostos são designados na generalidade por adjuvantes, incluindo-se nesta classificação todos os compostos que facilitam a penetração de pesticidas através da cutícula. Distinguem-se dois tipos adjuvantes, consoante o seu efeito: os agentes activadores, ou potenciadores, da acção dos pesticidas, e os agentes aceleradores, ou plastificantes (Kirkwood, 1999). Os primeiros são geralmente surfactantes e facilitam a dispersão do princípio activo na superfície da membrana, aumentando a sua disponibilidade efectiva para a cutícula. Os segundos, de que são exemplos tributílfosfato e etoxiálcoois em geral, aumentam a permeabilidade da cutícula diminuindo a viscosidade da camada cerosa e aumentando a mobilidade de permeantes na membrana. A energia de activação para a difusão de compostos orgânicos na cutícula é dramaticamente reduzida pela aplicação de vários tipos de agentes aceleradores (Buchholz e Schönherr, 2000; Schönherr *et al.*, 2001), sendo este efeito reversível (Baur *et al.*, 1999b). O mesmo efeito de etoxiálcoois que é observado em cutículas é também registado em extractos de ceras cuticulares recristalizados (Schreiber *et al.*, 1996c).

O efeito do aumento de temperatura e de agentes aceleradores é essencialmente o mesmo, pois alteram a mobilidade dos solutos na membrana no mesmo sentido. Tanto o aumento de temperatura como a exposição da cutícula à acção de compostos aceleradores resultam numa diminuição acentuada da selectividade da membrana relativamente ao volume molar do soluto permeante (Baur *et al.*, 1997a,b; Buchholz *et al.*, 1998).

Conforme demonstrado por vários estudos (Schönherr e Schmidt, 1979; Schönherr, 1982; Hoad *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 2001), a humidade relativa a que a cutícula está sujeita influencia a condutância da cutícula a água, a qual aumenta na medida da saturação da membrana em água. No entanto, é difícil de compreender que as propriedades da cutícula sejam alteradas em função deste parâmetro, à luz do modelo de transporte transcuticular por dissolução. Uma explicação alternativa para este efeito é apresentada com um outro modelo de transporte transcuticular, de desenvolvimento mais recente, que admite a possibilidade de difusão de água através de poros existentes na membrana (Schönherr, 1982). Este modelo



prevê que grupos polares concentrados na matriz de cutina adsorvam moléculas de água, aumentando a condutância à água da cutícula. Esta hipótese já estaria em conformidade com resultados de uma experiência de metilação de grupos carboxílicos existentes na matriz cuticular, a qual resultou numa atenuação do efeito da humidade relativa na permeabilidade cuticular a água (Schreiber *et al.*, 2001).

### 1.3.4 Propriedades da matriz de cutina

Além das ceras, a matriz de cutina deverá desempenhar um papel importante na determinação da permeabilidade cuticular e é, por isso, essencial compreender a sua estrutura e contribuição relativa para este fenómeno. A matriz cuticular é constituída pelo polímero de cutina e por polissacarídeos (Figura 1.2). A cutina é um polímero com características marcadamente hidrofóbicas em virtude de ser composta por monómeros alifáticos de cadeia hidrocarbonada bastante extensa, com 16 ou 18 átomos de carbono. Estes monómeros são ácidos gordos polihidroxilados e encontram-se interligados numa rede de ligações cruzadas, apresentando regiões de cadeias de polimetileno correspondentes a, pelo menos, oito átomos de carbono (Figura 1.1).

O polímero de cutina possui um grau de empacotamento relativamente elevado. Foi demonstrado que os coeficientes de difusão lateral de compostos orgânicos na superfície da matriz cuticular são semelhantes, em ordem de grandeza, aos encontrados na superfície externa da cutícula onde predominam os compostos de natureza alifática (Wunderlich *et al.*, 1990). Em ambos os casos, são encontrados coeficientes de difusão dentro da mesma ordem de grandeza dos encontrados em polímeros sintéticos de polietileno ou polipropileno (Schönherr, 1982; Barrie, 1968).

Apesar da sua natureza hidrofóbica, a matriz cuticular possui propriedades de transporte diferentes das ceras cuticulares e não é tão limitante à difusão de permeantes. De facto, a mobilidade das cadeias hidrocarbonadas do polímero de cutina aproxima-se mais da que é encontrada numa estrutura sem uma orientação específica, com características isotrópicas, do que se assemelha à de fases ordenadas, líquido-cristalinas, como as encontradas em membranas celulares (Wunderlich *et al.*, 1990). No entanto, a temperaturas elevadas, a mobilidade das cadeias hidrocarbonadas da matriz de cutina é, apesar de tudo,

significativamente menor do que a observada para as ceras cuticulares (Wunderlich *et al.*, 1990), deixando à matriz o papel fundamental de estabilização e de estruturação da cutícula.

A pH fisiológico, a matriz polimérica de cutina possui grupos carregados negativamente, provavelmente correspondentes a grupos  $-\text{COO}^-$  dos monómeros não esterificados e também a algum material proteico envolvido pela matriz durante a sua formação. Em função deste provável conteúdo residual de proteína, a matriz cuticular contém, também, grupos  $-\text{NH}_3^+$  (Schönherr, 1982). A identidade destas proteínas é desconhecida mas é provável que sejam enzimas envolvidas na biossíntese da cutina localizadas no meio extracelular e captadas no decorrer da polimerização da matriz.

A abundância de grupos funcionais polares na cutina, alguns dos quais são ionizáveis, confere-lhe características de polieletrólito, demonstrando-se que possui um ponto isoelétrico a pH cerca de 3 (Schönherr e Huber, 1977). Em consequência, a permeabilidade da matriz cuticular é influenciada pelo pH e pela natureza dos contra-íões associados às cargas negativas. O aumento de pH traduz-se num aumento da capacidade da matriz trocadora de íões e isso reflecte-se num aumento da permeabilidade da membrana à água (Schönherr, 1976a). Por outro lado, os grupos carregados negativamente discriminam entre os íões dos elementos dos metais alcalinos consoante o seu raio iónico cristalino, verificando-se em cutículas de folhas de *Citrus aurantium* L. um aumento da permeabilidade a água de acordo com o contra-íão associado à matriz, na ordem de  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+$  (Schönherr, 1976b). Esta é também a ordem de capacidade trocadora dos mesmos catiões observada na cutícula de *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate) (Schönherr e Bukovac, 1973) e em trocadores cationicos que contêm grupos carboxílicos em geral (Gregor *et al.*, 1956).

O maior destaque das propriedades da cutina relativamente às ceras cuticulares, vem, no entanto, de resultados de estudos realizados em cutículas de folhas de *C. aurantium* L. e da casca do bolbo de *A. cepa* L. (cebola), os quais apontaram para a existência de poros nesta membrana, com 0,41 – 0,45 nm de raio (Schönherr, 1976a, b). Resultados obtidos em estudos da cutícula isolada do fruto de *L. esculentum* Mill. mostraram-se também compatíveis com a existência de poros com as mesmas dimensões (Luque *et al.*, 1995). Não sendo provável a existência de poros no meio ceroso da cutícula, com algumas ceras em fases desordenadas e com um grau de fluidez que lhes permite alguma plasticidade, estas estruturas foram atribuídas ao polímero de cutina. De facto, uma estimativa do número de poros por unidade de superfície realizada nas membranas provenientes de folhas de *C. aurantium* L. indicou que uma

maior permeabilidade a água está associada a um maior número de poros na membrana e que esse número depende do pH e do índice de saturação da membrana com água (Schönherr, 1976b). Os poros observados na cutícula são, pois, estruturas dinâmicas, influenciadas pelo pH e pela hidratação da cutícula. Aparentemente, as dimensões destes poros não diferem entre membranas com espessuras ou estruturas distintas.

A constatação de que o pH e o tipo de catiões adsorvidos à matriz cuticular têm bastante influência na permeabilidade cuticular (Schönherr e Bukovac, 1973; Schönherr, 1976b; Smalley *et al.*, 1993) leva directamente à associação entre a existência de poros e o conteúdo de grupos funcionais ionizáveis da cutícula. Considera-se provável que estas estruturas correspondam a concentrações de grupos polares, constituindo uma rede de poros hidrofílicos com características percolantes. Além dos grupos polares da cutina, também se incluem neste papel os grupos hidroxilo de polissacarídeos englobados na cutícula. Observou-se experimentalmente que uma fracção das moléculas de água que se encontram na cutícula está em equilíbrio com a água atmosférica e é facilmente removida por aquecimento, ao passo que outra fracção se encontra fortemente associada à cutina por ligações de hidrogénio a grupos C=O, presentes no próprio polímero, e a grupos -OH, provenientes de polissacarídeos, e não é removida com aquecimento a 100 °C (Maréchal e Chamel, 1996).

Em contexto com a observação de água fortemente adsorvida em zonas internas da cutícula, regista-se um aumento da permeabilidade da membrana à água com a saturação da atmosfera com vapor de água (Schönherr e Schmidt, 1979). Este registo é interpretado como sendo consequência do aumento da quantidade de água na membrana, o que determina um aumento da quantidade de poros efectivamente hidratados. De acordo com o que sugerem alguns resultados experimentais, as propriedades do transporte de iões inorgânicos, e também de água, através da cutícula ajusta-se bem às características esperadas para a difusão através de estruturas porosas existentes na cutina (Schönherr, 2000; Schreiber *et al.*, 2001).

### 1.3.5 Permeabilidade cuticular a electrólitos

A natureza apolar da cutícula torna a dissolução de iões ou de compostos electrólitos na membrana um processo altamente desfavorável do ponto de vista energético (Honig *et al.*, 1986). Com a caracterização extensa do mecanismo de permeação de compostos orgânicos lipossolúveis, não se esclarece a questão da permeabilidade cuticular a iões inorgânicos, cuja

ocorrência há muito se conhece (Tukey, 1970). O fenómeno relativamente recente da poluição ambiental e das chuvas ácidas ajudou também a trazer para a ordem do dia a compreensão do mecanismo de penetração foliar de iões inorgânicos, em geral, e de protões, em particular.

A existência de poros hidratados ou canais que permitam a difusão de iões através da cutícula tem sido sucessivamente debatida na medida em que existem provas de que a cutícula possui poros e também de que a difusão de iões através destas estruturas justificaria alguns resultados experimentais como, desde logo, a elevada condutibilidade iónica da cutícula relatada em vários trabalhos (McFarlane e Berry, 1974; Tyree *et al.*, 1990a,b, 1991, 1992, Hauser *et al.*, 1993, Smalley *et al.*, 1993).

A demonstração de que a mobilidade de sais de cálcio na cutícula pode ser aumentada pela adição de surfactantes, ao mesmo tempo que não é praticamente afectada pelo aumento de temperatura ou pela presença de compostos adjuvantes (Schönherr, 2000, 2001), veio consolidar como alternativa ao percurso de difusão no meio hidrofóbico a hipótese de que ocorre difusão de electrólitos através de poros hidratados. Além do mais, a extracção das ceras cuticulares traduz-se num reduzido aumento da permeabilidade cuticular a sais de cálcio, de um factor de 2 a 3 vezes (Schönherr, 2000), um valor bastante mais modesto do que o que se observa quando o mesmo efeito é avaliado relativamente à permeação de solutos orgânicos ou de água (Tabela 1.2). Ainda em favor da hipótese de transporte de iões através de poros cuticulares hidratados, surge a observação de que a penetração de sais orgânicos é marcadamente dependente da humidade relativa a que se sujeita a cutícula, cujo aumento se traduziu num aumento da velocidade de permeação destes compostos, muito superior ao verificado por aumento da temperatura (Schönherr e Luber, 2001; Schönherr, 2002).

Apesar das evidências indirectas da sua existência, nomeadamente da estimativa das suas dimensões e número, estes poros não foram ainda directamente observados, não se conhecendo qual é a sua distribuição na membrana e como se fará a sua continuidade na região mais externa da cutícula, onde abundam as ceras. Dependendo de vários factores, o mecanismo de transporte por difusão em poros poderá ser bastante relevante para a condutância total da cutícula à água, com as consequentes implicações na regulação da taxa de transpiração cuticular.

### 1.3.6 Coexistência de mecanismos de transporte transcúticular

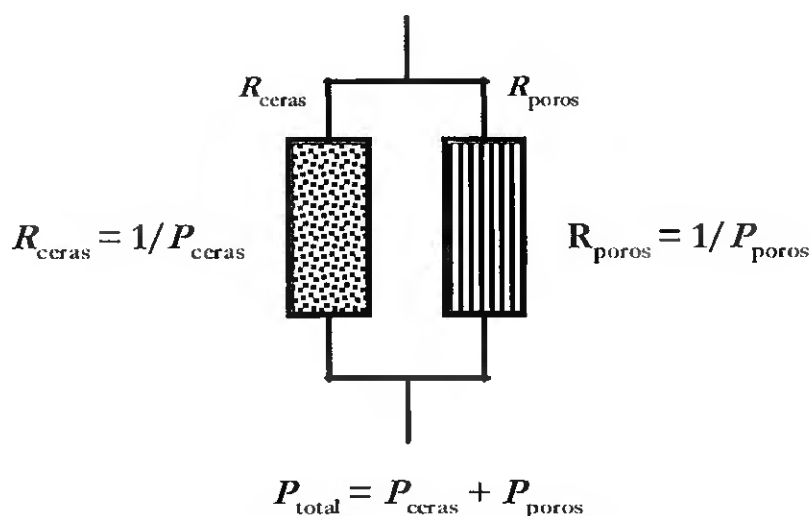
O transporte de água na cutícula é influenciado por alterações do potencial hídrico estabelecido através da membrana (Schreiber *et al.*, 2001) e esta observação pode ser tomada como evidência da permeação de água por poros polares hidratados que facilitam também a permeação de electrólitos através da cutícula. Simultaneamente, o transporte transcúticular de água apresenta características semelhantes ao de compostos orgânicos em geral, o que indica que a água também permeia a cutícula por dissolução nas ceras da membrana. Estas observações, aparentemente contraditórias, podem ser conciliadas tendo em consideração que ambos os mecanismos de transporte cuticular podem existir simultaneamente na membrana e não se excluem mutuamente.

A molécula de água é uma boa candidata a utilizar ambos os tipos de transporte em discussão. Se, por um lado, se dissolve com relativa facilidade no meio lipofílico da membrana, não possuindo carga iónica, por outro, deverá poder difundir através dos poros descritos para a cutícula, em virtude das suas reduzidas dimensões moleculares. De facto, é conhecida a elevada permeabilidade de membranas poliméricas apolares, por exemplo de polietileno, a moléculas de água (Barrie, 1968), pelo que é aceitável que a barreira de ceras epicuticulares seja também bastante permeável a água. Por outro, a molécula de água associa-se facilmente aos grupos polares da matriz cuticular e pode difundir através de poros hidratados, em virtude da sua polaridade e reduzida dimensão. No entanto, o efeito do potencial hídrico da membrana na permeabilidade da cutícula a água é relativamente modesto quando comparado com o dramático aumento da permeabilidade da cutícula ou diminuição da energia de activação para a permeação de água em consequência da extração das ceras (Schönherr, 1982). Uma vez que só os poros polares são influenciados pelo grau de hidratação da membrana, a maior parte da água parece ser transportada pelo mecanismo de dissolução e difusão no meio hidrofóbico da cutícula.

A resistência da cutícula ao transporte de água pode ser simbolizada por duas resistências em paralelo (Schönherr e Schmidt, 1979; Schreiber *et al.*, 2001), uma relativa à resistência das ceras cuticulares e outra representando a resistência dos poros polares da matriz cuticular. A mesma interpretação pode ser dada ao transporte de qualquer composto na cutícula, seja ele electrólito ou não. Enquanto que o mecanismo de permeação que pressupõe a dissolução do permeante e a sua difusão através de fases fluidas de ceras cuticulares deverá ser preferencialmente utilizado por compostos hidrofóbicos, o que pressupõe a difusão

através de poros hidratados será mais acessível a compostos hidrofílicos. Este último possui, ainda, uma limitação importante, que é a da dimensão dos poros, a qual impõe um limite à dimensão do permeante que pode ser transportado desta forma.

Em conclusão, a permeância total da cutícula pode ser simbolizada pela soma das permeâncias parciais de cada um dos modelos de transporte transcúticular, o de dissolução e o de difusão em poros, tal como esquematizado na Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Representação esquemática do transporte transcúticular. As resistências do percurso de difusão em meio lipofílico ( $R_{\text{ceras}}$ ) e de difusão em poros polares ( $R_{\text{poros}}$ ) são representadas em paralelo, simbolizando a coexistência dos respectivos mecanismos de permeação na cutícula (ver texto). A permeância total da cutícula ( $P_{\text{total}}$ ) é dada pela soma das permeâncias parciais de cada um desses mecanismos de transporte (adaptada de Schreiber *et al.*, 2001).

## 1.4 Investigação Necessária para Compreender a Cutícula

Da introdução anterior, destaca-se sobretudo o papel das ceras cuticulares como o principal meio limitante à difusão de compostos solúveis na cutícula e o pouco que se conhece sobre o processo de transporte por poros existentes na membrana.

Muito embora a difusão em poros polares possa justificar-se em função das características da matriz de cutina como trocador iónico, este modo de transporte não é

compatível com a interpretação da camada de ceras epicuticulares como uma camada contínua e só permeável por dissolução (Figura 1.4). Em conformidade com as características do transporte de água, as resistências de dissolução na membrana e de difusão através de poros são representadas em paralelo (Figura 1.7) mas, em consonância com o que se conhece da estrutura da cutícula, deveriam ser representadas em série, o que, aliás, é sugerido pelo papel desempenhado pelas ceras na regulação da permeabilidade cuticular (Tabela 1.2; Equação 1.3). No entanto, ambos os mecanismos parecem ser bastante independentes pois são influenciados por factores diferentes, nomeadamente, temperatura e compostos plastificadores das ceras, no caso do transporte por dissolução nas ceras, pH, humidade relativa e surfactantes, no que diz respeito à difusão em poros polares hidratados.

Para se compreender todo o processo de permeação, deve ser elucidada a questão de como se fará a continuidade do percurso de difusão por poros da matriz de cutina na camada de ceras epicuticulares. Uma hipótese que se pode colocar é a de que a coexistência de diferentes fases cristalinas possam proporcionar zonas de descontinuidade na camada de ceras, resultantes de descontinuidades no empacotamento cristalino. Porém, a verificarem-se, essas descontinuidades teriam de possuir dimensões tais que as tornassem acessíveis à difusão de iões e moléculas de reduzidas dimensões, como é o caso da molécula de água. Dependendo das suas dimensões, estas descontinuidades laterais podem mesmo ser hidratadas, estabelecendo uma continuidade de meio de difusão hidrofílico desde os poros da matriz de cutina até à camada de ceras epicuticulares. Uma outra hipótese a ter em conta é a de que as próprias ceras se organizem em estruturas moleculares em forma de canais condutores. É notável a capacidade de formação espontânea de agregados tubulares por parte de algumas ceras (Jetter e Riederer, 1995), bem como a auto-organização de constituintes de extractos de ceras naturais numa estrutura em bicamada (Reynhardt, 1997). Esta característica deve-se, provavelmente à necessidade de acomodar grupos funcionais com capacidade de formar pontes de hidrogénio numa matriz de cadeias hidrocarbonadas apolares (Lunden *et al.*, 1977).

Uma outra questão pertinente e que fica por esclarecer diz respeito a como se fará a distinção da composição de ceras intracuticulares e epicuticulares. As vias biossintéticas de síntese das ceras são conhecidas, bem como a localização das enzimas envolvidas no processo, as quais são encontradas na superfície das células da epiderme onde ocorre a expansão do polímero de cutina (Kolattukudy, 1996). Em consequência, considera-se que a acumulação de ceras na matriz de cutina se processa à medida que estas são sintetizadas. Mas, se fôr assim, a

distribuição das ceras deveria ser uniforme em toda a cutícula. Em extremo, poderia ocorrer uma estratificação da composição de ceras no sentido longitudinal da cutícula, em função de diferenças na actividade sintética das células da epiderme que lhe estão subjacentes. No entanto, existem provas de que a diferenciação em composição de ceras é feita em estratos horizontais, isto é, da superfície interna para a superfície externa da cutícula (Jetter *et al.*, 2000).

Ainda na perspectiva da distribuição de ceras na cutícula, coloca-se a questão de como a composição de ceras da cutícula será adaptada face à alteração de factores ambientais, não só sazonal mas também diária. A composição das ceras de algumas cutículas é ajustada qualitativamente e quantitativamente em função de factores ambientais como temperatura e humidade (Haas e Schönherr, 1979; Riederer e Schneider, 1990), idade e exposição solar da estrutura de onde é proveniente (Hauke e Schreiber, 1998), e poluição ambiental (Turunen *et al.*, 1997). Assumindo que as ceras renovadas difundem desde as células da epiderme, sua origem, até à superfície externa da cutícula, conforme alguns estudos apontam (Anton *et al.*, 1994; Neinhuis *et al.*, 2001), o ajuste a modificações ambientais terá de ser realizado progressivamente. No entanto, face ao reduzido coeficiente de difusão encontrado para ceras como octacosano ou dotriacontano em extractos reconstituídos de ceras naturais (Schreiber *et al.*, 1996b), prevê-se que as taxas de substituição de ceras por difusão através da cutícula sejam bastante lentas, não estando de acordo com as necessidades adaptativas da planta.

Uma alternativa à renovação das ceras por difusão através da cutícula seria a existência de um processo de extrusão directamente do seu local de síntese até à superfície da cutícula. Este é um assunto que se debate há algum tempo, encontrando-se alguns trabalhos em que se associa a presença de poros na cutícula com a secreção de depósitos de ceras (Hall, 1962, 1967). Ainda que a existência de canais semelhantes tenha sido posteriormente demonstrada na cutícula de várias espécies e que se especule que seja essa a sua função (Miller, 1985), actualmente considera-se que não existem provas da sua existência, pois não são observados na generalidade das cutículas mesmo recorrendo a diferentes abordagens histológicas (Jeffree, 1996). Acrescenta-se que os poros descritos nos trabalhos de Miller (1985) e Hall (1962, 1967) são distintos dos poros cuticulares descritos por Schönherr (1976a,b), não só no que diz respeito à sua função mas também às suas dimensões: enquanto que os primeiros são observáveis ao microscópio óptico e possuem diâmetros da ordem de alguns  $\mu\text{m}$ , dos segundos só se possuem evidências circunstanciais e uma estimativa de raio do poro de cerca de 0,45 nm. Continua, pois, por resolver a questão de como se produz e mantém o gradiente de composição de ceras e de como se fará o seu ajuste em função de estímulos ambientais.

Por último, em face da importância das ceras para as propriedades de barreira difusional da cutícula, tem sido procurada uma correlação entre permeabilidade cuticular e composição química ou estado físico das ceras (Schreiber e Riederer, 1996a, 1996b), sem que esses esforços tenham sido bem sucedidos. Provavelmente, a permeabilidade da cutícula não depende da composição em ceras propriamente dita mas sim do que essa composição determina em função das condições ambientais a que a cutícula está sujeita. No entanto, esta questão não foi, até agora, abordada nesta perspectiva e de uma forma sistemática.

## 1.5 Contexto e Objectivos da Investigação Apresentada

Considerando o modelo existente para a permeação da camada de ceras da cutícula, as propriedades de percolação das fases de ceras fluidas serão um factor determinante para a difusão de compostos neste meio. Noutra perspectiva, e em hipótese, a coexistência de fases cristalinas e as suas descontinuidades laterais poderão também ser um factor importante para a permeação do meio ceroso num mecanismo de difusão num contínuo aquoso que se estabeleça através da cutícula. Em ambos os casos, a permeação da camada cerosa dependerá simultaneamente da composição do sistema e de propriedades de estado como pressão e temperatura.

A hipótese anterior não foi, contudo, abordada de uma forma sistemática. Isso implicaria a completa caracterização do sistema de ceras cuticulares em termos de diagrama de fases, o que é virtualmente impossível num sistema tão complexo como o de uma mistura de ceras natural. No entanto, se o sistema cuticular for simplificado de modo a ser mais fácil conhecer, e controlar, a composição de fases das ceras que possui, então será possível a realização de estudos de permeação em função da composição de fases do sistema. Esta é a ideia fundamental em que assentou a concepção do projecto desenvolvido.

No trabalho que se apresentará em seguida, propõe-se a concepção de um modelo de cutícula vegetal baseada na composição e estrutura da membrana natural mas cuja composição de ceras seja simplificada e controlada por meio de um processo de deposição artificial. Este projecto pressupõe, porém, a realização de dois trabalhos adicionais: 1) a caracterização do comportamento de fases das ceras que irão substituir as ceras cuticulares e 2) a realização de estudos de permeabilidade cuticular em membranas naturais para avaliação do modelo de

cutícula artificial. Nesse contexto, e em virtude das lacunas no conhecimento no modelo de transporte por poros polares, pensou-se que seria particularmente interessante estudar o transporte de iões e pequenas moléculas polares, tanto nas cutículas naturais como no sistema cuticular modelo.

Na modelização de um sistema natural, será necessário avaliar o impacto da simplificação de cada um dos componentes, separadamente, correndo-se o risco de obter um modelo que não reflita as propriedades do sistema natural se tal não for acautelado. Uma vez que o objectivo do presente trabalho se centra na observação do efeito de substituição das ceras cuticulares por outras, optou-se por manter a matriz natural como base estrutural para a deposição das ceras artificiais. Pelas suas propriedades de trocador iónico, este componente desempenha um papel nas propriedades globais da cutícula que vai para além do seu papel estruturante e estabilizador na membrana.

Para a obtenção da matriz cuticular necessária para as membranas modelo, considerou-se a utilização da cutícula de tomate, não só pela relevância do estudo da cutícula de um fruto com projecção comercial, e fácil de obter em largas quantidades, mas, também, por esta cutícula já ter sido objecto de alguma caracterização estrutural e funcional. Não menos importante, foi o facto de alguns estudos preliminares mostrarem que esta cutícula podia ser facilmente isolada promovendo a digestão enzimática dos polissacarídeos que a ligam à parede celular das células subjacentes. Além do mais, ainda se revelou bastante resistente à tracção mecânica, o que é uma característica fundamental para que a manipulação destas membranas não resulte em artefactos nas medições de permeabilidade.

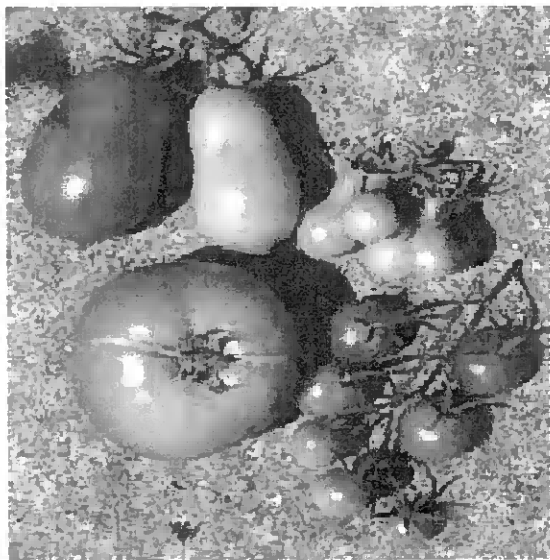
## 1.6 A Cutícula de Tomate

A cutícula de tomate foi escolhida como modelo de estudo das propriedades da cutícula vegetal em geral e como fonte de matriz cuticular para o sistema cuticular modelo. Por esse motivo, apresentam-se umas breves notas acerca da origem da planta e resumem-se as principais características da composição e estrutura da sua cutícula.

O tomate (Figura 1.8) é um fruto originário da América do Sul, da área dos Andes, mas foi no México que a planta que lhe dá origem foi domesticada e que este fruto começou a ser utilizado para alimentação, não se sabendo como se processou a sua dispersão desde a região

de origem. O seu nome vulgar é derivado da palavra *tomatl*, designação utilizada para o fruto pelos índios Mexicanos. Pensa-se que o cultivo e consumo de tomate foi introduzido na Europa pelos Espanhóis, no século XVI, após a sua conquista do México, mas só no final do século XVIII se encontram os primeiros registos da sua utilização em abundância em Espanha e em Itália, enquanto que em França se começa nessa altura a popularizar o seu consumo. Ao mesmo tempo, nos países do norte da Europa, o consumo de tomate era encarado com algum receio em virtude da sua fama de ser um fruto não comestível por pertencer a uma família taxonómica que reúne outras plantas com frutos venenosos.

Apesar da sua origem no continente Americano, a sua popularidade neste continente só se generalizou no século passado, tendo sido durante longo tempo considerada nos Estados Unidos como uma planta ornamental de jardim, conhecida como *love apple*. Face à sua vasta utilização actual na indústria de produtos alimentares, a cultura de tomate possui um importante valor económico e esta foi uma das primeiras plantas a ser objecto de modificações genéticas com vista a aumentar taxas de consumo e produção agrícola.



**Figura 1.8.** Hoje em dia é possível encontrar muitas variedades de tomate em consequência da selecção de frutos consoante características de tamanho, formato, sabor ou resistência a doenças.

O tomate foi originalmente classificado como *Solanum lycopersicum* por Carolus Linnaeus, em 1753, mas Philip Miller, na sua publicação de 1768, *The Gardners Dictionary*, popularizou a designação de *Lycopersicon esculentum*, a qual se tornou o nome sistemático aceite desde então. Recentemente, vários estudos moleculares (Bohs e Olmstead, 1997; Olmstead e Parker, 1997)

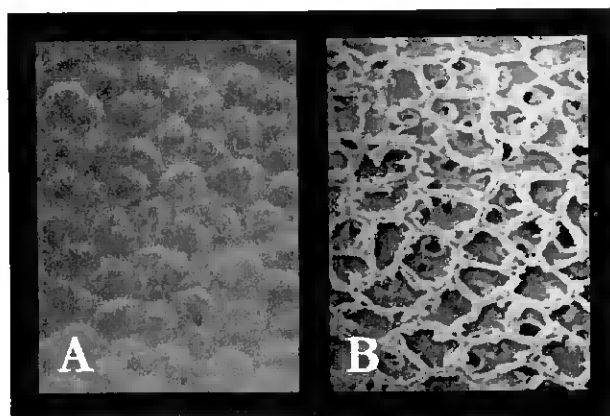
concluíram que esta planta pertence, de facto, ao género *Solanum*, o que implica uma relação filogenética próxima com vegetais como a batata, o pimento ou a beringela. Apesar desta reclassificação, o nome sistemático utilizado durante este trabalho foi o de *Lycopersicon esculentum* Mill., em virtude de este ser o nome genericamente utilizado na literatura encontrada sobre este fruto.

A cutícula de *L. esculentum* tem sido estudada a par da cutícula de outras plantas. Resultados de uma investigação envolvendo técnicas de microscopia electrónica de transmissão, realizada por Wilson e Sterling (1976), mostram que a cutícula de tomate possui entre 4 a 10  $\mu\text{m}$  de espessura e que é coberta por uma fina camada de ceras epicuticulares. Na membrana cuticular são identificadas duas zonas distintas: uma, onde abunda a cutina, localiza-se em contacto com as células da epiderme do fruto e corresponde a uma zona com aspecto globular; a outra, onde se concentram as ceras cuticulares, corresponde à região designada por cutícula própria e localiza-se junto da superfície externa do fruto. Nestes estudos não se evidenciou nenhum tipo de estrutura porosa ou de canais na cutícula de tomate. Outra característica desta cutícula é a presença de extensões da matriz de cutina que se prolongam para o interior do fruto, com o aspecto de estalactites. Segundo Wilson e Sterling (1976), estas estruturas são semelhantes às observadas nas cutículas de *Asparagus* (Fritz, 1937) e *Cunninghamia* (Alvin e Boulton, 1974).

A cutícula de tomate não possui estomas (Wilson e Sterling, 1976). A sua superfície externa apresenta um aspecto liso e com zonas salientes em forma de cúpula convexa para o exterior, distribuídas uniformemente, correspondentes à localização das células da epiderme. Com o recurso à técnica de microscopia de força atómica foi demonstrado, mais recentemente, que a altura destas cúpulas é, aproximadamente, de 1,4  $\mu\text{m}$  (Round *et al.*, 2000). A extracção das ceras superficiais não altera significativamente o aspecto da superfície externa da cutícula, pois não são aí observadas, à partida, estruturas formadas pelos depósitos de ceras cristalinas como os observados em outras cutículas (Baker, 1982). A superfície interna possui um aspecto granuloso, com extensões de material cutinizado que aparentam rodear parcialmente as células da epiderme. As imagens patentes na Figura 1.9 foram obtidas por microscopia electrónica de varrimento e pretendem ilustrar a caracterização da cutícula de tomate atrás referida.

Diversos estudos realizados na cutícula de tomate têm contribuído para o esclarecimento da composição, estrutura e dinâmica molecular do polímero de cutina

(Schönherr e Bukovac, 1973, Luque *et al.*, 1995; Petracek e Bukovac, 1995; Stark *et al.*, 2000; Round *et al.*, 2000), demonstrando que este poliéster se comporta como um trocador iônico, com grupos carboxilo ionizáveis, o qual aumenta a sua elasticidade quando hidratado, provavelmente em consequência do aumento de mobilidade de segmentos hidrocarbonados dos monómeros.



**Figura 1.9.** Superfície externa (A) e superfície interna (B) da cutícula de tomate isolada por digestão enzimática ( $\times 250$ ). As imagens foram obtidas por microscopia electrónica de varrimento num microscópio Jeol JSM 5400, a 15 kV, após cobertura superficial com um filme de ouro/paládio.

As alterações estruturais induzidas na matriz de cutina pela variação da temperatura têm sido objecto de estudo em várias cutículas, incluindo a cutícula de tomate (Luque e Heredia, 1997). Estes últimos autores concluíram que o poliéster de cutina desta cutícula apresenta uma transição de fase de segunda ordem, a temperaturas que rondam os 40 °C. Em conformidade com a interpretação do mesmo fenómeno em outras membranas cuticulares, essa transição é devida a uma expansão de volume da matriz de cutina e deverá traduzir-se no aumento da permeabilidade da cutícula a água (Schreiber e Schönherr, 1990). Ainda de acordo com o estudo de Luque e Heredia (1997), as ceras da cutícula de tomate derretem a temperaturas cerca de 60 °C, numa transição de primeira ordem, não se registando cooperatividade entre a transição de fase do polímero de cutina e a transição de fase das ceras cuticulares. Os mesmos autores concluem, também, que o poliéster de cutina possui uma transição vítrea a -47 °C, uma temperatura bastante mais elevada do que encontrada para polímeros elastómeros como polibutadieno ou polietileno mas que se aproxima da temperatura de transição vítrea de polímeros como *n*-propil-poliacrilato ou éteres de polivinil (de acordo com referências citadas por Luque e Heredia, 1997).

A composição da cutina e das ceras cuticulares de *L. esculentum* Mill. cv. Michigan Ohio, acompanhando várias das fases de crescimento e maturação do fruto, foi determinada por

Baker *et al.* (1982). Neste estudo, foi registado um aumento progressivo da espessura da cutícula do fruto à medida que o seu crescimento e maturação evoluiu. Ao mesmo tempo, o seu conteúdo relativo em ceras intracuticulares e epicuticulares decresceu de 12% (em massa), na cutícula de frutos verdes de 12 mm, para menos de 3%, em frutos maduros e completamente desenvolvidos com cerca de 70 mm (Tabela 1.4). Em contraste, o conteúdo da membrana em compostos fenólicos, acumulados essencialmente numa forma não solúvel no interior da matriz de cutina, aumentou de 1,5% para 4,4% durante a expansão do fruto verde, atingindo 11% após o seu amadurecimento.

Ao longo do processo de maturação, a cutícula de tomate adquire progressivamente uma cor amarelada em consequência da acumulação de flavonóides<sup>2</sup>, entre os quais a chalconaringenina é encontrada em proporção maioritária. Este flavonoide pode atingir 3,1% do peso seco da cutícula em frutos maduros, na qual também se acumulam quantidades significativas de naringenina (2,5%), ácido *m*-cumárico (2,3%) e ácido *p*-cumárico (1,8%). Nos frutos verdes em desenvolvimento só foram detectados os isómeros do ácido cumárico, em quantidades vestigiais e em percentagens relativas semelhantes.

**Tabela 1.4.** Constituintes da cutícula de tomate (cv. Michigan Ohio) e respectiva quantidade ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) em diversas fases de crescimento do fruto (adaptada de Baker *et al.*, 1982).

Constituinte	Diâmetro do fruto (mm)					
	12	20	32	56	76	73 <sup>a</sup>
Cutícula total	60	82	416	1095	1172	1231
Ácidos de cutina	31	52	339	901	962	929
Compostos fenólicos fixos	1	2	11	39	51	121
Ceras epicuticulares	4	5	8	16	17	21
Ceras intracuticulares	4	9	23	24	16	35
Compostos fenólicos solúveis	v <sup>b</sup>	v	v	v	1	16
Resíduo	19	14	35	116	125	109

<sup>a</sup> Fruto maduro; <sup>b</sup> Quantidades vestigiais.

<sup>2</sup> Compostos fenólicos constituídos por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três grupos metileno. Fazem parte deste grupo vários compostos responsáveis pela pigmentação de flores e frutos, compostos com acção insecticida ou compostos envolvidos em mecanismos de protecção contra danos causados pela radiação ultravioleta.

O polímero de cutina da cutícula de tomate é constituído principalmente por isómeros do ácido dihidroxihexadecanóico (entre 74% e 92%), acompanhados por quantidades também significativas dos ácidos 9,10,18-trihidroxi-octadecanóico e 9,10,18-trihidroxi-12-octadecenoico no caso da cutina de frutos em desenvolvimento. As ceras epicuticulares dos frutos verdes são essencialmente constituídas por hidrocarbonetos (94%) com comprimentos de cadeia entre  $C_{28}$  e  $C_{35}$ , dos quais se destacaram os hidrocarbonetos ramificados 2-metiloctacosano (11%) e 2-metiltriacontano (24%) como os mais abundantes. Nos frutos maduros, a fracção de hidrocarbonetos nas ceras epicuticulares é reduzida para 29% do total de ceras, passando a ser hentriacontano o componente mais abundante desta fracção (53%). Os triterpenóis  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirína (27%), e os flavonóides chalconaringenina (11%) e naringenina (32%) são as ceras epicuticulares mais abundantes nos frutos maduros. Em todas as fases de desenvolvimento e maturação, os ácidos gordos  $C_{16}$  e  $C_{18}$  são identificados como as ceras intracuticulares mais abundantes (entre 43% e 81%).

Conhece-se pouco acerca da permeabilidade da cutícula de tomate, à parte de alguns estudos de permeabilidade à água (Becker *et al.*, 1986) ou ao ácido 2-(1-naftil)-acético (Knoche e Bukovac, 2001). Do primeiro estudo, concluiu-se que a permeabilidade à água da cutícula deste fruto é relativamente elevada quando comparada com a permeabilidade de cutículas de folhas de outras espécies de plantas, sendo, no entanto, da mesma ordem de grandeza da permeabilidade de cutículas de outros frutos. No segundo estudo, demonstrou-se que a taxa de penetração do ácido 2-(1-naftil)-acético aumentou exponencialmente com o aumento de temperatura, obtendo-se uma energia de activação para a penetração deste composto na cutícula de cerca de  $150 \text{ kJ mol}^{-1}$ , entre 5 e 35 °C. O mesmo estudo concluiu, ainda, que o aumento de humidade relativa da cutícula se reflectiu num aumento da permeabilidade da membrana a este composto.

Caracterizam-se os modelos de transporte transcuticular por dissolução na membrana e por difusão em poros polares. Desenvolve-se uma célula de permeação para medição de fluxo transcuticular. Determina-se a permeância da cutícula de tomate e da sua matriz relativamente a alguns cátions e ânions monovalentes, numa série de aumento progressivo do raio iónico, e relativamente a uma série de álcoois de baixo peso molecular, em função da sua dimensão molecular e coeficiente de partição para a membrana. Interpretam-se e discutem-se os resultados salientando as características de transporte observadas para cada permeante relativamente aos mecanismos de transporte transcuticular conhecidos.

---

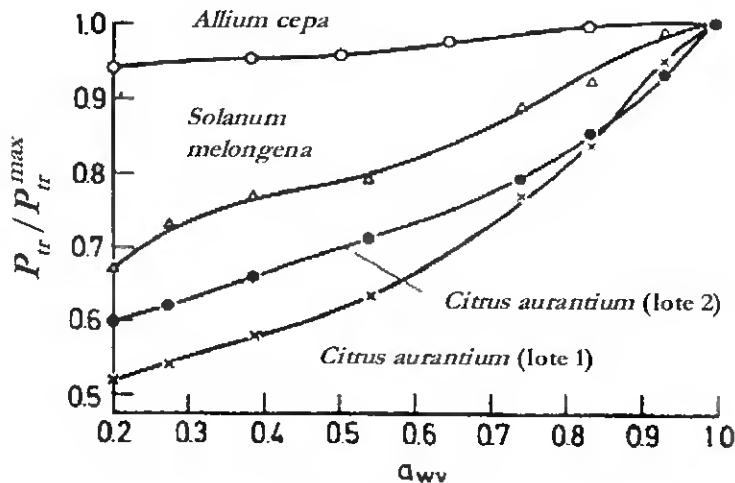
## Capítulo 2

### Transporte Transcuticular de Iões e Pequenas Moléculas Polares

#### 2.1 Transporte Transcuticular

O transporte através da cutícula ocorre em condições de não equilíbrio, quando existe um gradiente de potencial químico de solutos ou gases entre o interior e o exterior da planta. Inúmeras evidências experimentais demonstram que o transporte transcuticular de solutos orgânicos depende da dissolução do permeante no ambiente apolar da cutícula (Schönherr, 1982; Schreiber *et al.*, 1996a). Sendo esta uma característica do transporte em membranas hidrofóbicas, entende-se a cutícula como um meio de características poliméricas, cuja permeabilidade depende da facilidade com que um dado permeante se dissolve e difunde na membrana, a favor de um gradiente de potencial.

Sendo a cutícula uma membrana de dissolução, a sua permeabilidade não deve ser influenciada pelo gradiente de potencial do permeante. No entanto, a permeabilidade de algumas cutículas, nomeadamente a água, pode ser bastante influenciada pelo gradiente de potencial hídrico estabelecido através da membrana (Figura 2.1). Esta observação trouxe à discussão a possibilidade de existência de um mecanismo de permeação cuticular alternativo ao de dissolução, pelo menos no caso de algumas espécies vegetais (Riederer e Schreiber, 2001). Significativamente, esta interdependência entre permeabilidade e gradiente de potencial hídrico que é observada na cutícula é uma característica do transporte em membranas poliméricas que possuem grupos substituintes de natureza polar, que se comportam como membranas porosas (Schönherr, 1982).



**Figura 2.1.** Efeito da actividade de vapor de água,  $a_{wv}$ , na permeabilidade de membranas cuticulares. A permeância,  $P_{tr}$ , foi medida por monitorização da transpiração cuticular num sistema do tipo água/membrana/vapor de água (adaptada de Schönherr, 1982). O máximo de permeância,  $P_{tr}^{max}$  ( $a_{wv} = 1$ ), foi, para *Citrus aurantium* L., de  $5,17 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$  (lote 1, pH 3,  $\text{Na}^+$  como contra-ião) ou de  $3,33 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$  (lote 2, pH 6,  $\text{Ca}^{2+}$  como contra-ião); para *Allium cepa* L., foi de  $4,30 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$  (pH 6,  $\text{Ca}^{2+}$  como contra-ião) e para *Solanum melongena* L., foi de  $2,5 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$  (pH 6,  $\text{Ca}^{2+}$  como contra-ião).

Vários factos apontam para que a permeação da cutícula seja feita por um mecanismo alternativo ao de dissolução na membrana, mediado por poros existentes na membrana. De facto, o aumento da temperatura ou mesmo a presença de agentes químicos que fluidizam a camada cerosa da cutícula tem um efeito praticamente negligenciável na permeabilidade da cutícula a iões (Schönherr, 2001), concluindo-se que estes são transportados por um

mecanismo independente da composição e propriedades das ceras cuticulares. Por sua vez, a observação de que o aumento da humidade relativa e surfactantes facilitam a permeabilidade iónica indica também que o transporte transcuticular de iões inorgânicos e provavelmente de electrólitos em geral ocorre por intermédio de poros polares, provavelmente hidratados (Schönherr, 2000). Em face dos resultados destes estudos, parece evidente que existem (pelo menos) dois mecanismos de transporte disponíveis na cutícula, um dependente da dissolução na membrana e outro independente, mediado por poros, ou estruturas facilitadoras de difusão na cutícula, cada um com características próprias de transporte e que, em conjunto, são responsáveis pelas características do transporte transcuticular.

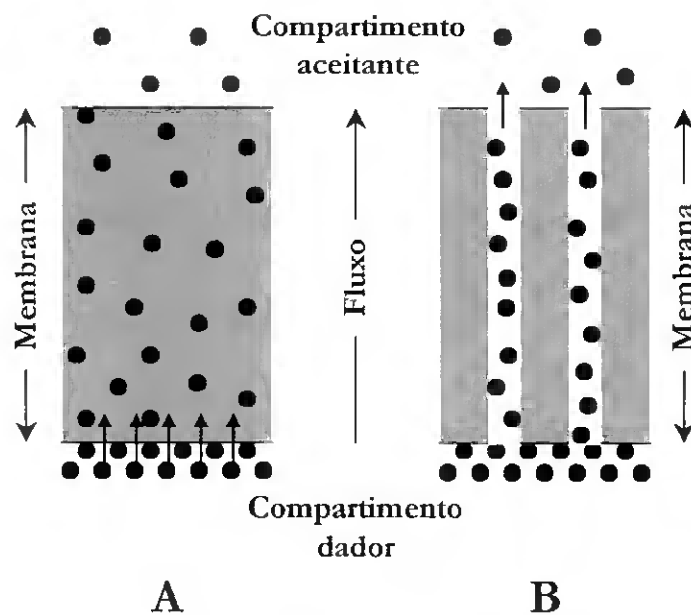
Apesar das evidências de que a cutícula se pode comportar como uma membrana porosa, é o transporte por dissolução no ambiente hidrofóbico da cutícula que justifica a maior parte das suas características de permeabilidade a água e, principalmente, a compostos orgânicos lipossolúveis como os que são utilizados na indústria agro-química (Kirkwood, 1999). Mesmo sendo aparentemente insignificante quando comparado com o transporte por dissolução, o transporte transcuticular por poros polares poderá revelar a sua importância fisiológica quando estiver em causa a permeação de sais inorgânicos ou de moléculas polares, uma vez que a dissolução destas espécies químicas na membrana hidrofóbica será energeticamente desfavorável.

## 2.2 Membranas de Dissolução e Membranas Porosas

O fluxo de massa através de membranas de dissolução e de membranas porosas é condicionado por factores diferentes.

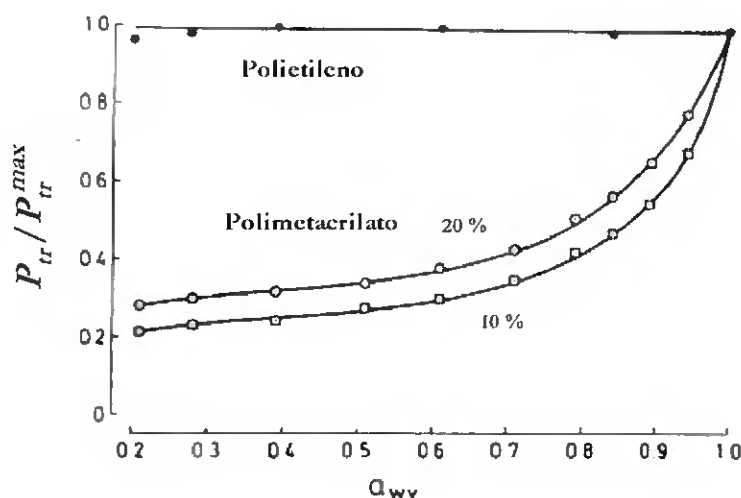
As membranas poliméricas constituídas por cadeias hidrocarbonadas sem substituintes polares são denominadas membranas de dissolução e apresentam uma estrutura regular e elevado grau de empacotamento molecular (Barrie, 1968). Para que ocorra transporte passivo através destas membranas, é necessário que um dado permeante se dissolva primeiro na membrana e depois difunda nela, em função do gradiente de concentração, até à superfície de desadsorção. A permeabilidade de polímeros hidrofóbicos a água é bastante reduzida e é semelhante à permeabilidade de membranas cuticulares a água, da ordem de  $10^{-12}$  a  $10^{-14}$  m s<sup>-1</sup> por cm de espessura de membrana (Schönherr, 1982).

Numa membrana de dissolução, um dado permeante difunde através da membrana no estado gasoso, sem formar aglomerados moleculares, independentemente do gradiente de potencial estabelecido (Figura 2.2-A). Por seu lado, as membranas porosas podem acomodar agregados moleculares ou, até permitir a formação de um fluxo laminar contínuo de permeante no estado líquido através da membrana. Exemplos de membranas porosas são as constituídas por polímeros com substituintes polares na sua estrutura hidrocarbonada. A forma como o permeante é transportado através da matriz porosa de um polímero polar depende, antes de mais, da proximidade dos grupos polares e das dimensões e continuidade dos canais formados por eles. No caso em que uma membrana desta natureza está em contacto com uma solução aquosa, pode constituir-se uma rede de canais aquosos cujo interior é contínuo com a solução (Figura 2.2-B). Se esta membrana separar uma solução aquosa e uma atmosfera gasosa, a passagem da água do estado líquido para o estado gasoso ocorre somente na superfície em contacto com a atmosfera e não na superfície em contacto com a solução aquosa, como deve acontecer para o transporte de água numa membrana de dissolução.



**Figura 2.2.** Modelos de transporte passivo através de membranas poliméricas: exemplo de uma membrana de dissolução (A) e de uma membrana porosa (B). As setas mais pequenas indicam a superfície em que o permeante passa do estado líquido ao estado gasoso (adaptada de Schönherr e Schmidt, 1979).

A solubilidade da água em polímeros hidrofóbicos, como os de polietileno ou polipropileno (por exemplo) é directamente proporcional à pressão de vapor de água, com um coeficiente de solubilidade constante (Yasuda e Stannett, 1962), em concordância com a lei de Henry<sup>3</sup>. Neste tipo de membranas, o fluxo de água é proporcional ao gradiente de potencial hídrico estabelecido através da membrana, e a permeância da membrana é constante. Isso mesmo se pode verificar na Figura 2.3, para uma membrana de polietileno. Por outro lado, em polímeros polares, a permeabilidade da membrana aumenta com o aumento do gradiente de potencial hídrico, como no exemplo que se apresenta na Figura 2.3, para uma membrana de polimetacrilato que contém grupos  $-\text{COOH}$  fixos na matriz polimérica.



**Figura 2.3.** Efeito da actividade de vapor de água,  $a_{wv}$ , na permeância,  $P_{tr}$ , de membranas artificiais de polietileno e de polimetacrilato, medindo a transpiração que ocorre através das membranas num sistema água/membrana/vapor de água (adaptada de Schönherr e Ziegler, 1980). As membranas de polimetacrilato foram preparadas utilizando *bis*-metacrilato de etileno como agente de polimerização cruzada, numa concentração de 10% ou 20% (v/v), respectivamente. A permeância máxima,  $P_{tr}^{max}$  ( $a_{wv} = 1$ ), medida na membrana de polietileno foi de  $6,2 \times 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ , enquanto que na membrana de polimetacrilato 10% foi de  $4,30 \times 10^{-7} \text{ m s}^{-1}$ , e na membrana de polimetacrilato 20% foi de  $4,23 \times 10^{-7} \text{ m s}^{-1}$ .

<sup>3</sup> Segundo enunciado pela lei de Henry, a solubilidade molar de um gás num líquido é directamente proporcional à pressão do gás sobre a solução, com uma constante de proporcionalidade definida para um dado sistema de gás e solvente, a uma dada temperatura.

Num polímero hidrofílico, a quantidade de moléculas de água que se encontram adsorvidas aos grupos polares aumenta com o aumento da pressão de vapor de água. Sendo assim, a solubilidade de água no polímero não é só dependente da pressão de vapor de água, não se aplicando a lei de Henry (Barrie, 1968; Yasuda e Stannett, 1962). Neste tipo de polímeros, o coeficiente de difusão das moléculas de água aumenta, também, em consequência do aumento do conteúdo de água da membrana (Barrie, 1968) e a permeância do polímero a água aumenta proporcionalmente.

As membranas de polímeros polares (porosas) são muito mais permeáveis a água do que as membranas hidrofóbicas (de dissolução). Por exemplo, numa resina de troca iónica Dowex 50 (poliestireno de ácido sulfónico interligado com divinilbenzeno), a energia de activação medida para a difusão de água é de  $21,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ , muito próxima da energia de activação para a auto-difusão de água, que é de  $18,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Meares, 1968). Por outro lado, a energia de activação para a permeação de água num polímero de etilcelulose é de  $27,6 \text{ kJ mol}^{-1}$  e num polímero de polietileno é de  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Yasuda e Stannett, 1962). Numa população de cutículas de folhas de *Citrus aurantium* L., constatou-se que a barreira energética para a permeação da água pode variar entre 52 e  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Schönherr *et al.*, 1979), sendo este valor mais próximo dos valores encontrados em membranas de dissolução do que dos medidos em membranas porosas.

Apesar de a barreira energética da cutícula para o transporte de água ser o característico de uma membrana de dissolução, o transporte de água apresenta-se também dependente do gradiente de potencial hídrico da membrana, o que já é uma característica de transporte numa membrana porosa, concluindo-se que a cutícula apresenta características mistas, tanto de membrana de dissolução, de características hidrofóbicas, como de membrana porosa, analogamente a um polímero polar, pelo menos no que diz respeito ao transporte de água. Se ambos os processos de transporte, o de dissolução na membrana e o de difusão por poros de dimensões moleculares, estão simultaneamente presentes na cutícula, surge inevitavelmente a questão da sua função fisiológica e da sua especificidade quanto a mecanismos de regulação. Dada a natureza polimérica da matriz de cutina, pode entender-se estender o conhecimento adquirido acerca destes dois modos de transporte em polímeros sintéticos, mas não pode ser menosprezado o papel regulador da permeabilidade cuticular desempenhado pelas ceras, sendo importante perceber de que modo a sua presença condiciona e/ou regula cada um dos mecanismos de transporte transcuticular em discussão.

### 2.2.1 Transporte transcuticular por dissolução

Segundo enunciado pela Lei de Fick para a difusão passiva, o fluxo de massa por unidade de superfície,  $J$  ( $\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), que ocorre através de uma membrana de dissolução é directamente proporcional ao gradiente de concentração da espécie permeante,  $\Delta C$  ( $\text{mol m}^{-3}$ ), e inversamente proporcional ao percurso de difusão entre as superfícies da membrana,  $\Delta x$  (m), o que é traduzido pela expressão (Crank e Park, 1968):

$$J = -D \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (2.1)$$

onde  $D$  ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ), é o coeficiente de difusão, uma medida da mobilidade da espécie permeante na membrana. Numa membrana homogénea e de volume constante, a distância entre a superfície de adsorção e a superfície de desadsorção de permeante,  $\Delta x$ , corresponde à espessura da membrana.

No caso em que uma membrana de dissolução separa duas soluções aquosas, a concentração de permeante nas superfícies da membrana é função da concentração de permeante na fase aquosa  $C_{aq}$  e do seu coeficiente de partição da fase aquosa para a membrana,  $K_p$ . Assim, a Equação 2.1 pode ser escrita em função das concentrações de permeante na solução dadora e na solução aceitante de soluto,  $C_{aq,d}$  e  $C_{aq,a}$ , respectivamente, de acordo com a equação:

$$J = P(C_{aq,d} - C_{aq,a}) \quad (2.2)$$

onde  $P$  representa a permeância da membrana, e reúne em si os coeficientes  $D$  e  $K_p$  e a extensão do percurso de difusão,  $\Delta x$ :

$$P = \frac{DK_p}{\Delta x} \quad (2.3)$$

A permeância,  $P$ , é uma medida da permeabilidade da membrana relativamente a um composto que nela se dissolve e é expressa em unidades de velocidade de deslocação de soluto ( $\text{m s}^{-1}$ ). Uma vez que é independente do gradiente de concentração de permeante, do tempo de medição e da área de superfície da membrana, o seu valor pode ser utilizado para comparar a permeabilidade de membranas, nomeadamente de cutículas, relativamente a um dado permeante.

### 2.2.2 Transporte transcuticular através de poros

O tamanho relativo dos poros e do permeante determinam o tipo de transporte que se verifica através de uma membrana porosa. Quando se estabelece um gradiente de potencial químico entre duas soluções separadas por uma membrana porosa cujos poros possuam dimensões superiores em várias ordens de grandeza às do permeante, o transporte que se verifica no sentido de restabelecer o equilíbrio de potencial far-se-à por capilaridade (Solomon, 1968). Mas se o raio médio dos poros de uma membrana porosa é cerca do dobro do de uma dada molécula permeante, o fluxo por capilaridade e por difusão através dos poros já têm igual expressão e no caso em que as dimensões dos poros e do permeante são semelhantes, o fluxo de permeante registado será por difusão (Ticknor, 1958).

Considerando que iões e solutos hidrofílicos podem permear a membrana cuticular utilizando as suas facilidades de membrana porosa, pode discutir-se se o mecanismo de permeação envolve a difusão num contínuo de meio aquoso, que eventualmente se estabelece através da membrana se os canais polares tiverem dimensões suficientes para serem hidratados, ou se envolve a difusão de permeante no espaço livre deixado pelos grupos polares que, em hipótese, formam os ditos poros. Dada a dimensão que foi estimada por Schönherr (1976a,b) para os poros da matriz cuticular (raio de 0,45 nm), não é de excluir que mesmo as moléculas de água possam atravessar os poros cuticulares por difusão e não por capilaridade, uma vez que uma molécula de água possui um raio de 0,197 nm (Schönherr, 1976b), bastante próximo do dos poros cuticulares. Num trabalho de Maréchal e Chamel (1996) concluiu-se que enquanto uma fracção das moléculas de água que formam pontes de hidrogénio com elementos da matriz cuticular são facilmente removidas por evaporação, uma outra fracção encontra-se fortemente ligada à matriz cuticular por meio de três ligações de hidrogénio e é resistente à evaporação. A formação desta quantidade de pontes de hidrogénio por uma molécula de água é compatível com uma elevada proximidade dos grupos funcionais polares

que podem participar neste tipo de ligações, o que indica que mesmo as moléculas de água poderão passar pelos denominados poros polares da matriz cuticular por difusão e não por capilaridade.

Numa membrana porosa, quando o transporte através de poros ocorre por difusão e não por capilaridade, o fluxo transmembranar é descrito, também, pela lei de Fick (Equação 2.1). Porém, neste caso é necessário ter em conta que a área de membrana acessível para a difusão corresponde à área total dos poros nela existentes,  $A_p$ , que é dependente do número de poros,  $n$ , e do seu raio médio,  $r$ , e é dada pelo produto  $n\pi r^2$  (Schönherr, 1976b). Assim sendo, o fluxo de um dado permeante de uma membrana porosa,  $J_p$ , será dado pela expressão:

$$J_p = -D \frac{A_p}{A_m} \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (2.4)$$

onde  $A_m$  representa a área de superfície de membrana para a qual vem referenciada a medição do fluxo, geralmente  $1 \text{ m}^2$  (Lei de Fick, Equação 2.1). Assim sendo, a permeância da membrana porosa,  $P_p$ , depende de  $D$  e de  $\Delta x$  e também da área efectiva dos poros da membrana segundo a relação:

$$P_p = \frac{D}{\Delta x} \frac{A_p}{A_m} \quad (2.5)$$

A razão  $A_p/A_m$  é uma medida da área de membrana efectivamente utilizada para a difusão de um dado permeante na fracção porosa da membrana e substitui o coeficiente  $K_p$  na expressão que define os factores que afectam a permeância de uma membrana de dissolução, apresentada na Equação 2.3.

### 2.2.3 Barreiras energéticas no transporte transcuticular

O modelo de transporte transcuticular que envolve dissolução e difusão de um dado permeante na cutícula apresenta, pelo menos, duas barreiras energéticas que têm de ser vencidas para que o transporte possa ocorrer: a primeira consiste na energia de activação de partição da molécula permeante para a membrana, a qual dependerá da energia livre de dissolução nos meios externo e interno da membrana e da energia livre de desidratação, se o permeante se encontrar inicialmente dissolvido em solução aquosa; a segunda relaciona-se com a energia de activação para a difusão na membrana e é dependente das dimensões do permeante e da viscosidade do meio de difusão que lhe está disponível na membrana. A barreira energética da dissolução está ausente no modelo de transporte por difusão em poros polares, se estes constituírem um ambiente aquoso. Neste caso, a barreira de dissolução é substituída pela barreira energética da limitação ao transporte imposta pelas dimensões dos poros. Esta barreira só pode ser vencida por alguns permeantes, dependendo das suas dimensões moleculares, e é tanto maior quanto mais as dimensões dos poros se aproximarem das da molécula permeante. Finalmente, também no modelo da membrana porosa, a difusão acarreta custos energéticos para o processo, sendo estes substancialmente reduzidos se a difusão se der num meio aquoso contínuo entre as soluções separadas pela membrana, caso em que serão essencialmente determinados pela difusão em solução aquosa.

### 2.2.4 Selectividade e tortuosidade da cutícula

A extensão do percurso de difusão de um dado permeante através da cutícula depende da tortuosidade da membrana e é provável que seja distinto consoante o mecanismo de permeação aplicável, seja o de dissolução e difusão no meio apolar ou o de difusão através de poros polares.

Existem alguns dados comparativos, em termos relativos, da selectividade e da tortuosidade de cutículas e da matriz cuticular no que diz respeito à permeação de compostos orgânicos, os quais possuem características de transporte transcuticular que indicam que estes compostos permeiam a membrana por dissolução (Baur *et al.*, 1996; Buchholz *et al.*, 1998; Baur *et al.*, 1999). Essencialmente, os vários estudos efectuados permitem concluir que as diferenças de mobilidade de solutos orgânicos entre diferentes cutículas se ficam a dever a diferenças na tortuosidade do percurso de difusão, ao passo que o factor de selectividade encontrado é

muito semelhante entre membranas. Ao mesmo tempo, estes mesmos estudos mostram que a matriz cuticular possui uma selectividade idêntica à da cutícula da qual é obtida mas que possui um factor de tortuosidade menor. Conclui-se, pois, que a resistência adicional à difusão que é conferida pela presença das ceras na cutícula é consequência de um aumento do percurso de difusão, ou tortuosidade, dos permeantes na membrana, não afectando, contudo, a selectividade desse mesmo percurso de difusão.

Relativamente à tortuosidade do percurso de difusão em poros polares existentes na cutícula, desconhece-se se a distribuição dos componentes ou grupos polares que lhes estão associados é aleatória ou se, pelo contrário, estas estruturas se encontram organizadas e concentradas em determinadas zonas da membrana. Também não foi ainda realizada nenhuma tentativa de realizar uma estimativa ou comparação relativa da sua extensão ou grau de tortuosidade entre cutículas de diferentes proveniências. Pressupõe-se que o mecanismo de permeação por poros polares não seja limitado pela presença das ceras cuticulares, dada a sua relação com a distribuição de grupos funcionais polares. Mas não há razão para excluir, à partida, que a presença das ceras na membrana possa influenciar a distribuição e dimensão destas estruturas, e portanto a sua acessibilidade a um dado permeante. Apesar desta questão, poucos foram os estudos que se debruçaram sobre o transporte transcuticular de solutos potencialmente transportados por difusão através de poros e desconhece-se se as ceras da cutícula desempenham também um papel importante na regulação deste tipo de transporte.

## 2.3 Objectivo do Trabalho

A compreensão do transporte transcuticular requer a realização de estudos sistemáticos de permeabilidade em função das características da membrana e do permeante. É necessário, também, separar as características do transporte através da matriz de cutina e das ceras cuticulares de modo a compreender as propriedades de barreira da cutícula em função destes seus componentes maioritários. Com o objectivo de contribuir para uma melhor caracterização do mecanismo de transporte transcuticular dependente de poros, bem como a sua aplicabilidade e limitações, iniciou-se um estudo de permeabilidade cuticular a uma série de iões e de pequenas moléculas polares, variando carga iónica, dimensões e hidrofobicidade do permeante. Como modelo para os estudos de transporte transcuticular, foi escolhida a cutícula

de tomate e a sua matriz de cutina, sendo esta última facilmente obtida após uma extracção total das ceras da cutícula com solventes orgânicos.

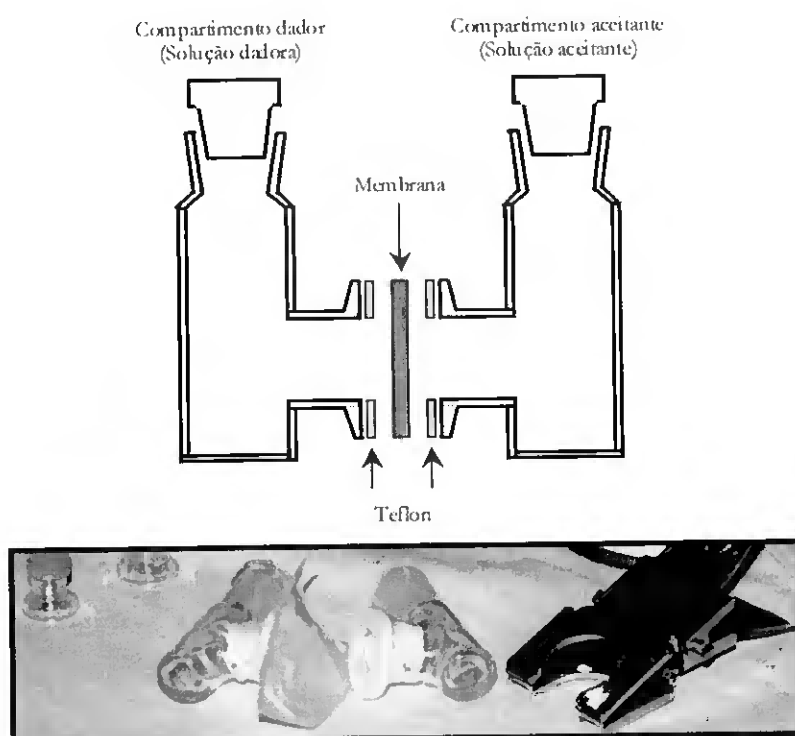
No presente trabalho, estudou-se a permeação de uma série de catiões do grupo dos metais alcalinos,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , e  $\text{K}^+$  e de uma série de aniões do grupo dos halogéneos,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , e  $\text{Br}^-$ . Estes iões foram escolhidos por apresentarem uma variação sistemática do raio cristalino e do raio hidrodinâmico dentro das respectivas séries, na tentativa de obter informação acerca das dimensões de eventuais poros cuticulares. Pretendeu-se estudar, ainda, a permeação do ião  $\text{NH}_4^+$  por este possuir dimensões muito semelhantes às de  $\text{K}^+$  em termos de raio cristalino (Marcus, 1991) ao passo que as suas características de ionização são bastante diferentes. Dado que se observa uma variação sistemática da energia livre de hidratação nestes iões (Marcus, 1991), poder-se-á avaliar se o seu transporte se fará em função das dimensões do ião no estado hidratado ou desidratado. Ainda, continuando por esclarecer como se fará a continuidade do percurso de difusão em poros polares na região mais externa da cutícula, onde se concentram as ceras cuticulares, pretende-se que a determinação da energia de activação necessária para o transporte de alguns dos iões estudados através da cutícula indique se a desidratação do ião é, ou não, um factor que condiciona a energia necessária ao processo.

Estudou-se, também, a permeação da cutícula a uma série de álcoois de baixo peso molecular, incluindo metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol. Estes álcoois foram escolhidos por se registar uma variação sistemática da sua dimensão molecular e solubilidade em meio hidrofóbico. Sendo todos estes álcoois bastante solúveis em solução aquosa e possuindo dimensões moleculares inferiores às estimadas para os poros cuticulares (raio de 0,45 nm), procurou-se investigar se os poros polares fornecem, ou não, um meio aquoso contínuo para a sua difusão ou se o seu transporte através da membrana é sobretudo influenciado pela sua solubilidade no meio apolar constituído pelas ceras cuticulares.

## 2.4 Métodos e Técnicas

### 2.4.1 Desenvolvimento de uma célula de permeação

Para efectuar medições de fluxo de vários permeantes através de membranas cuticulares, é necessário estabelecer um gradiente de concentração entre duas soluções aquosas separadas pela membrana a testar. Para o efeito, desenvolveu-se uma célula de permeação (Figura 2.4) de modo a permitir a colocação de uma membrana na interface de duas soluções aquosas.



**Figura 2.4.** Representação esquemática e imagem fotográfica da célula de permeação utilizada para medições de fluxo transmembranar.

A célula de permeação que foi desenvolvida foi constituída por dois recipientes de vidro com uma extensão lateral cilíndrica de comprimento de 1 cm. O diâmetro da abertura da extensão lateral foi de 1 cm, de modo a que a área de membrana exposta ao contacto com as soluções aquosas dadora e aceitante fosse uniformizada em cerca de 1 cm<sup>2</sup>. O conjunto de recipientes e membrana foi unido com uma garra de metal de mola, com uma ligeira pressão

de modo a garantir um contacto estanque. O vidro à superfície dos bordos das extensões laterais foi esmerilado e, antes da colocação da membrana na célula de permeação, foi coberto com 6 camadas de fita de Teflon de espessura de 0,05 mm (resultando numa cobertura com espessura total de 0,3 mm). Após a montagem da célula de permeação, a zona de junção das extensões laterais com a membrana foi coberta com a mesma fita de Teflon (4 camadas), rodeada de *Parafilm* (2 camadas) e, finalmente, coberta com pomada de silicone utilizada em sistemas de vácuo.

#### 2.4.2 Determinação de permeância e coeficiente aparente de difusão

A permeância,  $P$ , foi o parâmetro utilizado para comparar a permeabilidade de membranas relativamente a um determinado soluto. O valor de  $P$  é obtido por medição do fluxo  $J$  do soluto em questão na membrana estudada, considerando a relação entre  $P$  e  $J$  apresentada na Equação 2.2. Por sua vez, a determinação de  $J$  pode ser feita estabelecendo um gradiente de concentração entre duas soluções aquosas separadas pela membrana em estudo.

Uma vez que foram conservadas desidratadas, as membranas cuticulares utilizadas no decorrer deste estudo foram hidratadas com água destilada durante pelo menos 12 horas (durante a noite) antes de qualquer medição de fluxo transmembranar. A superfície morfológicamente interna das membranas cuticulares foi sempre colocada em contacto com a solução dadora de permeante. As experiências de permeação foram iniciadas colocando-se um volume bem determinado de solução aceitante no respectivo compartimento da célula de permeação. O outro compartimento recebeu a solução dadora de permeante num volume suficiente para equilibrar a pressão hidrostática entre os dois compartimentos. Em seguida, foi medido o aumento de concentração do permeante na solução aceitante em função do tempo, em condições de fluxo constante.

Em cutículas, tal como em membranas que verificam a Lei de Fick, o fluxo em estado estacionário só é atingido após um determinado período de tempo, denominado de *hold-up time* nalguma literatura sobre cutícula (Schönherr e Ziegler, 1980). Este corresponde ao período de tempo necessário para saturar a membrana com o soluto permeante após o qual se estabelece um fluxo constante de permeante, atingindo-se o estado estacionário.

O tempo necessário para a saturação da membrana, neste trabalho referido como tempo de retenção,  $t$  (s), está relacionado com o coeficiente de difusão do permeante na membrana,

$D$  ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ), e com a espessura da membrana,  $\Delta x$  (m) pela expressão (Crank e Park, 1968; Schönherr, 1982):

$$D = \frac{\Delta x^2}{6t} \quad (2.6)$$

O coeficiente de difusão que pode ser calculado a partir do tempo de saturação corresponde a uma média ponderada dos coeficientes de difusão do permeante nos diferentes meios que podem constituir o percurso para a sua difusão na membrana. Uma vez que as membranas cuticulares não são homogêneas e o ambiente em que o permeante difunde não é bem caracterizado, o coeficiente de difusão assim calculado será considerado como um coeficiente aparente de difusão,  $D_{ap}$ .

Em experiências iniciais de determinação do fluxo de protões através das membranas cuticulares, o período de tempo que antecedeu o estabelecimento de um estado estacionário foi tipicamente de algumas horas, variando ligeiramente entre membranas. Nas determinações de  $J$  em que se monitorizou continuamente a mesma solução aceitante, como no caso das medições de fluxo de protões ( $J_{H^+}$ ) foi fácil discriminar quais as medições realizadas em estado estacionário, com  $J$  constante. No entanto, no procedimento utilizado para a determinação de  $J$  para alguns solutos, nomeadamente de alguns cationes e dos álcoois, optou-se por proceder à substituição da solução aceitante após cada recolha de amostra para determinação da concentração de permeante, não sendo, neste caso, possível concluir imediatamente se as medições foram efectuadas em estado estacionário, ou não. Assim, e de modo a garantir que, também neste tipo de medições,  $J$  fosse obtido em condições de estado estacionário, foram tomadas algumas precauções. Em primeiro lugar, o período necessário para a saturação das membranas com  $H^+$ , foi tomado como referência e consideraram-se somente tempos de incubação 4 a 5 vezes superiores a este. Além disso, foram realizadas múltiplas medições para a mesma membrana, variando o tempo de incubação e substituindo tanto a solução dadora como a solução aceitante, mantendo assim a membrana sempre saturada com soluto. Procurou-se, ainda, que a concentração máxima de soluto na solução aceitante,  $C_{aq,a}$ , não excedesse 10% da concentração inicial de soluto na solução dadora,  $C_{aq,d}$ , sendo  $C_{aq,a}$  de 3 a 5% de  $C_{aq,d}$  na generalidade das experiências.

Nas condições acima referidas, foi considerado que  $C_{aq,d} \gg C_{aq,a}$  e calculou-se  $P$  a partir da expressão:

$$P = \frac{J}{C_{aq,d}} \quad (2.7)$$

Em todas as medições, os valores de  $J$  foram normalizados para uma superfície de membrana de  $1 \text{ m}^2$  após a medição da área da membrana exposta no final da experiência, corando a superfície interna da membrana exposta na célula de permeação com uma solução de fucsina básica 0,2% (p/v) e medindo a sua área com o auxílio de uma grelha milimétrica.

### 2.4.3 Potenciometria

O fluxo dos iões  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Br}^-$  através da cutícula foi determinado seguindo o aumento da concentração do ião na solução aceitante, contida na célula de permeação, em função do tempo, utilizando técnicas analíticas de potenciometria, com eléctrodos selectivos para cada ião

A potenciometria directa envolve a determinação do potencial de uma pilha electroquímica e a sua correlação com a concentração de uma determinada espécie química em solução e é uma técnica bastante utilizada para fins analíticos. Para o efeito, recorre-se a um eléctrodo indicador ou sensor químico, cujo potencial é sensível a variações de concentração da espécie química a quantificar, e a um eléctrodo com um potencial de referência. O potencial da meia-pilha<sup>4</sup> composta pelo eléctrodo indicador e solução analisar,  $E_{ind}$ , é proporcional ao logaritmo da concentração do ião ou composto a quantificar, de acordo com a Equação de Nernst. O potencial da meia-pilha de referência,  $E_{ref}$ , deve ser constante e independente da concentração da espécie química a analisar. O potencial total da pilha electroquímica,  $E$ , é dado pela diferença entre  $E_{ind}$  e  $E_{ref}$  e possui também o contributo do potencial de difusão,  $E_{dif}$ , desenvolvido na interface entre as várias soluções da célula em

---

<sup>4</sup> Designação utilizada de acordo com Chang (1994).

consequência da diferente mobilidade das espécies carregadas.  $E_{dif}$  é normalmente constante ou desprezável (Kellner *et al.*, 1998).

Existem vários tipos de eléctrodos de referência. Neste trabalho, optou-se por utilizar um eléctrodo de prata/cloreto de prata por ser fácil de preparar e ter um potencial bastante estável e reprodutível. Este eléctrodo foi preparado promovendo a deposição do sal AgCl num fio de prata, o que pode ser feito ligando o fio de prata ao ânodo de uma bateria (9 V) mergulhando-o numa solução 0,1 M em ião  $Cl^-$  (Kellner *et al.*, 1998). O fio de prata coberto com AgCl é mantido mergulhado numa solução de KCl de concentração constante (normalmente uma solução saturada) que comunica com a solução a analisar por intermédio de uma junção de porcelana porosa. O potencial deste eléctrodo é bastante afectado por constituintes da solução que alterem a concentração do ião  $Ag^+$  em solução. Por essa razão, para medições em soluções que contenham iões que possam formar precipitados ou compostos que possam formar complexos com o ião  $Ag^+$ , deve recorrer-se a uma ponte salina adicional. Na Figura 2.5-A encontra-se representado esquematicamente o eléctrodo de Ag/AgCl de dupla junção utilizado no decorrer das medições potenciométricas realizadas neste trabalho.

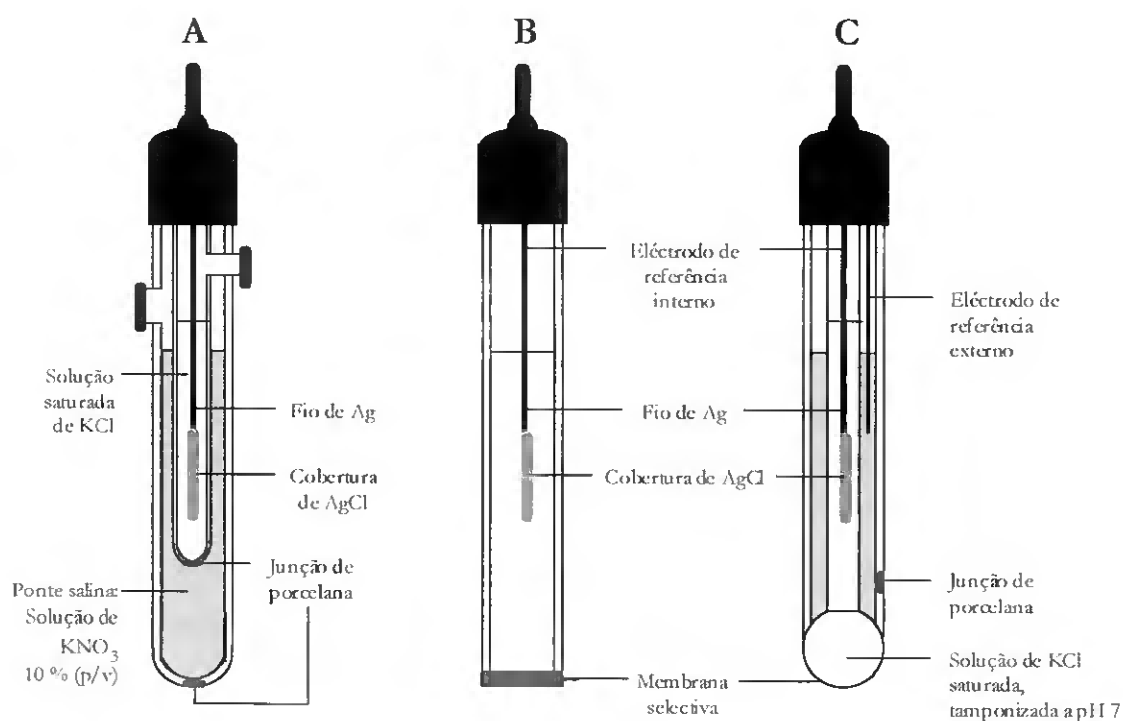
A utilização de eléctrodos selectivos do tipo ISE<sup>5</sup> permite a determinação de concentrações de iões e outras espécies químicas de modo altamente específico. Estes eléctrodos são constituídos por uma membrana selectiva, uma solução interna e um eléctrodo de referência interno, geralmente do tipo metal/sal reversível do metal, como é o caso de um eléctrodo de Ag/AgCl mergulhado numa solução saturada de KCl (Figura 2.5-B). Devido à especificidade da membrana selectiva, estes eléctrodos permitem a quantificação de um determinado ião em solução aquosa mesmo na presença de outros iões. Outra vantagem da utilização de eléctrodos ISE é a de que a determinação da concentração do ião a quantificar não envolve a sua redução ou oxidação e por isso não se altera a composição da solução analisada.

Para a utilização de eléctrodos selectivos ISE no decorrer deste trabalho, foi necessário completar a pilha electroquímica com um eléctrodo de referência externo em contacto com o eléctrodo selectivo através de uma ponte salina. No caso de eléctrodos de referência externos

---

<sup>5</sup> Do Inglês: *Ion Selective Electrode*.

de dupla junção, como o representado na Figura 2.5-A, essa ponte salina é feita pela solução contida no compartimento mais externo, a qual comunica com a solução a analisar e com a solução onde está mergulhado o eléctrodo de referência por intermédio de junções de porcelana porosa. A diferença de potencial medida entre o eléctrodo de referência interno do eléctrodo ISE e o eléctrodo de referência externo é composta por vários potenciais, nomeadamente, no potencial da célula de referência,  $E_{ref}$ , no potencial de difusão,  $E_{dif}$  e no potencial da membrana de interface,  $E_{memb}$ , sendo este último o único que é dependente da concentração do ião a quantificar. O potencial de membrana é gerado em função do equilíbrio de concentração de ião livre na solução a analisar e ião ligado à membrana do eléctrodo.



**Figura 2.5.** Representação esquemática dos eléctrodos utilizados na determinação da concentração de iões em solução por potenciometria: A) Eléctrodo de referência de Ag/AgCl de dupla junção; B) Eléctrodo de membrana selectiva, utilizado na quantificação de  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$  e  $NH_4^+$  em combinação com o eléctrodo de referência de Ag/AgCl; C) Eléctrodo combinado de pH (adaptada de Kellner *et al.*, 1998).

Em eléctrodos selectivos de membrana cristalina, como os utilizados para a quantificação de  $F^-$ ,  $Cl^-$  ou  $Br^-$  neste trabalho, o elemento sensível consiste numa membrana sólida composta por um sal pouco solúvel em água e com condutibilidade iónica específica

para o ião a quantificar. Estas membranas não são inertes e podem-se alterar em função da composição da solução onde são mergulhadas, consoante o produto de solubilidade do sal. O limite de concentrações detectáveis com estes eléctrodos situa-se entre  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  M.

Em eléctrodos selectivos de membrana líquida, como o que foi utilizado neste trabalho para a quantificação de  $\text{NH}_4^+$ , a interface selectiva é uma membrana polimérica, usualmente uma matriz de cloreto de polivinil, na qual se encontra incorporado um trocador iónico ou um composto ionóforo específico que facilite o transporte do ião a quantificar. O tipo de facilitador incorporado na membrana depende do ião que se pretende detectar, podendo utilizar-se com esta finalidade trocadores iónicos, antibióticos ou éteres policíclicos (denominados éteres-coroa<sup>6</sup>).

Para a medição de pH no decorrer deste trabalho utilizou-se um eléctrodo de membrana de vidro. Nos eléctrodos comerciais, o eléctrodo de referência externo já se encontra incorporado na unidade de medição de pH, conforme esquematizado na Figura 2.5-C. A meia-pilha electroquímica sensível à concentração de  $\text{H}^+$  é constituída por uma membrana de vidro em contacto com uma solução tamponizada e de concentração constante de ião cloreto no lado interno, na qual se encontra mergulhado um eléctrodo de Ag/AgCl. A elevada afinidade da matriz de sílica ( $\text{SiOH}/\text{SiO}^-$ ) pelos iões  $\text{H}^+$  origina um potencial de membrana devido à adsorção de  $\text{H}^+$  no seu lado externo. Quando se altera o pH junto da superfície externa da membrana de vidro, altera-se o potencial de membrana do eléctrodo e, em consequência, a diferença de potencial entre os eléctrodos de referência interno e externo combinados no eléctrodo de pH. O contacto do eléctrodo de referência com a solução de pH desconhecido é assegurado por uma junção de porcelana porosa.

A resposta experimental dos eléctrodos selectivos de iões, incluindo a do eléctrodo de pH, pode ser diferente da prevista pela Equação de Nernst. A constante de proporcionalidade que representa a variação do potencial medido em função da concentração de espécie a quantificar tem de ser determinada experimentalmente construindo um gráfico de calibração para a equação:

$$E = E' \pm c \ln C_{\text{ião}} \quad (2.8)$$

---

<sup>6</sup> Em Inglês: *crown-ethers*.

onde,  $E$ , representa o potencial de pilha electroquímica,  $C_{ião}$ , a concentração do ião a quantificar,  $\epsilon$ , a constante experimental, e  $E'$ , o potencial de uma solução em que  $\ln C_{ião} = 0$ . A constante  $\epsilon$  só é efectivamente constante num intervalo limitado de concentrações que deve ser confirmado experimentalmente. A quantificação de uma determinada espécie química em solução é, então, efectuada por comparação da diferença de potencial medida na solução a analisar e em soluções padrão.

#### 2.4.4 Espectrofotometria de absorção atómica

A espectrofotometria de absorção atómica é uma técnica muito utilizada em análise elemental e é largamente aplicada na quantificação de vários iões em solução aquosa. Esta técnica fundamenta-se na absorção de radiação por parte de átomos livres durante a sua transição do estado fundamental para um estado electrónico excitado.

De acordo com a distribuição de Boltzmann, a população de átomos num determinado estado excitado decresce exponencialmente com a energia do estado. Atendendo à energia envolvida nas transições do estado fundamental para um estado atómico excitado (correspondente à absorção de luz de comprimentos de onda entre 100 e 1000 nm), e considerando o valor da constante de Boltzmann, pode considerar-se que a uma temperatura inferior a 5000 K, como a utilizada para a vaporização das amostras a analisar por absorção atómica, a maior parte dos átomos se encontra no estado de energia fundamental. Assim, seleccionando a radiação incidente na amostra de modo a que esta corresponda à energia da transição do estado fundamental para um dos estados excitados de um dado elemento, pode determinar-se a quantidade desse elemento presente na amostra quantificando a radiação absorvida. A possibilidade de ocorrência de interferências devido à coincidência de absorção da mesma radiação por vários elementos presentes na mesma amostra é bastante reduzida. Além disso, o espectro de emissão e absorção dos vários elementos é bem conhecido, pelo que é sempre possível escolher uma linha espectral de absorção para a detecção de um determinado elemento que reduza a possibilidade de interferência com outros elementos que possam estar presentes na solução a analisar.

Um espectrofotómetro de absorção atómica é composto, fundamentalmente, por uma fonte de radiação primária, um sistema de introdução e dispersão da amostra no percurso

óptico, um sistema óptico para dispersão de radiação, um detector e respectivo processamento electrónico de sinal.

A fonte de radiação mais utilizada neste tipo de espectrofotometria são lâmpadas catódicas<sup>7</sup>. Lâmpadas deste tipo possuem um ânodo de tungsténio e um cátodo em forma de cilindro oco composto pelo metal cujo espectro de emissão se pretende utilizar, ambos selados num tubo de vidro cheio com néon ou argon a uma pressão entre 1 e 5 Torr (Skoog *et al.*, 1998). Quando um potencial na ordem de 300 V é aplicado entre os eléctrodos, ocorre a ionização do gás inerte e é produzida uma corrente em consequência da migração de iões e electrões para os eléctrodos. Alguns átomos do metal depositado no cátodo são desalojados no processo, dispersando-se no interior da lâmpada. Uma vez que alguns destes átomos se encontram no estado excitado, emitem radiação característica à medida que voltam ao estado de energia fundamental. Os átomos dispersos são, eventualmente, novamente depositados na superfície do cátodo, o que é facilitado pela sua forma cilíndrica.

A dispersão e atomização da amostra a analisar é feita por intermédio de um atomizador de chama onde se produz uma chama laminar (5 a 10 cm) de modo a aumentar o percurso óptico. A chama é alimentada por um combustível e um oxidante, normalmente misturados em partes iguais (Skoog *et al.*, 1998). O fluxo de oxidante é também utilizado para produzir um aerossol da amostra a analisar que, ao ser queimado, produz uma dispersão de átomos livres. Este sistema de amostragem tem a desvantagem de desperdiçar uma grande quantidade de amostra na formação do aerossol e também de o tempo de permanência de átomos livres no percurso óptico ser bastante curto. Outro inconveniente deste processo de dispersão da amostra é o de levar à dispersão de luz devido à eventual presença de partículas líquidas ou sólidas no percurso óptico.

Os limites de detecção em espectrofotometria de absorção atómica variam de elemento para elemento e dependem também da eficiência de absorção da radiação escolhida, podendo esta técnica ser utilizada na determinação de concentrações na ordem de  $1-20 \times 10^{-3}$  ppm (Skoog *et al.*, 1998). Como enunciado pela lei de Beer-Lambert, a absorvância de radiação de um determinado comprimento de onda aumenta linearmente com a concentração da espécie que a absorve. No entanto, no caso da absorção atómica é vulgar encontrarem-se desvios à linearidade na relação entre estes dois parâmetros pelo que se deve determinar

---

<sup>7</sup> Em Inglês: *hollow cathode lamps*.

experimentalmente para cada tipo de amostra qual a gama de concentrações onde esta relação se verifica.

### 2.4.5 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa, ou cromatografia de gás-líquido, foi a técnica utilizada neste trabalho para a quantificação dos álcoois utilizados como permeantes nos estudos de transporte transcuticular efectuados. Esta é uma técnica muito utilizada na separação e quantificação de compostos orgânicos e toma partido da diferente partição dos vários compostos a separar entre uma fase estacionária líquida e uma fase móvel gasosa. A fase estacionária pode ser adaptada consoante o tipo de compostos a separar, seguindo o princípio de que compostos com características semelhantes têm maior afinidade entre si. Assim, para a separação de compostos polares, como álcoois, ácidos orgânicos ou ésteres, é aconselhável utilizar fases estacionárias que contenham grupos  $-CN$ ,  $-C=O$ , ou  $-OH$ , enquanto que para a separação de hidrocarbonetos saturados, por exemplo, são vulgarmente utilizadas fases estacionárias de hidrocarbonetos ou de siloxanos. A escolha da fase móvel para a cromatografia depende do tipo de detector utilizado, sendo vulgarmente utilizado hidrogénio ou gases inertes como hélio, árgon ou azoto.

A fase estacionária é colocada em colunas de enchimento ou em colunas capilares. A distinção entre estes tipos de colunas prende-se fundamentalmente com o seu comprimento e diâmetro: enquanto que as colunas de empacotamento possuem um diâmetro interno entre 3 e 8 mm e comprimento entre 1 e 3 m, as colunas capilares têm um diâmetro interno bastante mais reduzido, de 0,15 a 1 mm, e podem ter até 100 m de comprimento. As colunas capilares permitem uma melhor separação em função do aumento de tamanho da coluna, redução de pressão de fase móvel necessária para a eluição da amostra e do maior volume da fase móvel relativamente ao da fase fixa e são, por isso, mais utilizadas. As vantagens da utilização de colunas de enchimento prendem-se com a possibilidade de analisar amostras de elevado volume e com a flexibilidade de alterar o enchimento da coluna.

Um aparelho de cromatografia gasosa é constituído por uma unidade injetora, uma unidade termoestabilizadora da coluna de separação e uma unidade de detecção dos compostos eluidos e de registo do cromatograma. O injetor controla a introdução e volatilização da amostra a analisar e também a velocidade de eluição e pressão do gás de

arrasto. O detector deve ser escolhido consoante o tipo de compostos que se pretende detectar no eluente e os mais utilizados são o detector de condutibilidade térmica, o de captura de electrões e o de ionização de chama, sendo este último o tipo de detector utilizado nas análises efectuadas no âmbito deste trabalho.

O funcionamento de um detector de condutibilidade térmica baseia-se na redução da condutibilidade do gás de arrasto na presença de outras substâncias, o qual deve ser hélio ou hidrogénio para que a variação de condutibilidade seja suficiente para assegurar uma variação significativa de condutibilidade térmica e, logo, uma boa sensibilidade na análise. Pode ser utilizado para detectar qualquer tipo de compostos, tanto orgânicos como inorgânicos. O detector de captura de electrões é de grande utilidade quando se pretende detectar a presença de compostos com grupos funcionais electronegativos como halogenetos, peróxidos ou nitratos. No entanto, este detector é insensível a hidrocarbonetos, aminas ou álcoois, o que limita bastante a sua utilização. O seu funcionamento baseia-se na diminuição da corrente residual produzida pelos iões e electrões gerados pela colisão de partículas  $\beta$  com átomos do gás de arrasto na presença de compostos que podem capturar electrões.

O detector mais utilizado na cromatografia gasosa é o denominado detector de ionização de chama, vulgarizado devido à sua vasta aplicação na detecção de compostos orgânicos e à sua elevada sensibilidade, até  $10^{-13}$  g s<sup>-1</sup> (Kellner *et al.*, 1998). O princípio na base do funcionamento deste detector é a produção de radicais CHO<sup>+</sup> e electrões em resultado da oxidação de compostos que contêm ligações C–C e C–H, acompanhado pela alteração da condutibilidade eléctrica de uma chama de hidrogénio sob acção de um campo eléctrico quando os compostos orgânicos que emergem da coluna são incinerados. O fluxo de iões resultantes da oxidação dos compostos orgânicos é registado como uma diminuição na diferença de potencial estabelecida entre os dois eléctrodos posicionados junto à chama.

O tempo de retenção de um composto numa coluna de cromatografia gasosa é característico e está directamente relacionado com o seu coeficiente de partição entre a fase móvel e a fase estacionária. Além disso, é determinado por um conjunto de características experimentais que incluem a pressão de gás de arrasto e sua estabilidade ao longo da eluição da coluna, bem como o comprimento da coluna de separação. A eficiência de separação numa cromatografia gasosa é determinada pela volatilidade relativa dos constituintes da amostra, isto é, pelas diferenças na pressão de vapor dos vários constituintes e sua afinidade para com a fase estacionária a uma determinada temperatura. A correcta identificação de compostos com base

no seu tempo de retenção na coluna depende da comparação com o tempo de retenção de padrões analisados nas mesmas condições experimentais. A informação obtida num cromatograma também pode ser quantitativa, relacionando a área dos picos de fluxo de massa que emerge da coluna, e que são registados pelo detector, com a respectiva quantidade de componente que lhes dá origem, recorrendo a gráficos de calibração.

## 2.5 Execução Experimental

### 2.5.1 Isolamento de membranas cuticulares

O isolamento de cutículas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) foi realizado segundo o método de Schönherr (1976a), que determina a incubação das membranas numa solução enzimática com capacidade de degradação de pectina e de celulose. Os frutos, bem desenvolvidos, numa fase de maturação inicial (fase *mature green* ou *breaker*), de acordo com a classificação de Gillaspay *et al.*, (1993), com cerca de 6 a 8 cm de diâmetro e sem imperfeições visíveis à superfície, foram adquiridos regularmente no mesmo estabelecimento comercial.

Para o isolamento de cutículas (C), cortaram-se pedaços da zona equatorial dos frutos, sem pigmentação vermelha, com cerca de 2 cm × 2 cm de área e com uma espessura de cerca de 2 mm. A cutícula foi separada da camada de células da epiderme por incubação destes pedaços numa solução tamponizada a pH 4,0 com acetato de sódio 0,1 M contendo 4,0% (p/v) de pectinase (*Sigma-Aldrich* Ref. P-4716), 0,4% (p/v) de celulase (*Sigma-Aldrich* Ref. C-1184) e 0,02% (p/v) de NaN<sub>3</sub>, a uma temperatura de 30 °C, durante três dias consecutivos. Após o período de incubação na solução enzimática, as cutículas foram suspensas em água destilada e manualmente separadas dos restos celulares, tendo cuidado para não danificar mecanicamente as membranas, as quais se apresentavam bastante frágeis. Após uma lavagem extensiva com água destilada, de modo que o pH da suspensão igualasse o da água destilada, as cutículas foram deixadas a secar à temperatura ambiente e foram armazenadas num local seco por um período que se estendeu por vários meses. Com este método de isolamento, obtiveram-se membranas translúcidas de cor beije, geralmente isentas de cortes ou fissuras (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Cutículas de tomate isoladas pelo método de digestão enzimática com pectinase e celulase. Após o seu isolamento, as cutículas foram armazenadas num local seco e ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Membranas correspondentes à matriz da cutícula de tomate, designadas de matriz cuticular (MC), foram obtidas a partir das cutículas isoladas por digestão enzimática, como descrito anteriormente, com a remoção total das ceras da cutícula recorrendo a uma extracção em manga de Soxhlet, utilizando clorofórmio: metanol (1:1, v/v) como solvente (grau analítico), durante um período de 24 h.

### 2.5.2 Verificação da integridade membranar

A integridade das membranas C e MC foi primeiro verificada visualmente, observando-se a membrana contra um fundo luminoso. Só as membranas que não apresentavam cicatrizes ou cortes visíveis é que foram utilizadas. Como controlo adicional da integridade membranar, foi medida a permeância das membranas a  $H^+$ ,  $P_{H^+}$ , à temperatura de 25 °C, antes de se efectuarem quaisquer outras medições.

O valor médio de  $P_{H^+}$  obtido para uma amostra aleatória de membranas C ( $n=15$ ) e MC ( $n=15$ ) foi considerado como referência para o respectivo tipo de membrana (Secção 2.6.5) e foi utilizado como critério para a utilização de membranas em experiências subsequentes. As membranas cujo valor de  $P_{H^+}$  não se incluisse no intervalo definido pelo desvio padrão encontrado para a respectiva população (Tabela 2.2) foram rejeitadas.

### 2.5.3 Medição de fluxo de iões

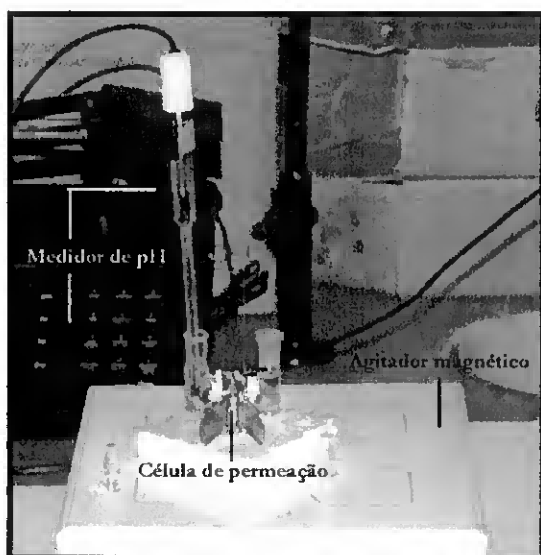
O fluxo de  $H^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  através de C e MC foi medido em células de permeação com capacidade total de 3 ml, enquanto que o fluxo de  $NH_4^+$  e de aniões como  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$  foi medido em células de permeação com capacidade total de 15 ml, mantendo-se em todos os casos uma área de membrana exposta à solução de cerca de  $1\text{ cm}^2$ .

A superfície morfológicamente interna das membranas estudadas foi a colocada em contacto com a solução dadora de permeante. Para início das medições, foi colocado no compartimento aceitante da célula de permeação o volume requerido da respectiva solução, o qual foi de 3 ml no caso das determinações do fluxo de  $H^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  e de 15 ml nas determinações do fluxo de  $NH_4^+$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$ . No compartimento dador foi adicionado o volume de solução dadora necessário para equilibrar a pressão hidrostática nos dois compartimentos, sendo este aproximadamente igual ao volume de solução aceitante já colocado no outro compartimento. Ambas as soluções foram agitadas continuamente com o auxílio de um agitador magnético. Para medições de fluxo iónico em função da temperatura, as células de permeação foram colocadas no interior de um banho de água termostaticado de modo a manter a temperatura requerida ( $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ ).

As medições de fluxo de  $H^+$  foram realizadas utilizando uma solução de 0,1 M de HCl como solução dadora (excepto quando se especifique outra concentração), e água destilada (pH 5,5) como solução aceitante. O aumento da concentração de  $H^+$  na solução aceitante foi seguido ao longo do tempo utilizando um microeléctrodo de pH, com uma precisão de  $\pm 0,01$  unidades (*Orion Research Inc.*, Beverly, MA, USA). A montagem experimental que foi utilizada neste tipo de medições é ilustrada na Figura 2.7.

O fluxo de  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$  foi medido usando uma solução do respectivo sal de lítio como solução dadora. A concentração inicial de  $F^-$  na solução dadora foi de 0,01 M enquanto que a de  $Cl^-$  e  $Br^-$  foi de 0,1 M. Utilizou-se água destilada como solução aceitante. A concentração de  $F^-$ ,  $Cl^-$  ou de  $Br^-$  na solução aceitante foi medida ao longo do tempo com o auxílio de eléctrodos selectivos (*Orion Research Inc.*) combinados com um eléctrodo de referência de Ag/AgCl. Para a medição do fluxo de  $NH_4^+$  utilizou-se como solução dadora uma solução de  $NH_4Cl$  0,1 M tamponizada a pH 4,7 com acetato de magnésio 0,025 M e ácido acético 0,05 M. A solução aceitante consistiu na solução tampão referida, sem a adição de  $NH_4^+$ . A variação da

concentração de  $\text{NH}_4^+$  na solução aceitante foi determinada em função do tempo utilizando um eléctrodo selectivo de  $\text{NH}_4^+$  (*Orion Research Inc.*) combinado com um eléctrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ . Para todas as quantificações obtiveram-se gráficos de calibração para uma gama de concentrações compreendidas entre  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  M. Realizaram-se cinco medições sucessivas de concentração iónica em função do tempo e o valor de  $J$  foi retirado do declive da equação obtida por regressão linear desses valores ( $r^2 > 0,90$ ).



**Figura 2.7.** Equipamento e montagem experimental utilizada para a medição de  $J_{\text{H}^+}$  numa membrana cuticular. Na imagem, pode observar-se a célula de permeação utilizada nas medições bem como a placa de agitação magnética necessária para a homogeneização das soluções contidas nos compartimentos da célula de permeação e o eléctrodo combinado de pH utilizado para a quantificação de  $\text{H}^+$  em solução.

Para a medição do fluxo de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , utilizou-se como solução dadora uma solução do sal de fluoreto do respectivo catião e água destilada como solução aceitante. A concentração inicial de  $\text{Li}^+$  na solução dadora foi de 0,01 M, enquanto que a de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{K}^+$  foi de 0,1 M. O fluxo de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foi medido como o incremento da concentração do ião na solução aceitante num determinado período de tempo. Após o tempo estipulado, a solução aceitante foi recolhida para análise e substituída por água destilada à temperatura da análise, recomeçando-se uma nova medição de fluxo. A cada temperatura testada foram realizadas três medições consecutivas das quais se obteve um valor médio para  $J$ .

O aumento de concentração do catião,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ , na solução aceitante foi determinada por espectrofotometria de absorção atómica utilizando um aparelho *Perkin-Elmer* 2380 (Shelton, CT, USA) equipado com uma lâmpada catódica específica para o elemento a determinar. A alimentação da chama de atomização foi assegurada com uma mistura de ar e

acetileno em igual proporção. A banda de emissão da lâmpada seleccionada para as determinações de  $\text{Li}^+$  foi a de 670,8 nm, a de  $\text{Na}^+$ , 588,5 nm, e a de  $\text{K}^+$ , 767,6 nm.

#### 2.5.4 Medição de fluxo de álcoois

O fluxo dos álcoois metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol foi determinado utilizando uma solução dadora contendo uma mistura de todos os álcoois em simultâneo, com cada álcool presente numa concentração de 0,1 M, e água destilada como solução aceitante. Os ensaios foram realizados em células de permeação com capacidade de 3 ml. No compartimento aceitante da célula de permeação colocaram-se 3 ml de água destilada como solução aceitante, enquanto que no compartimento dador foi colocado o volume de solução dadora necessário para equilibrar a pressão hidrostática nos dois compartimentos, o qual foi aproximadamente igual ao volume de solução aceitante já colocado no outro compartimento. As células de permeação foram colocadas no interior de um banho de água termostaticado de modo a manter a temperatura requerida ( $\pm 0,1$  °C).

O fluxo de cada álcool foi medido como o incremento da sua concentração na solução aceitante num determinado período de tempo. Após esse período, a solução aceitante foi recolhida para análise e substituída por água destilada à temperatura requerida, recomeçando-se uma nova medição de fluxo. A concentração de cada álcool na solução aceitante foi determinada por cromatografia gasosa num cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890A (Wilmington, DE, USA) equipado com um detector de ionização de chama e utilizando uma coluna *Hewlett-Packard* HP-5 com enchimento de (5%)-difenil-(95%)-dimetilpolisiloxano (30,0 m  $\times$  320  $\mu\text{m}$ ). Para a análise da solução aceitante, injectou-se 1  $\mu\text{l}$  da solução recolhida recorrendo a um injector do tipo *split/splitless*<sup>8</sup>, com uma razão de *split* de 20:1. A temperatura de injector e detector foi de 300 °C. A separação dos álcoois foi realizada à temperatura de 30 °C utilizando  $\text{N}_2$  como gás de arrasto, estabelecendo um fluxo de 1,5  $\text{ml min}^{-1}$  através da coluna. A concentração de cada álcool foi determinada a partir da integração da área dos picos do cromatograma recorrendo a curvas de calibração de correlação entre sinal e concentração obtida para cada álcool analisando uma mistura qualitativamente semelhante à solução dadora.

---

<sup>8</sup> Designação vulgar em Inglês para um tipo de injector que permite optar entre aplicar na coluna o total de amostra injectada ou uma fracção, regulável, da mesma.

Para cada amostra, realizaram-se três medições de  $J$  consecutivas, sendo o valor final de  $J$  para cada álcool obtido da média dessas medições.

### 2.5.5 Calorimetria diferencial de varrimento

Os termogramas de calorimetria diferencial de varrimento foram obtidos conforme descrito no Capítulo 3 (Secção 3.3.1). As ceras cuticulares de tomate foram extraídas de cutículas recorrendo a uma extracção em manga de Soxhlet com uma mistura de clorofórmio e metanol (1:1, v/v) como solvente, conforme descrito (Secção 2.5.1). Uma alíquota do extracto de ceras dissolvido em clorofórmio (grau analítico) foi colocado no interior de um cadinho de alumínio, deixando-se evaporar o solvente até que a massa de amostra fosse constante ( $\pm 0,01$  mg, balança *Mettler*). A massa de amostra analisada não excedeu 7 mg.

## 2.6 Resultados

### 2.6.1 Isolamento de membranas cuticulares

O método enzimático de isolamento de cutículas foi primeiro utilizado por Schönherr (1976a) e consiste na utilização de enzimas pectinases e celulasas para a decomposição das ramificações de polissacarídeos como pectina e celulose, os quais fazem a ligação entre a matriz polimérica da cutícula e a parede celular das células da epiderme. Este método foi adaptado ao isolamento de cutículas de tomate (C) e utilizado no decorrer deste trabalho para a obtenção sistemática das membranas estudadas.

Como norma, observaram-se cutículas parcialmente destacadas das células da epiderme a partir do segundo dia de incubação na solução de digestão enzimática. No entanto, optou-se por estender o período de incubação por mais um dia, para um total de três dias, de modo a garantir que o destacamento da camada de células da epiderme do fruto fosse completa e não efectuada mecanicamente durante a posterior lavagem das membranas. A limpeza dos resíduos celulares que ficavam em contacto com a cutícula foi realizada por fricção suave da sua superfície interna, feita manualmente. As cutículas assim isoladas tinham um aspecto translúcido e eram bastante sensíveis à tracção mecânica. Depois de lavadas extensivamente

com água destilada, foram secas à temperatura ambiente e armazenadas num local seco e ao abrigo da luz. As membranas secas mostraram-se mais resistentes à tracção mecânica do que as cutículas hidratadas.

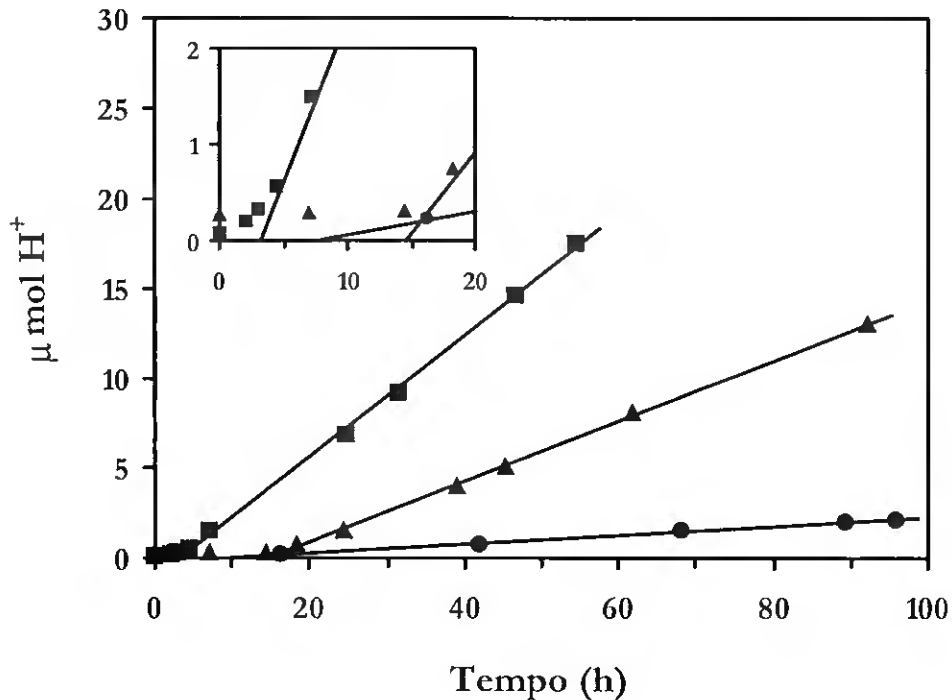
Para a obtenção de matrizes cuticulares (MC), foi necessário remover as ceras da cutícula de tomate, efectuando-se uma extracção em manga de Soxhlet utilizando uma mistura de clorofórmio e metanol (1:1, v/v) como solvente. A extracção total das ceras cuticulares foi completa após um período de extracção de 24 h, conforme determinado por gravimetria. O extracto total de ceras variou entre 3 a 5% do peso seco total da cutícula, um valor idêntico ao apresentado na literatura para estas cutículas (Baker *et al.*, 1982; Schreiber e Riederer, 1996b).

## 2.6.2 Teste de uma célula de permeação

A célula de permeação desenvolvida para a medição de fluxo transmembranar (Secção 2.4.1) foi inicialmente testada comparando a permeabilidade a  $H^+$  das membranas cuticulares com a de uma membrana de Teflon de 0,2 mm de espessura. Esta última foi escolhida como controlo por ser uma membrana polimérica de natureza apolar, com comportamento de membrana de dissolução de reduzida permeabilidade (Yasuda e Stannett, 1962). As determinações de  $J_{H^+}$  (fluxo de  $H^+$ ) na cutícula (C) e na matriz cuticular (MC) foram feitas recorrendo à célula de permeação, estabelecendo-se um gradiente de concentração de  $H^+$  entre duas soluções separadas pela membrana em estudo, a solução dadora de permeante e a solução aceitante, após o que se registou o aumento de pH na solução aceitante em função do tempo, com o auxílio de um eléctrodo selectivo de pH. O resultado de medições de  $J_{H^+}$  num exemplar de cada uma das referidas membranas, à temperatura ambiente (25 °C), é ilustrado na Figura 2.8.

Em destaque na Figura 2.8 pode observar-se uma zona do gráfico em que se regista um aumento progressivo de  $J_{H^+}$  antes de se atingir o estado estacionário. Este comportamento é característico de membranas poliméricas de dissolução (Crank e Park, 1968). O tempo de saturação,  $t$ , das membranas C-1, MC-1 e Teflon analisadas na referida figura foi determinado por extrapolação da linha de tendência para o fluxo de  $H^+$  para o tempo de início do estado estacionário, a partir da intercepção das linhas do gráfico com o eixo das abcissas. Os valores obtidos foram, para C-1,  $t = 14,6$  h, para MC-1,  $t = 3,3$  h e para a membrana de Teflon,  $t = 7,4$  h.

Considerando que a cutícula de tomate tem uma espessura média da ordem de  $9 \mu\text{m}$  (Jeffree, 1996) e conhecendo a espessura da membrana de Teflon ( $0,2 \text{ mm}$ ), foi possível calcular, para cada membrana, o coeficiente aparente de difusão,  $D_{\text{ap}}$ , para  $\text{H}^+$  (Equação 2.6). O valor de  $D_{\text{ap}}$  na membrana de Teflon foi de  $2,5 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , bastante superior ao que foi medido em C-1, de  $2,6 \times 10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , ou em MC-1, de  $3,3 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .  $D_{\text{ap}}$  para  $\text{H}^+$  em MC-1 foi cerca de 10 vezes superior ao determinado em C-1. Como termo de comparação, pode referir-se que os valores compilados da literatura para  $D_{\text{ap}}$  para água em membranas cuticulares de várias folhas e de frutos se incluem entre  $10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , sendo cerca de  $5 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para a difusão de água numa cutícula de tomate (Becker *et al.*, 1986).



**Figura 2.8.** Determinação do fluxo de  $\text{H}^+$  em várias membranas: Teflon (●); cutícula C-1 (▲); matriz cuticular MC-1 (■). Destaca-se a região do gráfico correspondente ao fluxo iónico medido inicialmente, antes de se atingir o estado estacionário.

O fluxo de iões  $\text{H}^+$ ,  $J_{\text{H}^+}$ , em C-1, MC-1 e na membrana de Teflon é obtido do declive das linhas do gráficos da Figura 2.8 e permite calcular  $P_{\text{H}^+}$  para cada membrana, recorrendo à relação da Equação 2.7 (Secção 2.4.2). A membrana de Teflon foi a menos permeável das membranas, sendo  $P_{\text{H}^+}(\text{Teflon})$  de  $0,7 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ , enquanto que  $P_{\text{H}^+}(\text{C-1})$  foi de  $4,9 \times 10^{-9} \text{ m}$

$s^{-1}$  e  $P_{H^+}$ (MC-1) foi de  $9,6 \times 10^{-9} m s^{-1}$ . Como referência, acrescenta-se que medições de permeabilidade efectiva<sup>9</sup> de HCl e de HNO<sub>3</sub> em cutículas de folhas de *Citrus limon* L. revelaram valores de  $P_{H^+}$  da ordem de  $10^{-8} m s^{-1}$ , enquanto que em *Pyrus communis* L. foram da ordem de  $10^{-7} m s^{-1}$  (Hauser *et al.*, 1993). A permeância a água medida em várias membranas cuticulares, incluindo a cutícula de tomate, situa-se em valores da ordem de  $10^{-9} m s^{-1}$ , como pode constatar-se pelos valores compilados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Permeância,  $P$ , de cutículas isoladas de várias espécies e órgãos de plantas relativamente a água (adaptada de Schönherr, 1982).

Espécie	Órgão	M <sup>a</sup>	$P$ ( $\times 10^{-9} m s^{-1}$ )	CV <sup>b</sup>	$\Delta x$ ( $\mu m$ ) <sup>c</sup>	$n^d$
<i>Citrus aurantium</i>	folha	$P_d$	1,08	72	2,5	69
<i>Pyrus communis</i>	folha	$P_{tr}$	0,49	22	2,0	10
<i>Hedera helix</i>	folha	$P_{tr}$	0,10	35	1,5	10
<i>Clivia miniata</i>	folha	$P_{tr}$	0,10	23	6,0	10
<i>Allium cepa</i>	bolbo	$P_d$	0,43	43	0,8	30
<i>Lycopersicon esculentum</i>	fruto	$P_{tr}$	1,89	40	4,0	10
<i>Solanum melongena</i>	fruto	$P_d$	2,30	31	2,0	6

<sup>a</sup>Método de medição de permeância:  $P_d$ , medições de transporte de água tritiada (<sup>3</sup>HOH) num sistema água/membrana/água, na ausência de um gradiente de potencial hídrico através da membrana;  $P_{tr}$ , medições efectuadas utilizando um método gravimétrico num sistema água/membrana/vapor de água, no qual se mediram taxas de transpiração cuticular; <sup>b</sup>Coefficiente de variabilidade dos resultados; <sup>c</sup>Espessura da membrana; <sup>d</sup>Número de membranas testadas.

Comparando os valores de  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  determinados utilizando a célula de permeação desenvolvida e alguns valores de permeância cuticular citados da literatura, observam-se valores dentro da mesma ordem de grandeza. Apesar de os valores citados serem relativos ao transporte de água, o transporte do ião hidrónio ( $H_3O^+$ ) poderá fazer-se com condicionantes semelhantes, nomeadamente no que diz respeito ao coeficiente de difusão do permeante, admitindo que o percurso de difusão de água e do ião hidrónio na cutícula possam ser

<sup>9</sup> Assumindo que o fluxo transmembranar do anião e do catião de um sal deve ser igual para manter a electroneutralidade da solução dadora e receptora, a permeabilidade de um ácido ou de um sal pode exprimir-se em termos de permeabilidade efectiva, uma razão de permeabilidades iónicas do catião e do anião, igual a  $2P_+P_-/(P_+ - P_-)$ .

semelhantes. Adicionalmente, alguns dos valores citados na Tabela 2.1 foram obtidos em ensaios de transporte de radioactividade utilizando água tritiada ( $^3\text{HOH}$ ), não se distinguindo, neste caso, qual dos permeantes, água ou ião hidrónio radioactivos, é transportado. Também nestes casos, os valores de permeância obtidos são semelhantes aos derivados de medições feitas com outros métodos experimentais. Com estas considerações, concluiu-se que esta célula de permeação seria adequada para realizar medições de fluxo transmembranar em membranas cuticulares, pelo que se prosseguiu com as experiências de comparação da permeabilidade de C e MC relativamente a vários permeantes.

### 2.6.3 Influência do gradiente de concentração na determinação de $P$

Com o objectivo de averiguar a dependência de  $P$  relativamente ao gradiente de concentração que é estabelecido através da membrana para as medições de fluxo transmembranar, realizaram-se sucessivas medições de  $J_{\text{H}^+}$  na mesma membrana, C ou MC, variando a concentração de  $\text{H}^+$  inicial na solução dadora. Em todos os casos, a solução aceitante foi água desionizada a pH 5,5. Os resultados obtidos na comparação de duas cutículas, C-2 e C-3, e de duas matrizes cuticulares, MC-2 e MC-3, são apresentados na Figura 2.9.

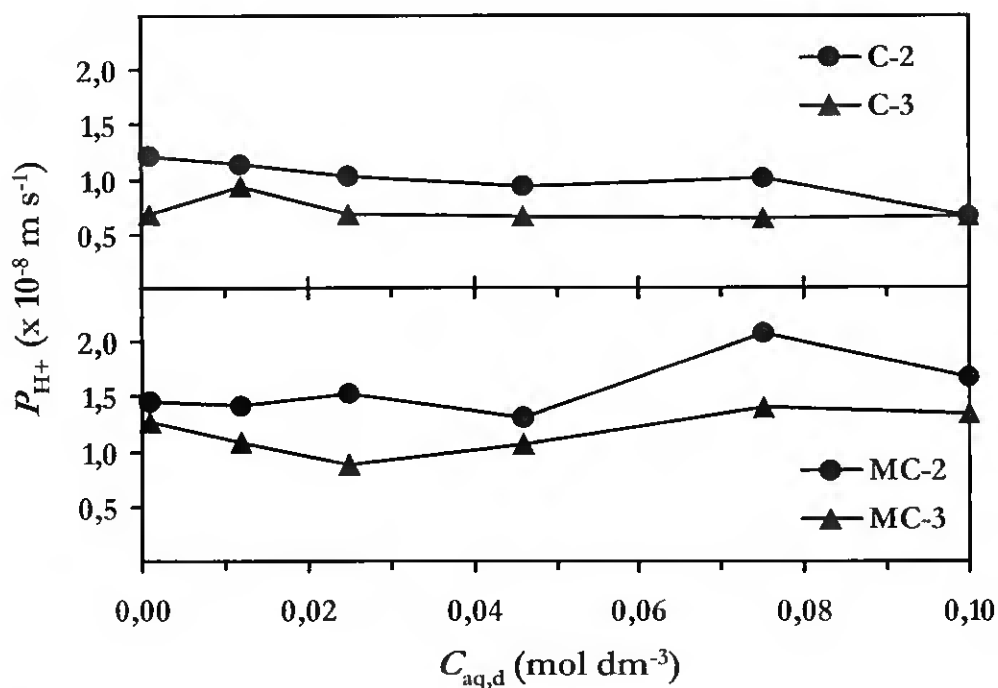


Figura 2.9. Permeância a protões,  $P_{\text{H}^+}$ , de cutículas (C) e matrizes cuticulares (MC) em função da concentração inicial de  $\text{H}^+$  na solução dadora de permeante ( $C_{\text{aq,d}}$ ).

O fluxo de  $H^+$  nas membranas C-2 e C-3 e nas membranas MC-2 e MC-3 foi directamente proporcional ao gradiente de concentração do ião, pelo que a permeância verificada nestas classes de membranas (determinada pela relação da Equação 2.7) foi constante e independente do gradiente de concentração de  $H^+$  estabelecido.

Uma vez verificado que o gradiente de concentração de  $H^+$  não influenciou  $P_{H^+}$ , outros estudos de permeabilidade iónica foram levados a cabo utilizando diferentes concentrações de ião na solução dadora, consoante o produto de solubilidade do sal utilizado. Assim, nalguns ensaios, a concentração inicial de ião permeante na solução dadora foi de 0,1 M, enquanto que noutros se utilizou uma concentração de 0,01 M.

#### 2.6.4 Permeância e coeficiente aparente de difusão para protões

A permeância a protões,  $P_{H^+}$ , de membranas C e MC, foi determinada à temperatura de 25 °C numa série de 15 membranas de cada classe. Os resultados revelaram a existência de uma elevada variabilidade em  $P_{H^+}$ , tanto em membranas C como em membranas MC, obtendo-se um elevado desvio padrão associado ao valor médio calculado (Tabela 2.2).

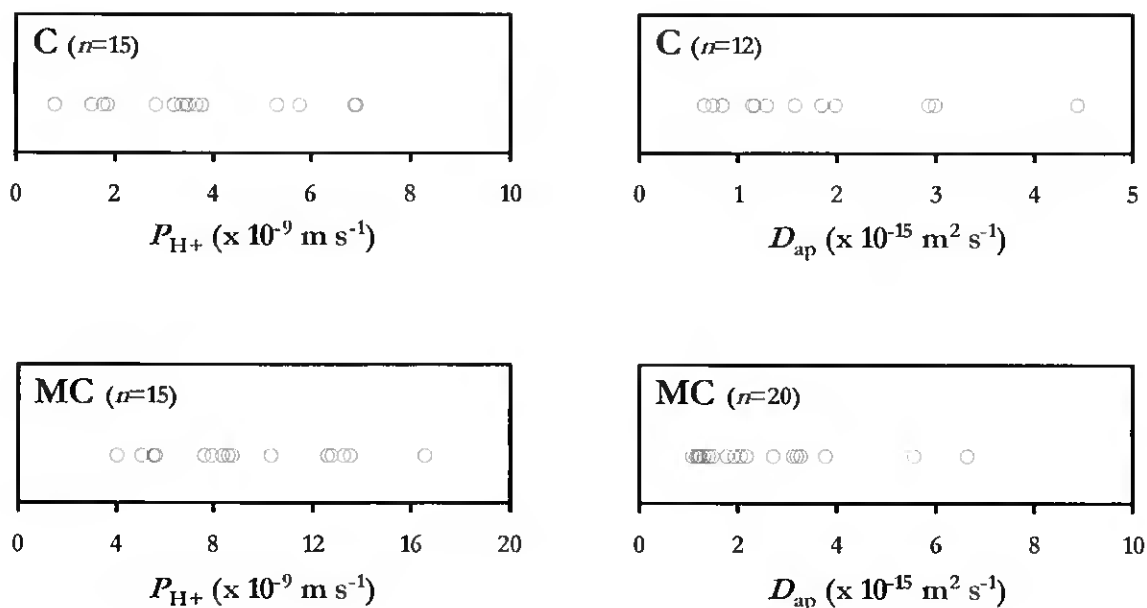
O coeficiente aparente de difusão,  $D_{ap}$ , para protões foi também determinado a 25 °C, numa série de membranas C e MC. Também neste caso se observou uma elevada variabilidade nas membranas testadas. A média ( $\pm$  desvio padrão) e a mediana dos valores obtidos para  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  na série de membranas C e MC testadas podem ser consultados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Permeância a protões,  $P_{H^+}$ , e coeficiente aparente de difusão,  $D_{ap}$ , para protões em membranas C e MC, a 25 °C.

Membrana	$P_{H^+} (\times 10^{-9} \text{ m s}^{-1})^a$		$D_{ap} (\times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})^b$	
	Média ( $\pm$ desvio padrão)	Mediana	Média ( $\pm$ desvio padrão)	Mediana
C	3,7 ( $\pm$ 1,9)	3,5	1,8 ( $\pm$ 1,1)	1,4
MC	9,4 ( $\pm$ 3,7)	8,6	2,4 ( $\pm$ 1,5)	1,9

<sup>a</sup> Número ( $n$ ) de determinações:  $n=15$  em C e  $n=15$  em MC; <sup>b</sup> Número ( $n$ ) de determinações:  $n=12$  em C e  $n=20$  em MC.

Comparando os valores da média e da mediana obtidos nas medições de  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  para protões, verifica-se que estes não são coincidentes, o que indica uma distribuição assimétrica dos valores obtidos relativamente à média. O facto de a mediana ser inferior à média do respectivo conjunto de medições (Tabela 2.2), é uma indicação de que a distribuição de valores é positivamente assimétrica, isto é, com uma maior dispersão para valores obtidos acima da média do que para valores inferiores à média. Na Figura 2.10 podem observar-se os gráficos de distribuição dos valores de  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  obtidos para as membranas C e MC, onde se confirma essa assimetria de distribuição.



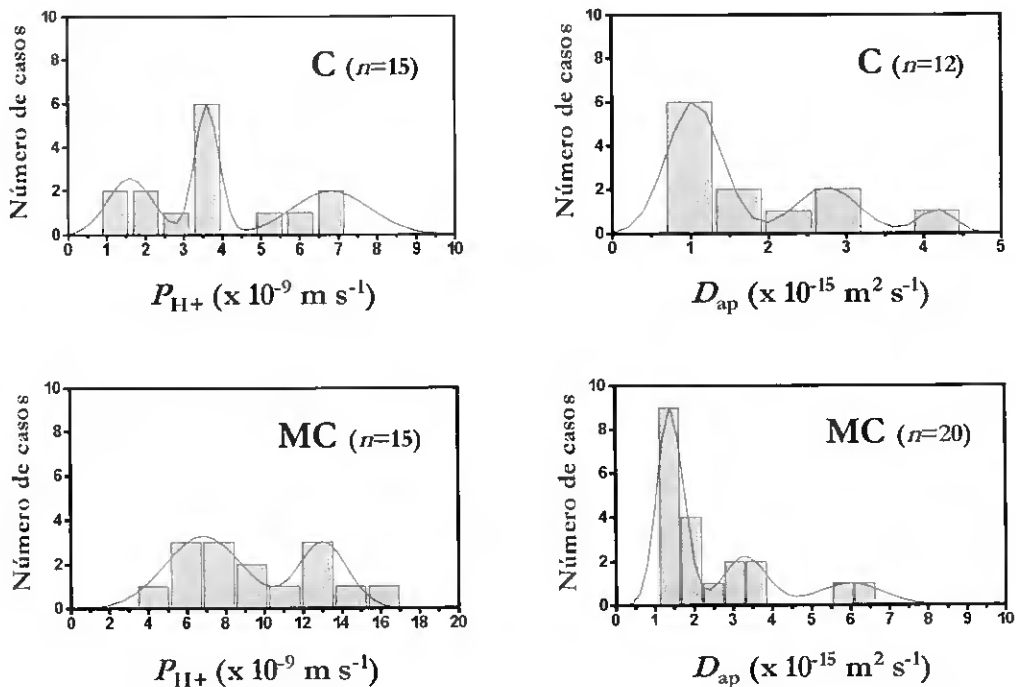
**Figura 2.10.** Distribuição dos valores obtidos para  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  em membranas C e MC, a 25 °C. A média ( $\pm$  desvio padrão) e a mediana dos valores representados são os apresentados na Tabela 2.2.

Um histograma de frequência dos valores experimentais representados na Figura 2.10 fornecerá melhor informação acerca da distribuição dos valores de  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  obtidos em cada conjunto de membranas. Para obter os histogramas apresentados na Figura 2.11, optou-se por escolher um intervalo de amostragem correspondente à divisão do intervalo em que se incluem os resultados em  $n/2$  fracções (sendo  $n$  o número de amostras). Como exemplo, tomando o caso de  $P_{H^+}$  em C, foram analisadas  $n=15$  membranas e todos os resultados se

incluiram entre  $0,8 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$  e  $6,9 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ , pelo que foram considerados intervalos de  $0,8 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$  para o respectivo histograma de frequência.

Conforme se retira dos gráficos da Figura 2.11, a reduzida amostragem de valores para  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$ , tanto nas medições em membranas C como em MC, impede a realização de uma análise estatística da distribuição de resultados conclusiva. No entanto, algumas considerações podem ser feitas. Nomeadamente, a distribuição dos valores não é normal mas sim assimétrica relativamente à média, como aliás já tinha sido inferido pela comparação da média e da mediana dos valores obtidos. Além do mais, a distribuição aparenta ser multimodal, tal como indicado pelo ajuste de uma função correspondente à soma de várias distribuições normais aos dados dos histogramas.

Com base nas considerações anteriores, optou-se por analisar os resultados em função dos valores medianos de  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$ . Assim, dos valores apresentados na Tabela 2.2, conclui-se que  $P_{H^+}$  em membranas MC é cerca de 2,5 vezes superior ao que é registado em membranas C, sendo  $D_{ap}$ , por sua vez, mais elevado em membranas MC, cerca de 1,4 vezes superior ao encontrado em C.



**Figura 2.11.** Histograma de frequência de valores de permeância a  $H^+$ ,  $P_{H^+}$ , e de coeficiente aparente de difusão de  $H^+$ ,  $D_{ap}$ , obtidos em membranas C e MC ( $n$ , número de amostras).

### 2.6.5 Controlo da integridade física das membranas

A determinação de  $P_{H^+}$  foi adoptada como uma forma de controlar a integridade física das membranas e também como um meio de limitar a variabilidade dos resultados nos estudos efectuados no âmbito deste trabalho. Em virtude da simplicidade e fiabilidade do método,  $P_{H^+}$  foi medido em cada membrana antes de se prosseguir para medições de fluxo de outros permeantes, como procedimento geral durante todo o trabalho. As membranas que apresentaram um valor de  $P_{H^+}$  não incluído no intervalo definido pela média e desvio médio obtidos para a respectiva classe de membranas, em conformidade com os valores que constam na Tabela 2.2, não foram consideradas para posteriores medições de fluxo.

### 2.6.6 Permeância a uma série de catiões e aniões

A permeabilidade de C e MC aos catiões,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , e  $NH_4^+$ , e aos aniões,  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$ , foi comparada determinando-se a permeância das membranas aos referidos iões,  $P_{i\grave{a}o}$ , à temperatura de 25 °C. Com este estudo, procurou-se uma correlação entre  $P_{i\grave{a}o}$  e a dimensão dos iões, hidratados ou livres da sua esfera de hidratação. Na Tabela 2.3, são apresentados os valores da mediana obtida para  $P_{i\grave{a}o}$  nas determinações realizadas numa série de membranas C e MC. Optou-se por apresentar o valor mediano em vez do valor médio e respectivo desvio padrão pelas razões explicitadas na Secção 2.6.4 acerca da distribuição de valores obtidos para  $P_{H^+}$ . Acrescenta-se, contudo, que os desvios padrão que se podiam calcular para cada série de resultados foram elevados, à semelhança dos encontrados para as determinações de  $P_{H^+}$ .

Na Tabela 2.3, apresenta-se o raio iónico cristalino,  $r_c$ , o raio hidrodinâmico,  $r_{hid}$ , e a energia livre de hidratação,  $\Delta G_{hid}^o$ , relativos a cada um dos iões estudados. De acordo com o modelo de permeação de uma membrana de dissolução, espera-se que a permeância seja directamente proporcional ao coeficiente de difusão do permeante na membrana (Equação 2.3), o qual, por sua vez, é inversamente proporcional ao volume do permeante. Assim sendo, e com o objectivo de procurar uma correlação entre  $P_{i\grave{a}o}$  para os catiões e aniões testados em membranas C e MC e os parâmetros referidos, construíram-se os gráficos apresentados na Figura 2.12. Tendo em conta a elevada variabilidade também registada nas medições de  $P_{i\grave{a}o}$ , não se pode concluir que exista uma clara correlação entre  $P_{i\grave{a}o}$  e o raio iónico cristalino, ou mesmo entre  $P_{i\grave{a}o}$  e o raio hidrodinâmico ou a energia livre de hidratação do ião. Esta observação é válida tanto para C como para MC. Verificou-se, no entanto, que  $P_{i\grave{a}o}$  em

MC foi sistematicamente mais elevado do que em C, indicando que a presença das ceras se traduziu num aumento da resistência ao transporte dos vários iões através da membrana.

**Tabela 2.3.** Permeância de membranas C e MC a uma série de catiões e aniões,  $P_{\text{ião}}$ , à temperatura de 25 °C. Para cada ião, é indicado o raio cristalino,  $r_c$ , o raio hidrodinâmico,  $r_{\text{hid}}$ , e a energia livre de hidratação,  $\Delta G_{\text{hid}}^{\circ}$ .

Ião	$r_c^a$ ( $\times 10^{-10}$ m)	$r_{\text{hid}}^b$ ( $\times 10^{-10}$ m)	$\Delta G_{\text{hid}}^{\circ a}$ (kJ mol $^{-1}$ )	$P_{\text{ião}}$ ( $\times 10^{-9}$ m s $^{-1}$ )	
				C	MC
Li $^+$	0,69	2,12	-475	1,2 ( $n = 5$ ) <sup>c</sup>	3,6 ( $n = 8$ )
Na $^+$	1,02	1,64	-365	2,2 ( $n = 5$ )	1,7 ( $n = 8$ )
K $^+$	1,38	1,11	-295	0,9 ( $n = 5$ )	2,6 ( $n = 8$ )
NH $_4^+$	1,48	1,11	-285	1,7 ( $n = 4$ )	2,8 ( $n = 6$ )
F $^-$	1,33	1,49	-465	1,5 ( $n = 12$ )	3,2 ( $n = 10$ )
Cl $^-$	1,81	1,07	-340	0,9 ( $n = 10$ )	3,3 ( $n = 12$ )
Br $^-$	1,96	1,05	-315	2,4 ( $n = 11$ )	4,4 ( $n = 11$ )

<sup>a</sup>Valores obtidos de Marcus (1991); <sup>b</sup>Valores calculados a partir da mobilidade electroforética do ião em água a 25 °C (Anexo A); <sup>c</sup>Número de determinações.

É possível que a variabilidade encontrada nas determinações de  $P_{\text{ião}}$  dificulte a observação de uma correlação entre  $P_{\text{ião}}$  e as dimensões do ião hidratado ou desidratado, se esta for pouco significativa. De forma a tentar esclarecer esta questão, determinou-se  $P_{\text{ião}}$  para a série de catiões, Li $^+$ , Na $^+$  e K $^+$  em dois exemplares de C e MC e o mesmo foi feito para a série de aniões, F $^-$ , Cl $^-$  e Br $^-$  em outros dois exemplares de cada classe de membranas. Os resultados são apresentados na Figura 2.13 na forma de  $P_{\text{ião}}$  relativo, considerando-se  $P_{\text{Li}^+}$  como referência para a permeância das membranas a catiões ( $P_{\text{catião}}$ ), enquanto que  $P_{\text{F}^-}$  foi a referência para a permeância a aniões ( $P_{\text{anião}}$ ). Na série de catiões, pode observar-se um aumento de  $P_{\text{catião}}$  com  $r_{\text{hid}}$  e  $\Delta G_{\text{hid}}^{\circ}$ , ao passo que se observa um decréscimo de  $P_{\text{catião}}$  à medida que aumenta o raio iónico cristalino, tanto em C como em MC. Estes resultados são compatíveis com a interpretação de que o ião permeia a membrana no estado desidratado. No entanto, no que diz respeito ao transporte dos aniões da série F $^-$ , Cl $^-$  e Br $^-$ , a dependência de  $P_{\text{anião}}$  relativamente a  $r_{\text{hid}}$  e  $\Delta G_{\text{hid}}^{\circ}$ , e a  $r_c$ , já sugere uma interpretação oposta.

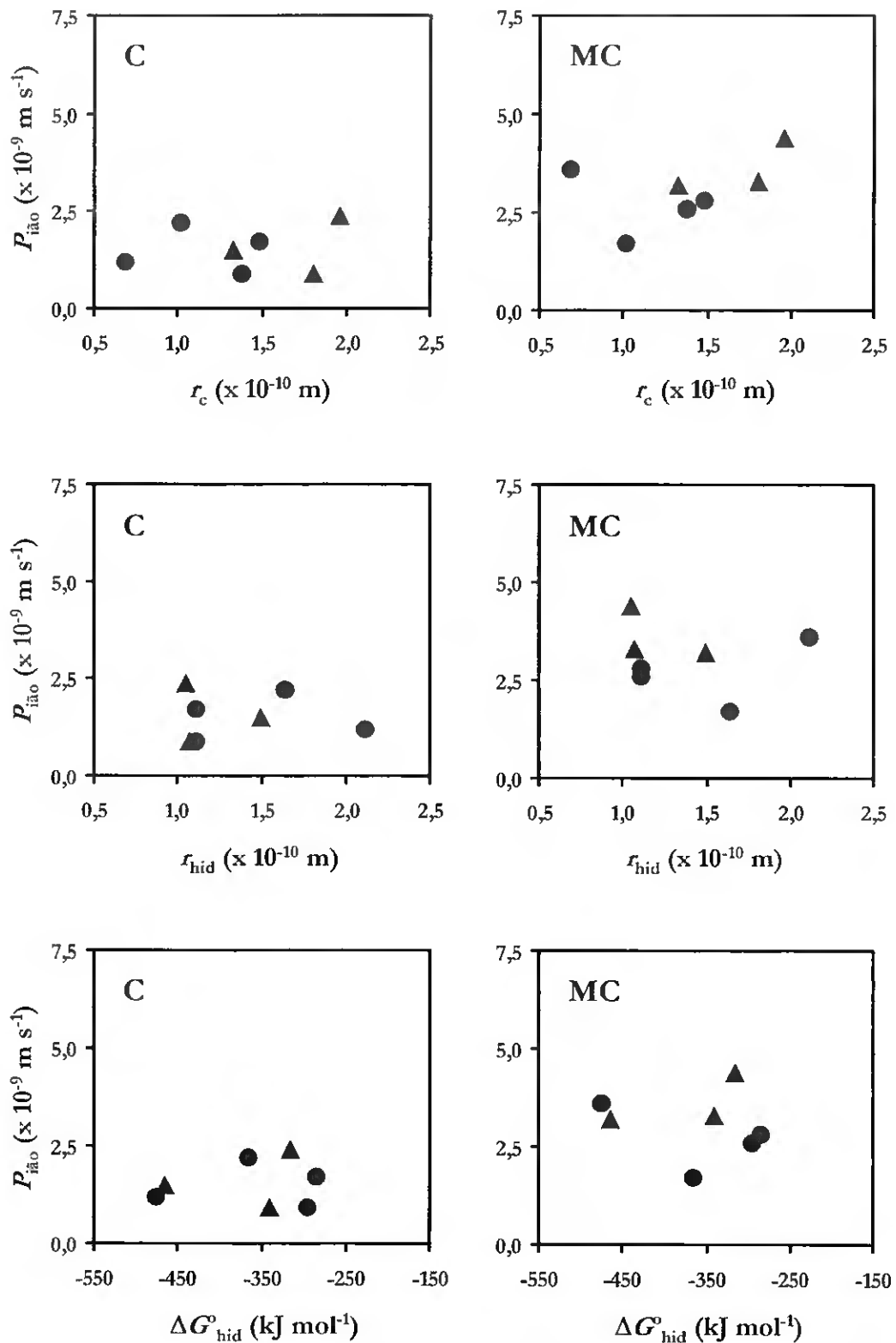
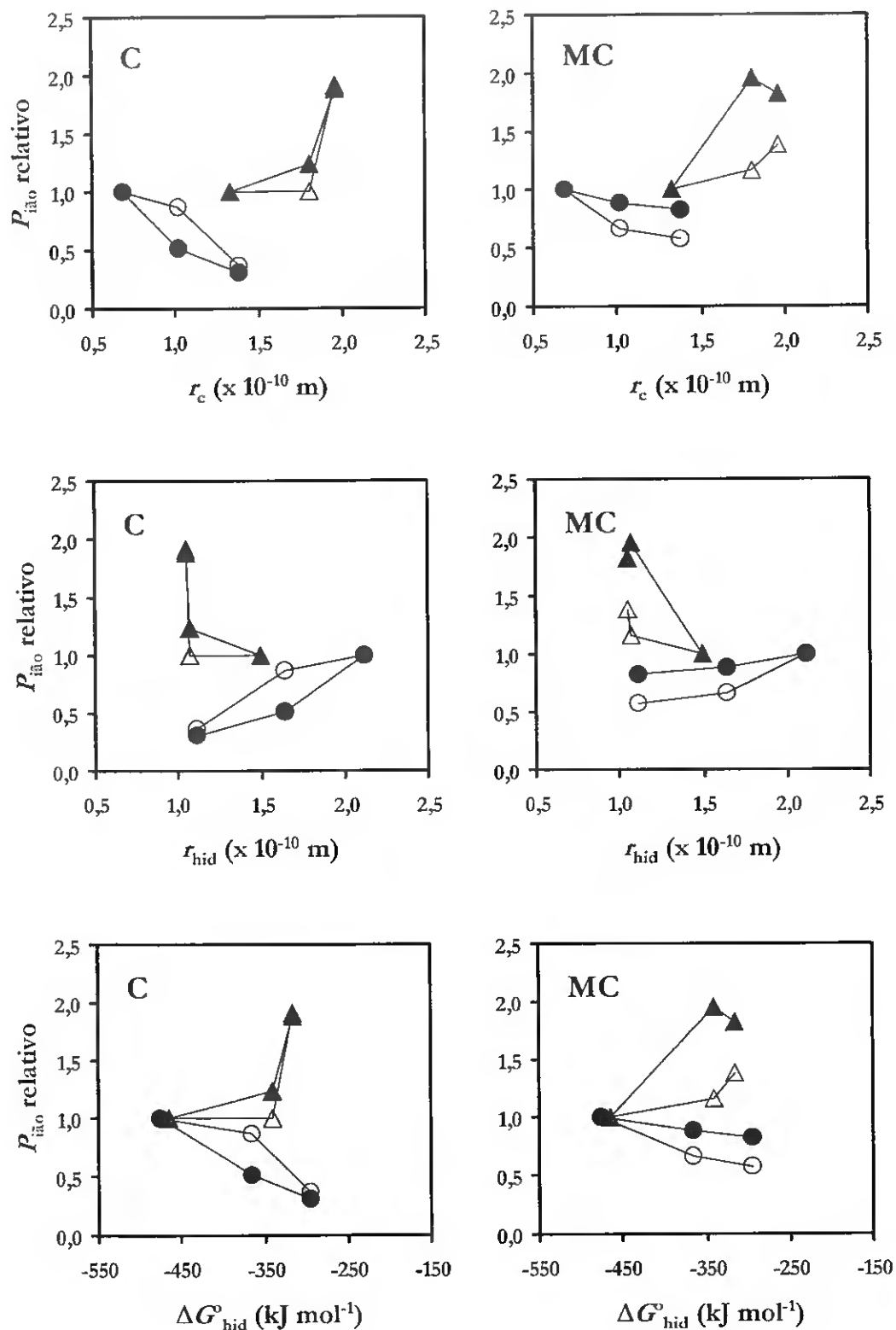


Figura 2.12. Permeância de membranas C e MC relativamente aos cátions  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  (●) e aos ânions  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Br}^-$  (▲) em função do respectivo raio iónico cristalino,  $r_c$ , raio hidrodinâmico,  $r_{hid}$ , e energia livre de hidratação do ião,  $\Delta G_{hid}^\circ$  (Tabela 2.3).



**Figura 2.13.** Permeância relativa,  $P_{cânio}/P_{Li^+}$  ou  $P_{anão}/P_{F^-}$ , de dois exemplares de cutícula e dois exemplares de matriz cuticular (distinguidos com símbolos abertos e fechados) relativamente aos cátions  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  (●, ○) e aos ânions  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$  (▲, △), em função do respectivo raio iónico cristalino,  $r_c$ , raio hidrodinâmico,  $r_{hid}$ , e energia livre de hidratação,  $\Delta G^{\circ}_{hid}$  (Tabela 2.3). As linhas unem os dados relativos a cada membrana.

### 2.6.7 Permeância a $H^+$ e a $Na^+$ em função da temperatura

Examinou-se  $P_{H^+}$  e  $P_{Na^+}$  em função da temperatura em membranas C e MC, numa tentativa de esclarecer se a permeação destes iões através das membranas estudadas implica, ou não, a perda da sua esfera de hidratação. Pressupondo que as membranas estudadas se comportam como membranas de dissolução, a perda da esfera de hidratação do ião facilitaria a sua difusão no meio apolar da membrana. No entanto, a perda da esfera de hidratação representa também uma barreira energética no processo de permeação, pelo menos de igual magnitude que a energia livre de hidratação do ião, que será significativamente reduzida se a permeação destas membranas for mediada por poros acessíveis ao ião com a sua esfera de hidratação.

Os resultados de  $P_{H^+}$  ou  $P_{Na^+}$  medidos em função da temperatura absoluta ( $T$ ), foram representados em gráficos de Arrhenius, como no exemplo da Figura 2.14, onde se representam os resultados obtidos para uma membrana C e uma membrana MC.

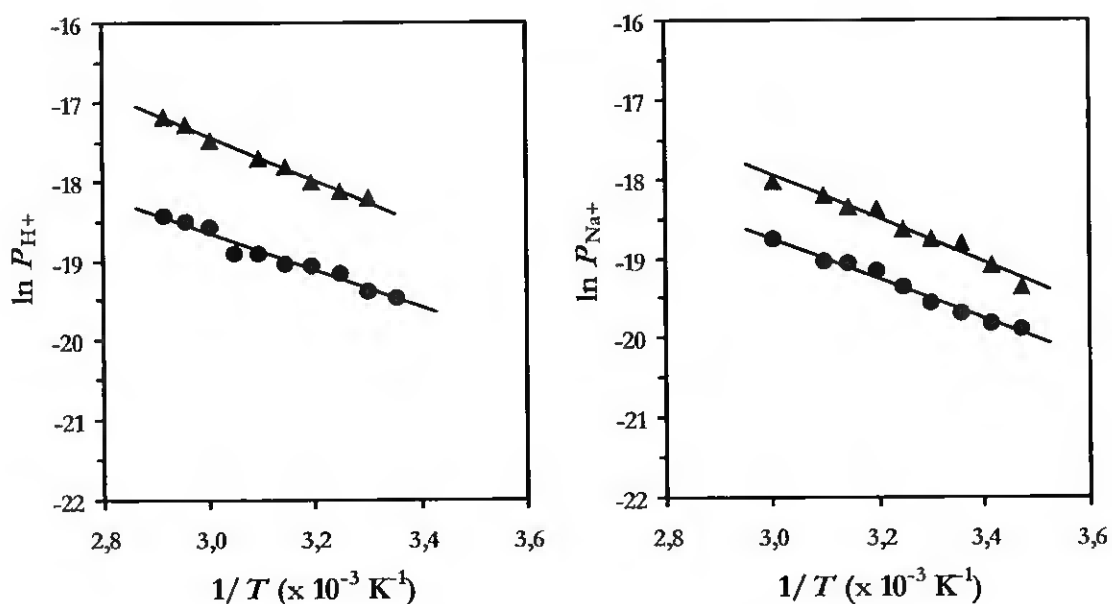
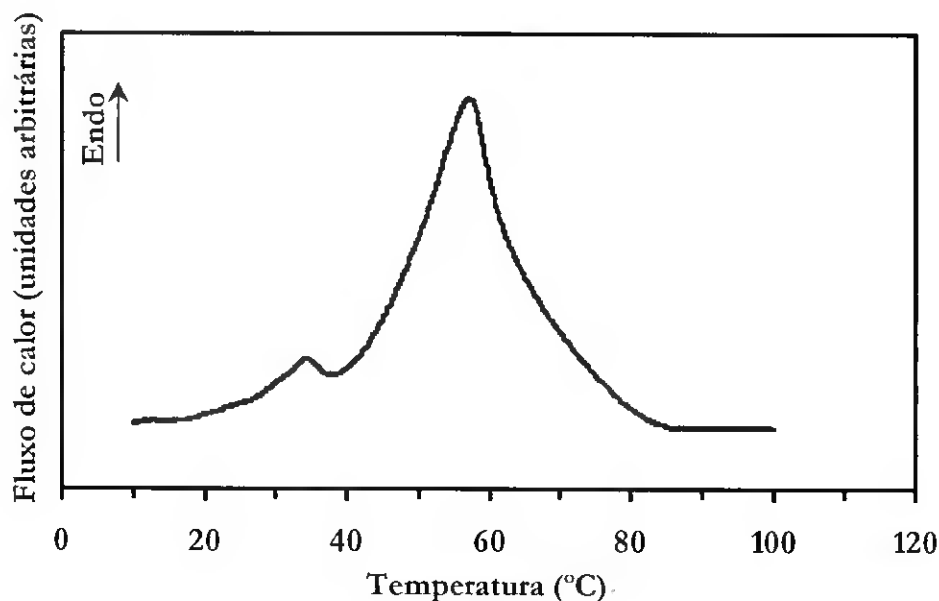


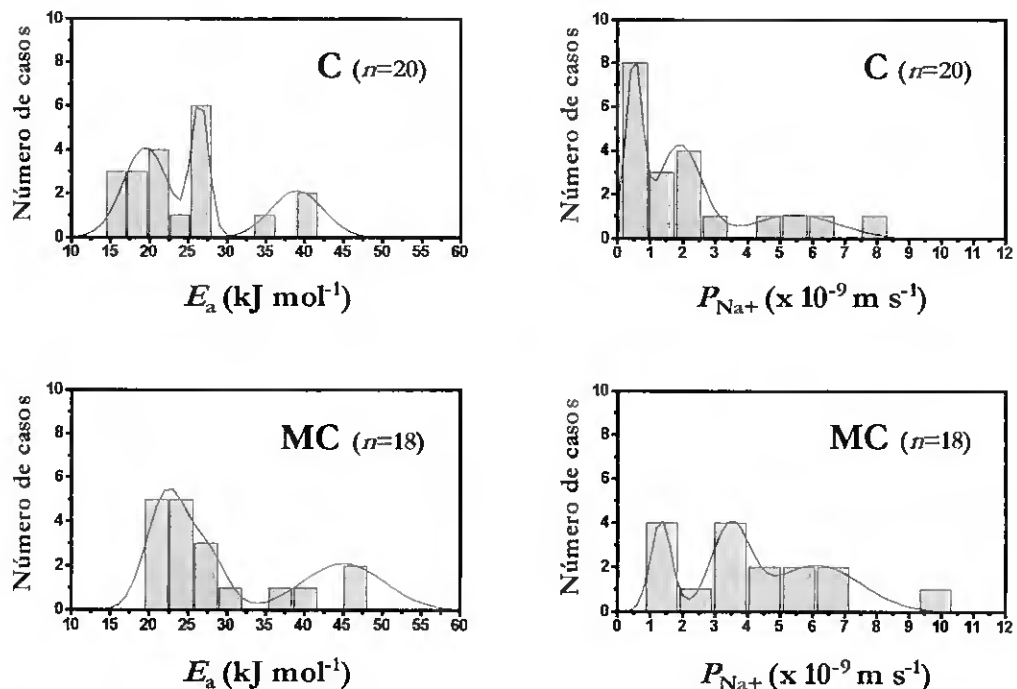
Figura 2.14. Gráficos de Arrhenius para  $P_{H^+}$  e  $P_{Na^+}$  numa membrana C (●) e numa membrana MC (▲). As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação linear ( $r^2 > 0,97$ ).

A energia de activação para a permeação dos iões foi constante na gama de temperaturas observada, em todas as membranas testadas, obtendo-se sistematicamente uma variação monotónica de  $\ln P$  em função de  $1/T$ , tal como na representação da Figura 2.14. De acordo com estes resultados, o transporte de  $H^+$  e  $Na^+$  não foi significativamente influenciado por transformações de fase que eventualmente se registem nas membranas nesta gama de temperaturas. Investigando a fusão de um extracto de ceras de cutícula de tomate, recorrendo à técnica de calorimetria diferencial de varrimento, verificou-se que este extracto funde numa larga gama de temperaturas, entre 20 e 80 °C, com uma temperatura média de fusão situada a cerca de 60°C, conforme indicado no termograma da Figura 2.15. Apesar de a gama de temperaturas a que se regista a fusão das ceras da cutícula de tomate abranger a gama de temperaturas a que foi medida a permeância das membranas a  $H^+$  e a  $Na^+$ ,  $P_{i\grave{a}o}$  foi independente do comportamento de fases das ceras da cutícula. Considerou-se esta observação como uma indicação de que, embora a presença destas reduza claramente a permeabilidade da membrana, o processo de permeação destes iões não depende do estado físico das ceras.



**Figura 2.15.** Termograma de fusão de um extracto de ceras de cutícula de tomate, obtido por calorimetria diferencial de varrimento.

A energia de activação,  $E_a$ , para o transporte de  $H^+$  e de  $Na^+$  em C e MC foi determinada a partir dos gráficos de Arrhenius relativos a cada uma das membranas estudadas. Inicialmente foram testados cinco exemplares de membranas de cada classe e efectuado o cálculo da energia de activação para o transporte transmembrantar dos iões.  $E_a$  para a permeação de  $H^+$  e  $Na^+$  foi muito semelhante na cutícula e na sua matriz, com tendência para ser superior em MC, comparativamente a C. Enquanto que  $E_a$  para o transporte de  $H^+$  foi de  $22 (\pm 4) \text{ kJ mol}^{-1}$  em MC e de  $20 (\pm 2) \text{ kJ mol}^{-1}$  em C, para o transporte de  $Na^+$  foi de  $28 (\pm 4) \text{ kJ mol}^{-1}$  em MC e de  $24 (\pm 6) \text{ kJ mol}^{-1}$  em C. Em face da variabilidade já observada noutras medições de permeância nestas membranas, e tendo em conta, também, a distribuição multimodal registada anteriormente para  $P_{H^+}$  (Figura 2.11), entendeu-se ser adequado obter um conjunto maior de determinações de  $E_a$  de modo a avaliar melhor o tipo de distribuição dos resultados que se obtinham. Reduzindo esse estudo de variabilidade para as determinações de  $E_a$  para a permeação de  $Na^+$ , fizeram-se mais medições de  $P_{Na^+}$  em função da temperatura, obtendo-se resultados para um conjunto de vinte membranas C e dezoito membranas MC. Os histogramas de frequência de valores de  $E_a$  de permeação de  $Na^+$  obtidos em membranas C e MC são apresentados na Figura 2.16.



**Figura 2.16.** Histograma de frequência de valores de energia de activação para o transporte de  $Na^+$ ,  $E_a$ , e de permeância a  $Na^+$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_{Na^+}$ , obtidos em membranas C e MC ( $n$ , número de amostras).

A variabilidade encontrada nos valores obtidos para  $E_a$  de transporte de  $\text{Na}^+$  reflecte a variabilidade encontrada nas medições de  $P_{\text{Na}^+}$  a cada temperatura, tal como se pode constatar no histograma de frequência de  $P_{\text{Na}^+}$  à temperatura de 20 °C relativo à mesma série de membranas C e MC, também apresentado na Figura 2.16. Em todos os casos apresentados, a distribuição de dados é multimodal, isto é, descrita por uma soma de curvas de distribuição normais. Acrescenta-se que, no conjunto total de medições efectuadas em cada classe de membrana, se obteve um valor mediano para  $E_a$  de permeação de  $\text{Na}^+$  de 25 kJ mol<sup>-1</sup> em MC e de 22 kJ mol<sup>-1</sup> em C, sendo este um valor inferior ao da média que pode ser calculada para a mesma série de resultados. Esta última, a média obtida para a série de vinte membranas C e dezoito membranas MC, foi idêntica à registada na mesma classe de membranas na serie mais limitada de experiências (valor indicado para cinco membranas de cada classe testadas inicialmente) mas o desvio padrão aumentou ligeiramente com o aumento do número de experiências realizadas.

### 2.6.8 Permeância a vários álcoois

Em hipótese, tendo em conta os custos energéticos do processo de permeação cuticular, o transporte de permeantes por difusão em poros deve ser preferencialmente utilizado pelos permeantes cujas dimensões permitam a sua difusão através dos referidos poros, em detrimento do transporte por dissolução na membrana. De forma a testar esta hipótese, procurou-se relacionar a permeância de cutículas e de matrizes cuticulares a uma série de pequenas moléculas polares, variando a sua dimensão molecular e solubilidade num meio apolar. Para o efeito, escolheram-se os álcoois metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol como permeantes a testar, por se registar uma variação progressiva dos referidos parâmetros nessa série de moléculas. Além do mais, é conhecido o coeficiente de partição entre a matriz de cutina e uma solução aquosa para todos os álcoois da série escolhida, conforme determinado por Merk e Riederer (1997).

A permeância de C e MC relativamente aos vários álcoois,  $P_{\text{álcool}}$ , foi comparada à temperatura de 20 °C. Foram obtidos resultados para uma série de vinte membranas C e vinte e duas membranas MC. Como forma de reduzir a variabilidade dos resultados, foi utilizada uma solução dadora de permeante que continha simultaneamente todos os álcoois, cada um numa concentração de 0,1 M. Nestas condições, a fracção de massa total de álcool em solução

foi de 0,042, bastante reduzida, de modo a evitar que as propriedades da membrana estudada fossem afectadas pela solução. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 2.4.

Membranas do tipo MC foram mais permeáveis a qualquer um dos álcoois testados do que membranas C, o que esteve de acordo com os resultados anteriormente obtidos em medições de permeância,  $P_{H^+}$  ou  $P_{i_{ão}}$ . Acrescenta-se, ainda, que, numa dada membrana,  $P_{álcool}$  para qualquer dos álcoois testados foi superior a  $P_{H^+}$ . A variabilidade registada nas medições de  $P_{álcool}$  foi elevada, tal como já tinha sido notada nas medições de  $P_{H^+}$  e de  $P_{Na^+}$ , obtendo-se histogramas de distribuição de resultados semelhantes aos apresentados nas Figuras 2.11 e 2.16, respectivamente. Dada a semelhança de registos, optou-se por não apresentar as figuras correspondentes. Em conformidade com apresentações anteriores de resultados de medições de permeância, os valores de  $P_{álcool}$  indicados na Tabela 2.4 correspondem à mediana dos valores obtidos na série de experiências realizadas.

**Tabela 2.4.** Permeância de membranas C e MC a álcoois,  $P_{álcool}$ , à temperatura de 20 °C. Indica-se o coeficiente de partição entre MC e água,  $K_p$ , o raio molecular de van der Waals,  $r_{vdw}$ , e o factor de correcção do coeficiente de fricção para moléculas não esféricas,  $f/f_0$  (Equação 2.11) para cada álcool.

Álcool	$K_p^a$	$r_{vdw}^b$ ( $\times 10^{-10}$ m)	$f/f_0^b$	$P_{álcool}$ ( $\times 10^{-9}$ m s $^{-1}$ )	
				C ( $n=20$ ) <sup>c</sup>	MC ( $n=22$ )
Metanol	0,088	2,36	1,00	8,2	35,5
Etanol	0,14	2,58	1,01	6,2	24,8
1-Propanol	0,48	2,77	1,03	6,9	32,1
2-Propanol	0,25	2,77	1,01	4,2	18,0
1-Butanol	1,9	2,93	1,06	10,3	52,9
2-Metil-1-propanol	1,3	2,93	1,02	7,3	35,8
2-Metil-2-propanol	0,41	2,93	1,00	3,3	12,4

<sup>a</sup>Valores obtidos por Merk e Riederer (1997); <sup>b</sup>Valores indicados por Edward (1970); <sup>c</sup>Número de determinações.

Analisando os resultados da Tabela 2.4, observa-se uma correlação entre a diminuição de  $P_{álcool}$  e a diminuição de  $K_p$  para os álcoois da série de 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol. Na mesma Tabela, é possível observar que  $P_{álcool}$  diminuiu na série de

metanol, etanol e 2-propanol, em função do aumento do raio molecular de van der Waals dos álcoois,  $r_{vdw}$ . A permeância das membranas a 1-propanol foi superior à registada com 2-propanol, diferindo estes permeantes, fundamentalmente, em  $K_p$ , uma vez que apresentam um raio molecular de van der Waals idêntico.

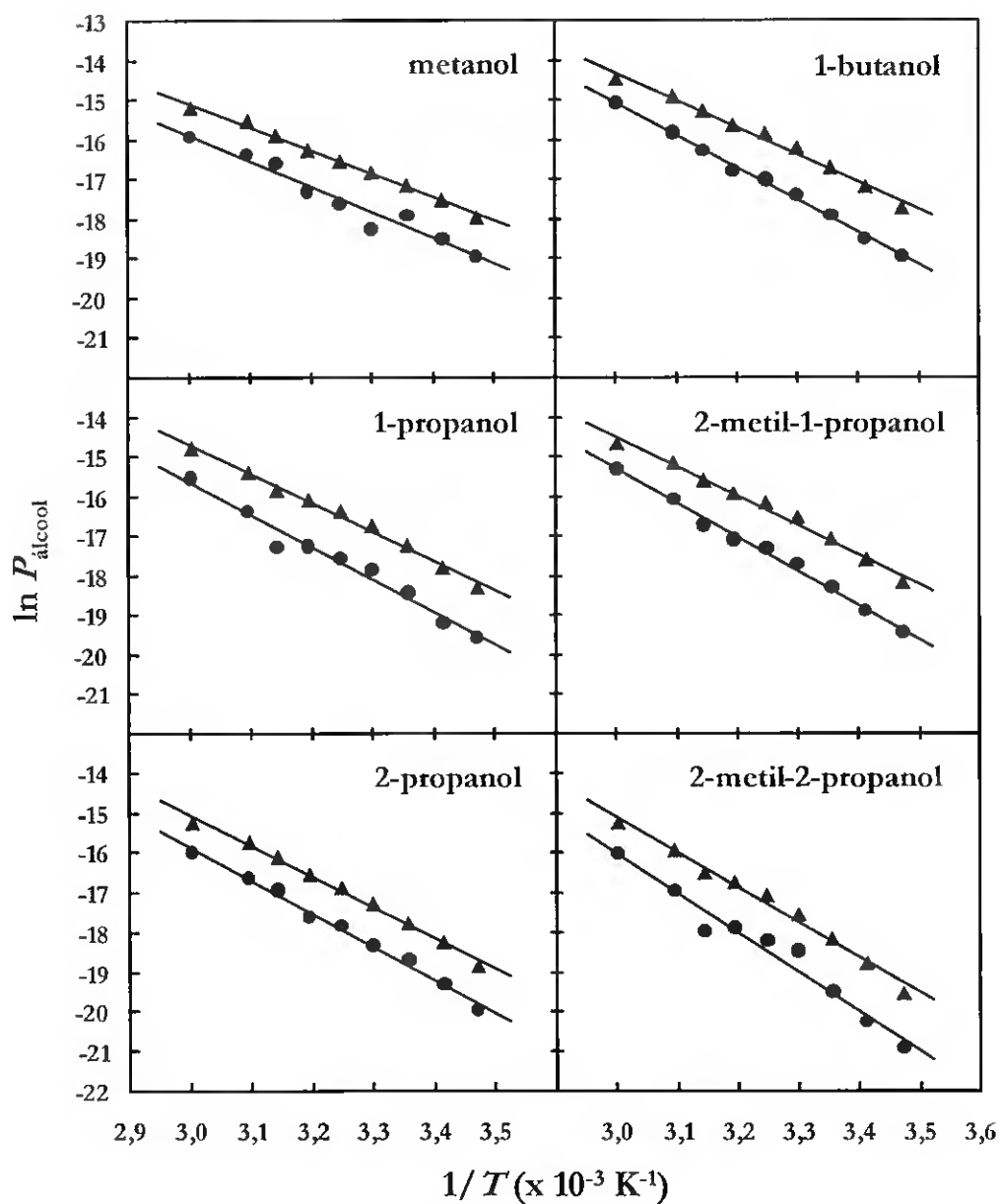
### 2.6.9 Permeância a álcoois em função da temperatura

O estudo da influência da temperatura em  $P_{\text{álcool}}$  foi realizado com o objectivo de comparar a barreira energética para o transporte dos álcoois, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol nas membranas estudadas. Com os valores de  $P_{\text{álcool}}$  obtidos a várias temperaturas, foram construídos gráficos de Arrhenius como os apresentados na Figura 2.17 (o gráfico relativo a etanol foi omitido por razões de composição da Figura). Foram obtidos resultados para uma série de vinte membranas C e vinte e duas membranas MC, determinando-se a energia de activação,  $E_a$ , para o transporte de cada um dos álcoois estudados nos vários exemplares de cada classe de membranas. Os valores da mediana dos resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.5, onde se constata um aumento de  $E_a$  na série de álcoois 1-butanol<2-metil-1-propanol<2-metil-2-propanol e noutra série de álcoois, de metanol<etanol<2-propanol.

**Tabela 2.5.** Energia de activação,  $E_a$ , para o transporte de vários álcoois em membranas C e MC.

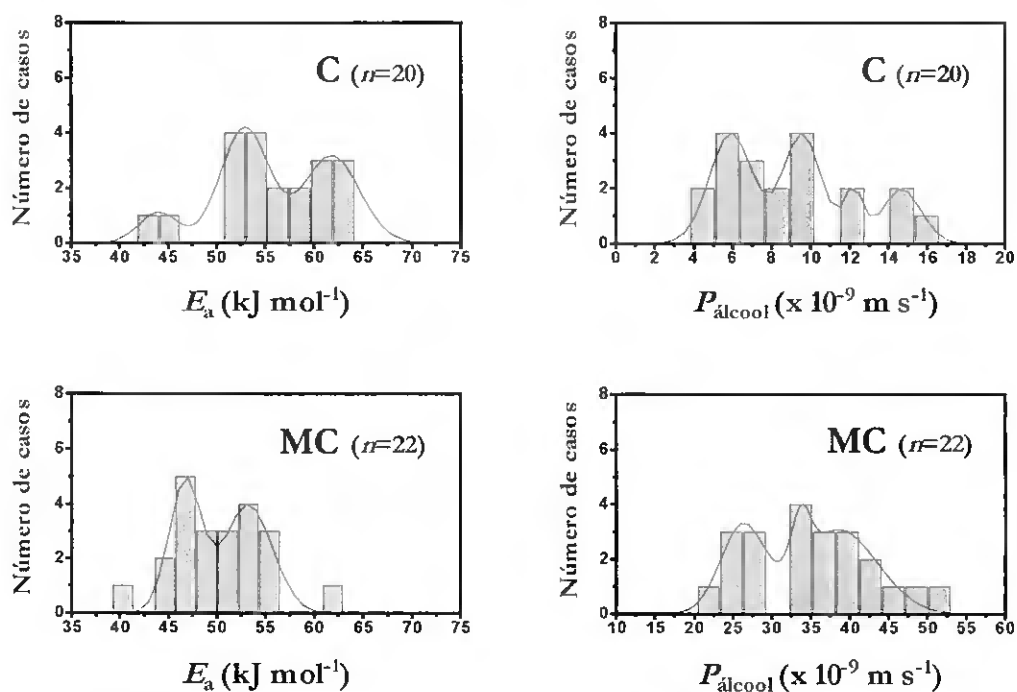
Álcool	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	
	C ( $n = 20$ ) <sup>a</sup>	MC ( $n = 22$ )
Metanol	55.8	50.0
Etanol	60.9	57.5
1-Propanol	68.8	59.3
2-Propanol	68.2	64.6
1-Butanol	69.6	54.2
2-Metil-1-propanol	71.3	59.5
2-Metil-2-propanol	76.6	69.7

<sup>a</sup>Número de determinações.



**Figura 2.17.** Gráficos de Arrhenius para  $P_{\text{álcool}}$  relativos a vários álcoois numa membrana C (●) e numa membrana MC (▲). As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação linear ( $r^2 > 0,97$ ).

Nos gráficos da Figura 2.18 são apresentados os histogramas de frequência para as determinações de  $E_a$  de transporte de metanol em membranas C e MC, nos quais se pode observar, à semelhança de medições anteriores, uma distribuição multimodal. Na mesma Figura, é possível constatar que a variabilidade nos resultados obtidos para  $E_a$  está associada também a uma elevada variabilidade de permeância das membranas analisadas, como é constatado no histograma de frequência de valores de  $P_{\text{álcool}}$  para metanol, relativo às medições efectuadas a 20°C. Acrescenta-se que resultados semelhantes foram obtidos para  $P_{\text{álcool}}$  e  $E_a$  no caso dos restantes álcoois estudados.



**Figura 2.18.** Histograma de frequência de valores de energia de activação para o transporte de metanol,  $E_a$ , e de permeância a metanol a 20 °C,  $P_{\text{álcool}}$ , obtidos em membranas C e MC ( $n$ , número de amostras).

## 2.7 Discussão

O objectivo central deste trabalho consistiu em realizar um estudo sistemático do transporte transcuticular de iões e de álcoois de baixo peso molecular, de modo a recolher informação acerca do mecanismo de transporte de permeantes com estas características, nomeadamente no que diz respeito aos factores que influenciam o processo de transporte. Numa

interpretação simplificada da cutícula, esta pode ser vista como sendo composta por duas camadas contíguas de composição e propriedades distintas, uma, a matriz de cutina, e a outra, as ceras cuticulares. Embora ambas sejam constituídas por componentes de natureza lipídica, distinguem-se na sua organização molecular e estrutural. Adicionalmente, a interface entre estes dois meios, ceras e matriz, não é bem definida e pode ter características bastante diferentes das de qualquer um dos referidos meios, o que efectivamente, coloca algumas questões quanto à interpretação simplificada da estrutura da cutícula. Porém, na ausência de uma interface bem caracterizada, optou-se por considerar as propriedades da cutícula como uma soma das propriedades da matriz de cutina e das ceras cuticulares. Por essa razão, foram realizados os estudos comparativos de cutículas isoladas de tomate (C) bem como de suas matrizes cuticulares (MC), obtidas após uma extracção total das ceras cuticulares.

A escolha dos frutos de onde foram isoladas as membranas foi criteriosa, optando-se por utilizar só frutos plenamente desenvolvidos e numa fase de maturação precoce, isto é, ainda com uma coloração verde. O motivo desta selecção foi, por um lado, evitar utilizar cutículas com elevado conteúdo em flavonóides e por outro, evitar as lesões cuticulares devidas ao manuseamento ou infecções por fungos, mais vulgares nos frutos maduros. Relativamente aos flavonóides, estes são compostos fenólicos vulgarmente responsáveis por alguns tipos de pigmentação nas plantas. Os flavonóides naringenina e chalconaringenina acumulam-se na matriz cuticular do tomate durante o amadurecimento do fruto (Luque *et al.*, 1995) e a sua presença traduz-se numa diminuição da permeabilidade cuticular a água, pelo que a colheita de cutículas a partir de frutos maduros traria, eventualmente, factores adicionais de variabilidade na permeabilidade destas membranas.

Comparou-se a permeabilidade de membranas C e MC a vários iões e a uma série de álcoois de baixo peso molecular, determinando taxas de fluxo transcúticular recorrendo a uma célula de permeação desenvolvida para esse fim. O grupo de iões estudados incluiu  $H^+$ ,  $NH_4^+$ , uma série de três catiões do grupo dos metais alcalinos,  $Li^+$ ,  $Na^+$ , e  $K^+$ , e uma série de três aniões do grupo dos halogéneos,  $F^-$ ,  $Cl^-$ , e  $Br^-$ . A série de álcoois estudados incluiu, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol.

Escolheu-se monitorizar o fluxo do interior para o exterior da cutícula em detrimento do fluxo inverso, em primeiro lugar, porque na superfície externa da cutícula se acumulam as ceras cuticulares, muitas vezes formando aglomerados de cristais que podem dificultar o contacto superficial entre a cutícula e uma solução aquosa. Além do mais, o lado interno da

cutícula, composto maioritariamente pela matriz de cutina, é um meio considerado pouco limitante à difusão de solutos e é, por isso, caracterizado como um compartimento de adsorção através do qual se estabelece a continuidade entre o interior da planta e a zona da cutícula que é mais limitante à difusão de permeantes, sendo esta a região onde se encontra uma elevada densidade de ceras (Bauer e Schönherr, 1992). Assim, optou-se por monitorizar o transporte no sentido do interior para o exterior da membrana cuticular para comparar a permeabilidade das membranas estudadas, uma vez que representa o transporte fisiológico em condições naturais da cutícula.

Iniciou-se o estudo caracterizando a permeabilidade de C e MC a  $H^+$ . Numa experiência preliminar, pode demonstrar-se que o fluxo de  $H^+$  através de C e MC foi directamente proporcional ao gradiente de concentração do ião, de onde se concluiu que a permeância das membranas relativamente a este ião é independente do gradiente de concentração estabelecido através da membrana. Já anteriormente, num trabalho de McFarlane e Berry (1974), no qual foi determinada a permeância de cutículas relativamente a vários iões, havia sido referido que a aplicação de fluxos iónicos de diferente magnitude não se traduziu em diferentes valores da permeabilidade membranar medida. Num outro trabalho, em que foi estudada a permeabilidade de várias cutículas e das respectivas matrizes cuticulares a  $CaCl_2$  (Schönherr, 2000), demonstrou-se, também, que a constante de velocidade de penetração deste sal na membrana cuticular foi independente da concentração de sal aplicada na membrana. Com este conjunto de informações, conclui-se que a solubilidade dos iões na membrana cuticular se processa de acordo com a Lei de Henry, tal como se verifica numa membrana de dissolução.

A permeância medida para protões,  $P_{H^+}$ , em C e MC esteve na ordem de  $10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ . Valores desta grandeza são encontrados para a permeância de cutículas do mesmo fruto à água (Schönherr, 1982), o que não será de estranhar, considerando que o transporte de água e de protões nestas membranas se poderá processar por um mecanismo semelhante.  $P_{H^+}$  nestas membranas foi, ainda, uma ordem de grandeza inferior aos valores relatados para o transporte de  $H^+$  (na forma de HCl ou de  $HNO_3$ ) em cutículas de folhas de *Citrus limon* L. e de *Pyrus communis* L. (Hauser *et al.*, 1993). A variabilidade observada nas determinações da permeabilidade membranar a protões foi bastante elevada, tanto em C como em MC (Tabela 2.2). Sabe-se que cutículas destes frutos podem variar bastante na sua composição de ceras, em função da idade e de vários factores ambientais (Baker *et al.*, 1982) e essa pode ser uma fonte de variabilidade nas propriedades da membrana. No caso de cutículas provenientes

de folhas de *Citrus aurantium* L., por exemplo, demonstrou-se que diferenças na temperatura e humidade relativa durante o desenvolvimento das plantas se traduziram em variações significativas na permeabilidade cuticular a água (Haas e Schönherr, 1979; Riederer e Schneider, 1990). No entanto, mesmo que diferenças na composição em ceras possam estar na origem da variabilidade encontrada para C, elas não explicam a mesma variabilidade em membranas sem ceras, como MC. Nestas últimas, algumas diferenças na espessura ou no grau de interligações no polímero de cutina, por exemplo, são explicações mais prováveis para a variabilidade encontrada.

Todas as membranas utilizadas neste trabalho foram inicialmente avaliadas quanto à sua permeabilidade a  $H^+$ , de modo a garantir que fossem comparáveis em termos de permeabilidade e que não possuíam rupturas mecânicas que falseassem os resultados. Ainda assim, foi registada uma elevada variabilidade nas medições de permeância de C e de MC relativamente aos vários permeantes estudados. Uma variabilidade acentuada é habitualmente encontrada em estudos de permeabilidade cuticular (ver exemplo da Tabela 2.1) e, eventualmente, será uma propriedade intrínseca destes sistemas. De facto, em medições de permeabilidade membranar numa extensa variedade de cutículas, quer relativamente a água, quer relativamente a vários compostos orgânicos, pode ser observada uma elevada distribuição de valores, a qual não é uma distribuição normal mas sim positivamente assimétrica, com um prolongamento de distribuição para valores acima da média (Baur, 1997). Uma distribuição com este tipo de assimetria foi, também, observada nas medições de permeância realizadas neste trabalho, relativamente a  $P_{H^+}$  (Figura 2.11), a  $P_{Na^+}$  (Figura 2.16), e a  $P_{álcool}$  (Figura 2.18), no caso de cada um dos álcoois estudados.

Num extenso trabalho sobre variabilidade em medições de permeabilidade cuticular, Baur (1997) observou distribuições assimétricas, com assimetria positiva, as quais podiam ser interpretadas como distribuições lognormais, uma vez que se obtinham distribuições normais para a frequência do logaritmo dos valores medidos. Sendo este o caso, é mais correcto tomar como referência o valor da média geométrica, ou então da mediana, uma vez que tomar como referência o valor da média aritmética numa distribuição com assimetria positiva resulta na sobrestimação do valor da grandeza medida. Relativamente aos resultados obtidos neste trabalho, não foi claro que se aplicasse o modelo de distribuição lognormal, uma vez que as distribuições obtidas poderiam ser melhor interpretadas como uma soma de distribuições normais ou unimodais, ou seja, como distribuições multimodais. De facto, é discutível se a distribuição de valores de permeância deve ser normal ou lognormal. Uma distribuição

lognormal seria obtida se a permeância da membrana fosse função do produto de várias variáveis com distribuições normais (Ott, 1995). De entre os factores que afectam a permeância (Equações 2.3 e 2.5) pode-se prever que a espessura da membrana possa apresentar uma distribuição normal. Se este for o único factor dos que influencia a permeância a apresentar uma distribuição aleatória normal, então deveria ser obtida uma distribuição também normal para a permeância, o que não foi o caso. Se, por outro lado, também o coeficiente de difusão do permeante e o seu factor de partição para a membrana apresentarem uma distribuição normal, uma vez que podem ser afectados por variações na composição qualitativa da membrana, passam a ser considerados vários factores de variabilidade para a permeância da membrana, que justificam a observação de uma distribuição multimodal numa amostragem reduzida e que, eventualmente, originam uma distribuição lognormal de valores de permeância se a amostragem for suficientemente alargada. Em face das distribuições de permeância obtidas com as medições efectuadas não serem, nem normais, nem claramente lognormais (Figuras 2.11, 2.16 e 2.18), optou-se por tomar como referência, neste trabalho, o valor da mediana em detrimento do valor da média aritmética ou da média geométrica e respectivos intervalos de distribuição.

Pode colocar-se, ainda, a hipótese de que a variabilidade encontrada nas propriedades de C e MC esteja, de alguma forma, associada ao método de isolamento das membranas. No entanto, estudos comparativos de propriedades de transporte de cutículas de folhas intactas e de cutículas isoladas pelo método de digestão enzimática demonstrou que este procedimento não altera a permeabilidade da cutícula a compostos orgânicos (Kirsch *et al.*, 1997) nem a água (Schreiber, 1996). É importante acrescentar, também, que as cutículas que foram objecto de estudo no trabalho publicado por Kirsch *et al.* (1997) foram armazenadas no estado desidratado e à temperatura ambiente durante um largo período de tempo (pelo menos três meses), como aconteceu com as membranas utilizadas durante este trabalho.

A permeância a protões de membranas MC foi cerca de 2,5 vezes superior à encontrada em C (Tabela 2.2). Este aumento de  $P_{H^+}$  registado após a extracção das ceras da cutícula foi relativamente modesto quando comparado com o efeito da extracção de ceras na permeabilidade a água ou a compostos orgânicos encontrado noutras cutículas (como exemplo, consultar Tabela 1.2, Capítulo 1). No entanto, o aumento da permeabilidade a água na cutícula de tomate em resultado da extracção das ceras cuticulares é, também, bastante menor do que o observado em cutículas provenientes de folhas de várias outras espécies vegetais (Schönherr, 1982). Em média, as cutículas de frutos possuem uma permeabilidade

superior e uma percentagem relativa de ceras inferior à de cutículas de folhas (Schreiber e Riederer, 1996b). A acrescida permeabilidade da cutícula de frutos constitui, provavelmente, uma adaptação às necessidades fisiológicas destes órgãos das plantas, os quais não possuem estomas mas necessitam de manter uma taxa de transpiração suficientemente alta para assegurar o fornecimento de nutrientes.

O coeficiente aparente de difusão de  $H^+$ ,  $D_{ap}$ , foi medido em C e em MC, encontrado-se valores da ordem de  $10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para ambas as membranas, ligeiramente superiores nas membranas MC. O coeficiente de difusão de água observado em cutículas do mesmo fruto foi ligeiramente inferior mas dentro da mesma ordem de grandeza (Becker *et al.*, 1986). Se considerarmos que o percurso de difusão transcúticular de protões e de água poderá ser o mesmo, nomeadamente, se o mecanismo de permeação incluir a difusão destes permeantes em poros cuticulares, são de esperar coeficientes de difusão semelhantes entre água e protões, pelo menos em ordem de grandeza.

Em consequência da extracção das ceras cuticulares  $D_{ap}$  aumentou cerca de 1,4 vezes, tendo em conta a mediana dos valores obtidos (Tabela 2.2). Este aumento está, sem dúvida, relacionado com uma diminuição da barreira que a membrana constitui à difusão, em consequência da extracção das suas ceras cuticulares. No entanto, o aumento registado em  $P_{H^+}$  em função da mesma extracção de ceras foi de cerca de 2,5 vezes. Considerando a relação entre  $P_{H^+}$  e  $D_{ap}$  expressa na Equação 2.3, se a extensão do percurso de difusão ( $\Delta x$ ) e a solubilidade ( $K_p$ ) de  $H^+$  forem idênticas em C e MC, o aumento de  $P_{H^+}$  deveria corresponder ao aumento de  $D_{ap}$ , o que não se verificou. Conclui-se, então, que a extracção de ceras se traduziu, ou numa alteração da tortuosidade do percurso de difusão,  $\Delta x$ , ou da solubilidade de  $H^+$  na membrana,  $K_p$ , ou em ambos os efeitos, simultaneamente. Só a determinação de  $K_p$  para  $H^+$  nestas membranas poderia esclarecer esta questão. No entanto, assumindo que o percurso de difusão é aproximadamente o mesmo em membranas C e MC, seria de admitir que  $K_p$  para protões fosse superior em cerca de 1,8 vezes na matriz de cutina. Atendendo a que esta se comporta como um polímero polar trocador de catiões (Schönherr e Bukovac, 1973), esta seria uma possível interpretação dos resultados.

Não conhecendo o coeficiente de partição para  $H^+$ , ou para outros iões também estudados neste trabalho, entre uma solução aquosa e a cutícula ou a sua matriz ( $K_p$ ), e desconhecendo, também, a extensão do percurso de difusão ( $\Delta x$ ) destes permeantes nas membranas, podendo este ser distinto da espessura da membrana (e diferente na cutícula e na

sua matriz),  $P$  foi o parâmetro adoptado para a comparação das propriedades de barreira das membranas estudadas relativamente a vários permeantes, uma vez que este parâmetro é uma composição de  $D_{ap}$ ,  $K_p$  e  $\Delta x$ .

Numa tentativa de caracterizar alguns aspectos do mecanismo de permeação de espécies com carga iónica através de C e de MC, procurou-se uma relação entre a permeância das membranas a vários catiões e aniões,  $P_{i\grave{a}o}$ , e as dimensões do ião, tanto no estado hidratado como no estado não hidratado. Dos resultados apresentados na Tabela 2.3, não é aparente nenhuma clara correlação entre  $P_{i\grave{a}o}$  de C e MC e características do ião como o raio iónico cristalino, o raio hidrodinâmico ou a energia livre de hidratação. Ao mesmo tempo, a permeância de aniões,  $P_{ani\grave{a}o}$ , foi muito semelhante à permeância de catiões,  $P_{cati\grave{a}o}$ , quando se compararam iões com uma dimensão equivalente, pelo que o sinal da carga iónica também não foi determinante para a permeabilidade relativa das membranas aos iões em causa.

Num trabalho de McFarland e Berry (1974), no qual foi investigada a permeabilidade de cutículas de folhas de *Prunus armeniaca* L. a catiões do grupo dos metais alcalinos, estabeleceram-se valores de  $P_{cati\grave{a}o}$  na ordem de  $10^{-10}$  m s<sup>-1</sup>, cerca de uma ordem de grandeza inferiores aos encontrados na cutícula de tomate. Nesse mesmo estudo, constatou-se a existência de uma correlação linear entre  $P_{cati\grave{a}o}$  e o raio iónico do ião hidratado, com  $P_{cati\grave{a}o}$  a decrescer na ordem  $K^+ > Na^+ > Li^+$ . A mesma progressão foi demonstrada nos trabalhos de Tyree *et al.* (1990b, 1991), tendo sido obtidos valores de  $P_{cati\grave{a}o}$  na ordem de  $10^{-8}$  m s<sup>-1</sup> para cutículas de folhas de *Citrus aurantium* L. A diferença entre os resultados reportados pelos autores referidos e os resultados apresentados neste trabalho, nomeadamente na falta de correlação entre  $P_{cati\grave{a}o}$  com as dimensões do ião, prendem-se, sem dúvida, com o facto de as medições reportadas por estes autores terem sido efectuadas sistematicamente na mesma membrana para toda a série de iões estudados, ao passo que os valores da Tabela 2.3 se referem à distribuição de  $P_{cati\grave{a}o}$  numa população de membranas, com elevada variabilidade intermembranas.

Medindo  $P_{i\grave{a}o}$  relativamente aos iões  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $K^+$ , ou  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$ , numa mesma membrana, observou-se um aumento de  $P_{cati\grave{a}o}$  com o raio hidrodinâmico,  $r_{hid}$ , enquanto que  $P_{ani\grave{a}o}$  progrediu inversamente, diminuindo quando  $r_{hid}$  aumentou (Figura 2.11). Estes resultados podem ser interpretados como indicadores de que os catiões permeiam a membrana sem a sua esfera de hidratação, uma vez que  $P_{cati\grave{a}o}$  diminui quando  $r_c$  aumenta. Ao contrário, a progressão de  $P_{ani\grave{a}o}$  é compatível com a interpretação de que estes iões permeiam a membrana

acompanhados da sua esfera de hidratação. Mas, sendo assim, os resultados das membranas individuais para os cátions é oposta à observada nos estudos com cutículas de *Prunus* e de *Citrus* atrás referidos (McFarland e Berry, 1974; Tyree *et al.*, 1990b, 1991), os quais concluem pelo transporte de cátions com a sua esfera de hidratação.

Uma explicação para a diferente dependência de  $P_{\text{catião}}$  e  $P_{\text{anião}}$  relativamente a  $r_{\text{hid}}$ , no caso em que as medições são feitas numa mesma membrana, pode estar relacionada com a natureza das cargas fixas que existem na matriz de cutina. Esta possui grupos ionizáveis fixos, com um  $pK$  de cerca de 3 (Schönherr e Bukovac, 1973; Schönherr e Huber, 1977), com carga negativa ao pH a que foram realizadas as experiências (pH= 5,5). De acordo com Schönherr e Bukovac (1973), a matriz cuticular de tomate comporta-se como uma resina de troca iónica fracamente acídica e com elevada densidade de grupos ionizáveis. A capacidade deste trocador catiónico depende do pH, mas a pH constante também varia consoante o contra-íon de carga positiva presente na matriz, aumentando na série  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{Rb}^+$ . Quanto menor for  $r_c$  do contra-íon, maior a sua densidade de carga, maior a sua interacção com as cargas negativas fixas na matriz e maior a sua concentração na matriz da membrana. Assim sendo, para o mesmo gradiente de concentração, a concentração de catião na membrana nos ensaios realizados no âmbito deste trabalho, diminuirá na ordem  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ , com as respectivas implicações em  $P_{\text{catião}}$ . No caso dos aniões, não ocorre fixação de cargas na matriz, uma vez que esta é carregada negativamente, e a difusão destes iões através da cutícula dependerá das dimensões do anião hidratado. Esta observação é compatível com a hipótese de que os poros existentes na cutícula, descritos primeiro por Schönherr (1976a,b), podem permitir a difusão de espécies iónicas no seu estado hidratado, sendo a sua difusão limitada pela dimensão dos poros. Esta conclusão é também reforçada pelas evidências de que a permeabilidade cuticular a iões é influenciada positivamente pelo aumento da humidade relativa a que se expõe a cutícula (Schönherr, 2000, 2001, 2002).

Na ausência de uma clara correlação entre  $P_{\text{ião}}$  médio e  $\Delta G_{\text{hid}}^\circ$  no caso dos cátions estudados conclui-se que a permeação das membranas por estes iões não é limitada por uma eventual desidratação dos iões para sua dissolução na membrana, e posterior re-hidratação na desorção na superfície oposta da membrana, apesar de a variação de  $P_{\text{catião}}$  com  $r_c$  e  $r_{\text{hid}}$  parecer indicar o contrário. A energia livre de hidratação tem uma variação significativa e sistemática na série de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , pelo que seria de esperar que a permeância diminuísse acentuadamente com o aumento de  $\Delta G_{\text{hid}}^\circ$ , caso a travessia da cutícula envolvesse uma etapa

de desidratação do ião. Só a determinação da energia de activação para o transporte transcuticular de cationes permitiria avaliar de uma forma mais conclusiva se a desidratação do ião constitui, ou não, uma barreira energética limitante para o fluxo destes iões através da cutícula. Assim, determinou-se a energia de activação para a permeação de dois dos cationes estudados,  $H^+$  e  $Na^+$ , através de C e de MC.

A energia de activação medida para o transporte de  $H^+$  foi muito semelhante em MC e em C, e só ligeiramente inferior à encontrada para o transporte de  $Na^+$  nas mesmas membranas, mantendo-se a tendência de ser ligeiramente mais elevada em MC. Em face da elevada variabilidade encontrada em  $P_{H^+}$  e  $P_{Na^+}$  (Figuras 2.11 e 2.16), a  $E_a$  encontrada para a permeação destes iões em C e MC pode ser considerada idêntica, embora os valores obtidos sugiram uma tendência de que as membranas MC ofereçam, em média, uma maior resistência à permeação destes cationes, talvez devido a uma maior capacidade de retenção apresentada por grupos com carga negativa livres na matriz cuticular, os quais podem não estar acessíveis na cutícula devido à presença das ceras.

Os valores de  $E_a$  obtidos para o transporte de  $H^+$  e de  $Na^+$ , rondando os  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$ , são claramente inferiores aos da energia livre de desidratação do respectivo ião,  $1050 \text{ kJ mol}^{-1}$  para  $H^+$  e  $365 \text{ kJ mol}^{-1}$  para  $Na^+$  (Marcus, 1991). Como comparação, refere-se que a energia de activação associada à difusão de água em água é de  $18,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Meares, 1968), pelo que a energia necessária para o transporte transcuticular dos iões em causa se aproximou mais de valores de energia necessária para a difusão em solução aquosa do que da energia de um processo que envolvesse desidratação do ião. Assim, os resultados apontam para que o transporte de iões, tanto através de C como de MC, se processe por difusão em canais aquosos. A ausência de uma forte correlação de  $P_{i\tilde{a}o}$  com as dimensões do ião hidratado indica, ainda, que os referidos poros deverão possuir um diâmetro médio superior ao dos iões estudados no seu estado hidratado. Os resultados obtidos são compatíveis com a estimativa feita para o raio médio dos poros da matriz cuticular (Schönherr, 1976a, b), de  $0,45 \text{ nm}$ , superior ao raio da esfera de hidratação de qualquer um dos iões estudados (Tabela 2.3).

Considerando, em seguida, a permeação álcoois de baixo peso molecular, como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol, assumindo que o modelo de transporte transcuticular por dissolução e difusão se aplica para a permeação da cutícula e da sua matriz por todos os álcoois estudados, deveria ser possível aplicar a relação da Equação 2.3 à permeação das membranas C e MC por estes solutos. De

acordo com o modelo de permeação de uma membrana de dissolução,  $P_{\text{álcool}}$  deveria aumentar linearmente com o coeficiente de partição do álcool para a membrana,  $K_p$ , e com o coeficiente de difusão do álcool na membrana,  $D$ , e deveria ser inversamente proporcional ao percurso de difusão,  $\Delta x$ . Para obter uma estimativa do coeficiente de difusão para um dado álcool é necessário considerar a sua dependência da temperatura absoluta,  $T$ , e do coeficiente de fricção translacional do álcool,  $f$ , dada pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{f} \quad (2.9)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann. Para a difusão de uma molécula de geometria esférica num meio contínuo,  $f$  pode ser calculado pela equação de Stokes:

$$f = 6\pi\eta r_{\text{vdw}} \quad (2.10)$$

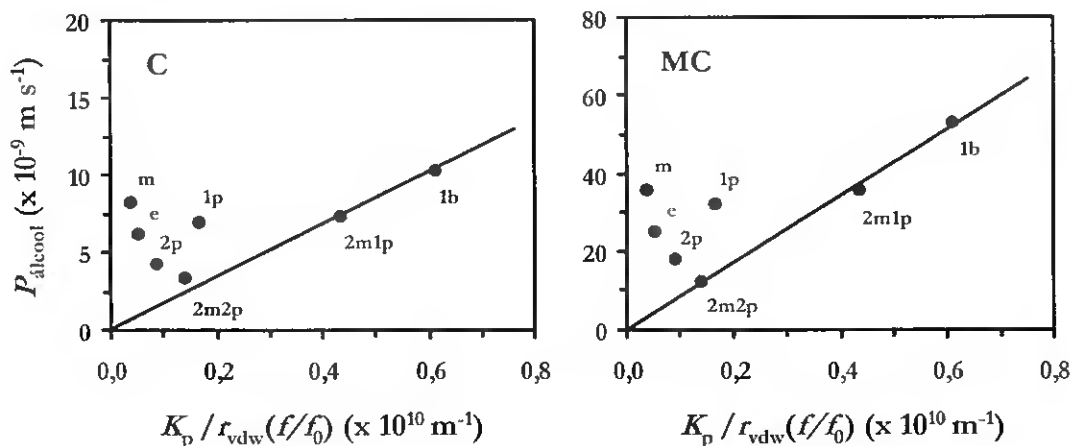
sendo  $\eta$  ( $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) a viscosidade do meio e  $r_{\text{vdw}}$  (m), o raio molecular de van der Waals. No caso de moléculas com uma geometria irregular, o cálculo do coeficiente de fricção deve ter em conta que corpos sólidos com diferente geometria exercem forças de fricção diferentes. A necessária correcção é feita multiplicando  $r_{\text{vdw}}$  pela razão entre o coeficiente de fricção de um elipsóide representativo da geometria da molécula em questão,  $f$ , e o coeficiente de fricção de uma esfera com igual volume,  $f_0$  (Edward, 1970). O factor geométrico de correcção  $f/f_0$  relativo a cada álcool pode ser consultado na Tabela 2.4. A equação de Stokes-Einstein, aplicável tanto a moléculas de forma esférica como a moléculas de forma irregular, assume, então, a forma:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_{\text{vdw}} (f/f_0)} \quad (2.11)$$

Combinando as Equações (2.3) e (2.11), obtém-se finalmente uma equação que descreve a relação entre  $P_{\text{álcool}}$  e factores relativos à membrana e ao permeante, segundo o modelo de permeação da cutícula como membrana de dissolução:

$$P_{\text{álcool}} = \frac{kTK_p}{6\pi\eta r_{\text{vdw}}(f/f_0)\Delta x} \quad (2.12)$$

De acordo com a Equação 2.12, seria de esperar um aumento linear da permeância de uma membrana em relação a um dado permeante em função do quociente  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  calculado para esse permeante, a uma temperatura constante. A representação gráfica dos valores de  $P_{\text{álcool}}$  obtidos a 20 °C para membranas C e MC (Tabela 2.4) em função de  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  dos álcoois é apresentada na Figura 2.19.



**Figura 2.19** Representação gráfica dos valores de  $P_{\text{álcool}}$ , a 20 °C (Tabela 2.4), em membranas C e MC, relativamente aos álcoois metanol (m), etanol (e), 1-propanol (1p), 2-propanol (2p), 1-butanol (1b), 2-metil-1-propanol (2m1p) e 2-metil-2-propanol (2m2p), em função de  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$ .

A correlação esperada entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$ , de acordo com o modelo de transporte numa membrana de dissolução, não foi verificada para todos os álcoois. Na Figura 2.19, pode observar-se claramente a tendência de  $P_{\text{álcool}}$  para diminuir numa série de álcoois, metanol, etanol e 2-propanol, enquanto  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  aumenta, embora ligeiramente. Por outro lado, na série que compreende os álcoois 2-metil-2-propanol, 2-metil-1-propanol e 1-butanol, na qual o

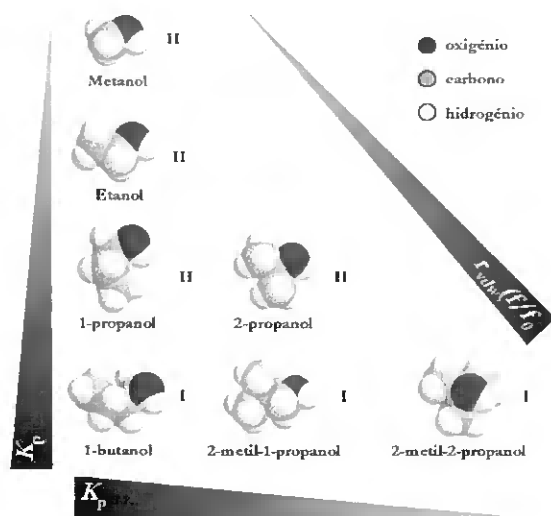
aumento de  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$  é apreciável, a tendência registada para  $P_{álcool}$  foi a esperada de acordo com a Equação 2.12, pois  $P_{álcool}$  aumentou linearmente com  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$ . A linha traçada nos gráficos da Figura 2.19 procura expressar quantitativamente a dependência de  $P_{álcool}$  e  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$  ajustada aos resultados experimentais tendo em consideração que o modelo de transporte numa membrana de dissolução prevê que um composto insolúvel na membrana não seja transportado através dela.

Membranas C e membranas MC verificaram a mesma correlação entre  $P_{álcool}$  e  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$ , se for tido em conta o efeito da extracção das ceras cuticulares no aumento da permeabilidade da membrana, que eleva os valores de  $P_{álcool}$  nas membranas MC. Também nas membranas MC, registou-se um maior aumento de  $P_{álcool}$  com  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$  na série de 2-metil-2-propanol, 2-metil-1-propanol e 1-butanol, a qual deverá reflectir alterações registadas em factores relacionados quer com viscosidade do meio onde o permeante difunde, se este for contínuo, quer com alterações na extensão do percurso de difusão, em consequência da extracção das ceras. É sabido que a remoção de ceras da cutícula reduz o grau de tortuosidade da membrana relativamente a permeantes de natureza orgânica (Baur *et al.*, 1996; Baur *et al.*, 1999a).

Enquanto que os álcoois da série 2-metil-2-propanol, 2-metil-1-propanol e 1-butanol permeiam membranas C e MC de acordo com o modelo de transporte numa membrana de dissolução, os restantes álcoois originam valores de permeância superiores ao que pode ser previsto de acordo com o mesmo modelo. Tais álcoois, metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol, estão entre os que possuem menor  $K_p$  e menor raio molecular de van der Waals,  $r_{vdw}(f/f_0)$ , na série de álcoois estudada. Para estes álcoois, a relação entre  $P_{álcool}$  e  $r_{vdw}(f/f_0)$ , em vez de  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$ , sugere que estes sejam transportados por um mecanismo de transporte mais fortemente influenciado pela dimensão molecular do permeante do que pela sua solubilidade num ambiente apolar, uma vez que  $P_{álcool}$  diminui nesta série à medida que  $r_{vdw}(f/f_0)$  aumenta. O modelo de transporte por difusão em poros existentes na membrana é um bom candidato a modelo alternativo ao modelo de dissolução na membrana pois atende a que a relação entre as dimensões do permeante e as dimensões dos poros onde ele pode difundir são fortes condicionantes ao seu transporte pois determinam a área de membrana efectivamente acessível à difusão do permeante (Equação 2.5).

Atendendo à diferença de valores de  $P_{álcool}$  experimentais e o valor que pode ser previsto pelo ajuste da Equação 2.12 aos resultados experimentais, a difusão através de poros polares

deve desempenhar um papel significativo na permeabilidade da cutícula e da sua matriz polimérica aos álcoois com menores dimensões moleculares. Provavelmente, ambos os mecanismos de transporte estão simultaneamente acessíveis, tanto em membranas C como em MC, para todos os álcoois testados, uma vez que todos são bastante solúveis em solução aquosa e possuem dimensões inferiores às que são atribuídas para os poros cuticulares, de 0,45 nm de raio (Schönherr, 1976a,b). No entanto, a contribuição de cada mecanismo de transporte para a permeância total da membrana será uma função da energia requerida para cada processo, no caso de cada permeante. Classificando os álcoois consoante o mecanismo de permeação que melhor explica os factores que condicionam o seu transporte, procurou-se representar esquematicamente, na Figura 2.20, a variação de  $K_p$  e de  $r_{vdw}(f/f_0)$  para a série de álcoois estudados, classificando, no Grupo I, os que mais facilmente se dissolvem na membrana (1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol) e, no Grupo II, os álcoois que mais facilmente difundem por poros polares (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol).



**Figura 2.20.** Representação da variação de  $K_p$  e de  $r_{vdw}(f/f_0)$  para a série de álcoois estudados, classificados em dois grupos de permeantes, Grupo I e Grupo II, consoante as suas características de transporte na cutícula e sua matriz se adequaram melhor ao modelo de membrana de dissolução ou de membrana porosa, respectivamente (ver texto).

A determinação da energia de activação para o transporte dos álcoois, classificados agora no Grupo I e no Grupo II, constituirá uma fonte de informação adicional para elucidar melhor a questão do mecanismo de transporte envolvido em cada caso, pelo que se examinou a variação de  $P_{álcool}$  com a temperatura para todos os álcoois estudados, em membranas C e MC. Os resultados mostraram claramente que a energia de activação para o transporte de um dado álcool em membranas C foi superior ao que foi registado em membranas MC.

A energia de activação para o transporte dos álcoois do Grupo I em membranas C e MC aumentou ligeiramente na ordem de 1-butanol < 2-metil-1-propanol < 2-metil-2-propanol. Considerando que estes álcoois são transportados por dissolução na membrana, a  $E_a$  necessária para o seu transporte tem a contribuição da energia necessária à dissolução e à difusão do álcool na membrana. Sabe-se que a variação de energia livre para a partição de ácidos carboxílicos, de dois a seis átomos de carbono, entre um meio aquoso e um meio hidrofóbico aumenta cerca de  $4 \text{ kJ mol}^{-1}$  por cada grupo  $-\text{CH}_2$  adicionado (Walter e Gutknecht, 1984), sendo de esperar que esse incremento seja semelhante para o caso dos álcoois estudados. Os álcoois do Grupo I não diferem em composição atómica, mas apresentam diferenças quanto à distribuição espacial dos seus átomos que se reflectem na sua solubilidade na membrana, pelo que é de esperar um ligeiro aumento  $E_a$  dentro da série, desde 1-butanol, o que particiona mais para o meio membranar, até 2-metil-2-propanol, o que particiona menos. Quanto à energia livre de difusão, tendo em conta que os principais componentes da cutícula, tanto a sua matriz de cutina como as suas ceras, são hidrocarbonetos de cadeia longa, pode entender-se que a difusão dos permeantes através destes componentes envolva em deslocamento por reptação entre as cadeias do polímero. Uma vez que a presença e a posição do grupo metilo substituinte determina um aumento do diâmetro efectivo da molécula de 1-butanol, a 2-metil-1-propanol, e a 2-metil-2-propanol, compreende-se que a energia necessária à difusão do álcool na membrana aumente na mesma ordem. Assim, é de esperar que a energia de activação para o transporte destes álcoois em C e em MC aumente na medida em que a sua solubilidade, expressa em  $K_p$ , diminua e na medida em que a sua dimensão molecular, expressa em  $r_{vdw}(f/f_0)$ , aumente, embora ligeiramente, tal como foi verificado (Tabela 2.5).

O transporte dos álcoois com menor  $K_p$  e menor  $r_{vdw}(f/f_0)$ , os classificados no Grupo II de álcoois permeantes, foi claramente influenciada pelas dimensões moleculares do permeante. O modelo de transporte através de uma membrana porosa (Equação 2.5), prevê que  $P_{\text{álcool}}$  diminua na medida em que o coeficiente de difusão do permeante nos poros,  $D$ , diminua e também na medida em que a área efectiva de membrana disponível ao transporte por poros  $A_p/A_m$  também diminua. Esta relação reforça a dependência de  $P_{\text{álcool}}$  relativamente a  $r_{vdw}(f/f_0)$  do permeante na medida em que  $A_p/A_m$  é função das dimensões relativas dos poros e do próprio permeante. Para solutos com dimensões bastante superiores às do diâmetro médio dos poros,  $A_p/A_m$  e  $D$  poderão ser, efectivamente, bastante reduzidas. No caso dos álcoois estudados,  $r_{vdw}(f/f_0)$  foi sempre inferior ao raio médio que foi estimado para os poros da matriz

cuticular (Schönherr, 1976a, b), de cerca de 0,45 nm (Tabela 2.4). O aumento de resistência à passagem do permeante pelos poros deverá reflectir-se num aumento de energia de activação para o transporte através da membrana em função de  $r_{vdw}(f/f_0)$ , o que de facto se verificou.

Em conclusão, tanto a matriz de cutina como a cutícula apresentam potencialidades para o transporte de solutos por dissolução na membrana e por difusão em poros polares, ao que tudo indica, hidratados. O poliéster de cutina da matriz cuticular possui uma estrutura e composição bastante diferentes da das ceras cuticulares, acumulando características de membrana hidrofóbica e de trocador cationico, disponibilizando uma rede de poros hidratados que se expande ao longo de toda a membrana. A extracção das ceras da cutícula determina um aumento da permeância da membrana, tanto no que diz respeito a permeantes cujas características de transporte sugere que são transportados por dissolução na membrana como para solutos cujos resultados apontam como sendo transportados por difusão nos poros polares presentes nas membranas estudadas.

Muito falta elucidar acerca da cutícula como membrana porosa, nomeadamente quanto à sua especificidade e limitações, qual a organização estrutural ou a extensão das estruturas que delimitam os poros. Encontra-se por esclarecer, também, como se fará a continuidade deste tipo de transporte na zona mais exterior da cutícula, onde se concentram as ceras cuticulares, a principal barreira à difusão através desta membrana.

Seguindo uma breve introdução ao comportamento de fases de extractos de ceras cuticulares, apresentam-se as características do polimorfismo de *n*-álcoois, com particular atenção para 1-tetradecanol e 1-octadecanol, os componentes de uma mistura binária escolhida como modelo para o comportamento de fases de uma mistura de ceras cuticulares. Caracteriza-se o comportamento termotrópico da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol) e obtém-se o diagrama de fases para o equilíbrio sólido-líquido deste sistema, utilizando as técnicas de calorimetria diferencial de varrimento e de espectroscopia vibracional com transformada de Fourier. Discute-se o comportamento de fases da mistura de álcoois estudada no contexto do objectivo de simular o equilíbrio de fases de uma mistura de ceras natural.

---

# Capítulo 3

## Comportamento de Fases de uma Mistura Modelo para as Ceras da Cutícula Vegetal

### 3.1 A Barreira de Ceras Cuticulares

Como compostos puros, as ceras cuticulares constituem sistemas homogéneos, cristalinos à pressão atmosférica e temperatura ambiente. No entanto, considerando a complexidade dos extractos de ceras cuticulares em termos qualitativos, não é de esperar que estes sejam sistemas homogéneos. Pelo contrário, é provável que as ceras cuticulares constituam um meio heterogéneo, no qual os vários componentes se encontrem em diferentes fases e mesmo em diferentes estados físicos.

No modelo actualmente aceite para a organização molecular das ceras cuticulares, entende-se que estas constituem um cumulativo de regiões de fases cristalinas, altamente ordenadas, e de regiões de fases fluidas (também referidas como desordenadas) nas quais não existe um ordenamento sistemático de cadeias hidrocarbonadas (Reynhardt e Riederer, 1991). Procurando elucidar a estrutura e dinâmica molecular de extractos de ceras cuticulares com composições bastante diferentes, vários estudos apontam para que a coexistência de fases fluidas e fases cristalinas seja uma regra neste tipo de misturas, pelo menos numa gama de temperaturas com relevância para estes sistemas biológicos (Basson e Reynhardt, 1988; Reynhardt e Riederer, 1994; Schreiber *et al.*, 1997; Merk *et al.*, 1998; Casado e Heredia, 1999).

Qualquer soluto que permeie a cutícula tem de transpor a barreira de ceras cuticulares. As fases cristalinas aí existentes são consideradas inacessíveis para a permeação, uma vez que o seu elevado ordenamento e grau de empacotamento molecular tornam a difusão de solutos através delas num processo altamente dispendioso do ponto de vista energético. O transporte de solutos através da cutícula deve, pois, ocorrer por difusão através das fases fluidas, menos ordenadas. Considerando que uma parte significativa do volume da barreira cerosa pode não estar disponível para a permeação de solutos, pode-se antecipar que as propriedades de transporte deste tipo de sistemas devem ser bastante dependentes das propriedades de percolação dessas fases fluidas e, logo, de factores como a composição em ceras e a temperatura.

As propriedades de barreira da cutícula, pelo menos no que diz respeito à permeação de compostos orgânicos e de água, são determinadas em grande parte pela presença das ceras cuticulares. A comparação de coeficientes de difusão de vários compostos orgânicos em cutículas de diferentes proveniências demonstrou que estas apresentam diferenças significativas em tortuosidade relativamente à difusão de compostos orgânicos (Schönherr e Baur, 1994; Buckholz *et al.*, 1998), sendo esta relacionada com a composição do respectivo extracto de ceras cuticulares (Schreiber e Schönherr, 1993; Schreiber *et al.*, 1996b). Observa-se, ainda, uma excelente correlação entre a permeabilidade de cutículas à água e a difusão de compostos orgânicos nos respectivos extractos de ceras cuticulares (Schreiber e Riederer, 1996a; Niedler *et al.*, 1998).

Apesar de o comportamento de fases das ceras cuticulares ser, certamente, de extrema importância para as propriedades de barreira da cutícula, não é do nosso conhecimento que se tenha realizado nenhum estudo sistemático que substancie esta hipótese. O conceito de que o

comportamento de fases da camada cerosa tem implicações significativas na permeabilidade da cutícula não é, no entanto, novo. Podem apontar-se vários exemplos de trabalhos com os quais se procurou uma correlação entre composição de ceras e propriedades de transporte da cutícula (Haas e Schönherr, 1979; Geyer e Schönherr, 1990; Riederer e Schneider, 1990; Schreiber e Riederer, 1996a), não se tendo encontrado, contudo, essa correlação.

De modo a compreender a permeação cuticular em função do comportamento de fases das ceras, é necessário, em primeiro lugar, conhecer esse mesmo comportamento de fases. Para se conhecer o estado físico de uma mistura em função da sua composição e de factores como pressão e temperatura, deve ser estabelecido o seu diagrama de fases. No entanto, pode facilmente compreender-se que seria impossível obter tal diagrama para misturas com a complexidade da dos extractos naturais de ceras cuticulares. No entanto, diagramas de fases de misturas binárias são muito mais simples de obter e são frequentemente estudados como modelos representativos do comportamento de fases de misturas mais complexas. Um exemplo é o estudo de misturas simplificadas de fosfolípidos como modelos da bicamada lipídica de células (Lee, 1977). Nesta perspectiva, seria importante, além de interessante, estabelecer o diagrama de fases para o equilíbrio sólido-líquido de uma mistura binária de ceras que possa ser utilizada como modelo de interpretação do comportamento de fases de misturas de ceras cuticulares.

### 3.1.1 Sistema modelo de ceras cuticulares

Numa interpretação simples, a cutícula vegetal pode ser vista como sendo constituída por uma matriz polimérica de cutina, um poliéster de ácidos gordos polihidroxilados, na qual se encontram depositadas ceras, compostos alifáticos de elevado peso molecular. É nossa intenção desenvolver um sistema modelo para a cutícula vegetal, promovendo a substituição das ceras de uma cutícula natural por uma mistura de ceras de comportamento de fases bem caracterizado, mantendo a matriz de cutina de proveniência natural. Esta membrana constituirá um modelo simplificado da cutícula vegetal, o qual pode ser utilizado em estudos sistemáticos de permeabilidade cuticular em função do comportamento de fases da camada cerosa. O comportamento de fases do sistema de ceras modelo deverá aproximar-se o mais possível do de uma mistura de ceras natural, reflectindo tanto quanto possível o complexo comportamento de fases de misturas de ceras naturais. Este passa por coexistência de fases em larga gama de temperaturas e polimorfismo do estado sólido (Reynhardt e Riederer, 1991;

1994; Schreiber *et al.*, 1997; Merk *et al.*, 1998; Casado e Heredia, 1999). Além disso, a escolha desta mistura terá de ter em consideração algumas razões de ordem prática relacionadas com a manipulação do sistema modelo em condições laboratoriais.

Na perspectiva de desenvolver o sistema modelo, elegeu-se como mistura de ceras simplificada uma mistura de dois álcoois primários de cadeia longa, 1-tetradecanol e 1-octadecanol. Estes, sendo *n*-álcoois de cadeia longa, possuem polimorfismo do estado sólido (Watanabe, 1961), semelhante ao observado em *n*-alcanos de cadeia longa (McClure, 1968) e em misturas de *n*-alcanos (Oonk, 1998). Na escolha da mistura também se teve em consideração que esta deveria apresentar um equilíbrio sólido-líquido em condições de temperatura facilmente acessíveis em laboratório e de relevância para os sistemas biológicos em causa.

Às razões anteriores para a escolha da mistura de 1-tetradecanol e 1-octadecanol como modelo da camada de ceras epicuticulares, juntou-se, ainda, a observação de que álcoois primários de cadeia longa são frequentemente identificados como componentes maioritários de extractos naturais de ceras cuticulares de várias espécies, nomeadamente de plantas nativas de regiões de fracos recursos hídricos, como *Citrus aurantium* L. (laranjeira) (Reynhardt e Riederer, 1991), *Fagus sylvatica* L. (faia) e *Hordeum vulgare* L. (trigo) (Reynhardt e Riederer, 1994) e espécies do género *Quercus* (sobreiro e azinheira) (Martins *et al.*, 1999), o que torna o conhecimento do comportamento de fases de misturas deste tipo de componentes, por si só, bastante interessante.

### 3.1.2 Polimorfismo de *n*-álcoois

O polimorfismo de álcoois primários de cadeia longa (com mais de 12 átomos de carbono) tem sido extensivamente estudado com o auxílio de técnicas tão variadas como cristalografia de raios X, medição de propriedades dieléctricas ou análise calorimétrica (Watanabe, 1961; Pradhan *et al.*, 1970; Mosselman *et al.*, 1974; Kuchhal *et al.*, 1979).

O comportamento de fases de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol, bem como de outros elementos da série de álcoois primários de cadeia longa, é bastante complexo. A informação compilada sobre esta matéria é extensa e nem sempre concordante, uma vez que o comportamento polimórfico pode ser bastante afectado pelo grau de pureza dos compostos e pela sua história térmica (Watanabe, 1961; Mosselman *et al.*, 1974). No entanto, a descrição do

comportamento termotrópico apresentada por Watanabe (1961) relativamente a 1-tetradecanol e a 1-octadecanol é consistente com literatura mais recente sobre o assunto (Domanska e Gonzalez, 1997), pelo que dela se compilou uma breve descrição do comportamento de fases destes compostos, a qual se apresenta em seguida.

Durante a cristalização de 1-tetradecanol ou de 1-octadecanol, uma fase líquida origina uma fase sólida designada por fase  $\alpha$ , na qual as moléculas se organizam perpendicularmente ao plano definido pelos extremos das cadeias hidrocarbonadas. Neste sólido, as moléculas possuem liberdade rotacional em torno do seu eixo longitudinal, de modo que este é frequentemente denominado de sólido rotacional. Por arrefecimento da fase  $\alpha$ , observa-se o aparecimento gradual de uma outra fase sólida, não rotacional e mais estável. No caso de álcoois com número par de átomos de carbono igual ou inferior a 16, como é o caso de 1-tetradecanol, a fase formada é designada por fase  $\beta$  e corresponde a um sólido com um empacotamento cristalino ortorrômbico. Esta fase é distinta de uma outra fase sólida não rotacional, designada por fase  $\gamma$ , caracterizada por apresentar uma distância entre os planos definidos pelos extremos das cadeias hidrocarbonadas menor do que a fase  $\beta$  em resultado do empacotamento das moléculas segundo um plano inclinado relativamente aos planos definidos pelos seus extremos. A fase  $\gamma$  é também observada em 1-tetradecanol por arrefecimento da fase  $\beta$  e, em álcoois com comprimentos de cadeia igual ou superior a 1-octadecanol, é formada por arrefecimento da fase  $\alpha$ .

Em *n*-alcanos de cadeia longa, observam-se transformações análogas para os elementos da série com o mesmo número de átomos de carbono, correspondendo a fase  $\alpha$  a um sólido rotacional com empacotamento cristalino hexagonal, a fase  $\beta$  a um sólido não rotacional ortorrômbico, e a fase  $\gamma$  a um sólido monoclinico ou triclinico, consoante o tamanho da cadeia (McClure, 1968).

Tanto em álcoois como em alcanos de cadeia longa, a transição rotacional é difícil de detectar durante o aquecimento e o sólido rotacional é observado como metaestável (Watanabe, 1961; McClure, 1968). Contudo, existem indicações de que a fase sólida rotacional pode ser estabilizada cinética e termodinamicamente pela presença de impurezas (Mosselman *et al.*, 1974).

## 3.2 Objectivo do Trabalho

Com o trabalho desenvolvido no âmbito deste capítulo, pretendeu-se caracterizar o comportamento de fases da mistura binária composta pelos álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol, estabelecendo o diagrama de fases para o equilíbrio sólido-líquido desta mistura, à pressão atmosférica. Uma avaliação preliminar do comportamento termotrópico da mistura destes dois álcoois por calorimetria diferencial de varrimento indicou que o sistema apresentava, provavelmente, algum grau de imiscibilidade no estado sólido, o que colocou a hipótese de se poder registar polimorfismo do estado sólido na mistura, à semelhança do que é descrito para os compostos puros. De modo a obter uma informação mais detalhada relativamente ao tipo de fases sólidas observadas em função da temperatura, recorreu-se a estudos de espectroscopia vibracional.

No início deste estudo, foi efectuada, também, uma caracterização do comportamento de fases dos dois álcoois no estado puro. Apesar de este estudo ter já sido realizado e se encontrar bem documentado na literatura, a reprodutibilidade do comportamento de fases dos álcoois puros nas mesmas condições experimentais utilizadas no estudo do sistema binário por eles composto foi julgada importante para a validação das mesmas.

## 3.3 Métodos e Técnicas

### 3.3.1 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento, em abreviatura DSC<sup>10</sup>, envolve a medição de variação de calor associado a processos químicos ou físicos. A sua utilização baseia-se na medição de um diferencial de calor entre uma amostra em estudo e uma referência, ao mesmo tempo que se aplica um programa de variação de temperatura. Esta medição pode ser feita directamente, utilizando o tipo de aparelhos de DSC de compensação de energia, ou indirectamente, com aparelhos de DSC de fluxo de calor. No primeiro caso, é medida a

---

<sup>10</sup> Do Inglês: *Differential Scanning Calorimetry*.

energia eléctrica necessária para efectuar um ajuste automático e contínuo da temperatura da amostra e da referência, de modo a mantê-las à mesma temperatura; no segundo caso, é medida a diferença de temperatura entre a amostra e a referência por intermédio de uma resistência térmica, convertendo-se essa diferença, posteriormente, em fluxo de calor. Em ambos os casos, obtém-se o registo do fluxo de calor em função da temperatura (ou do tempo, uma vez que a temperatura é variada a uma velocidade constante),  $\delta Q/\delta T$ , o qual é designado por termograma.

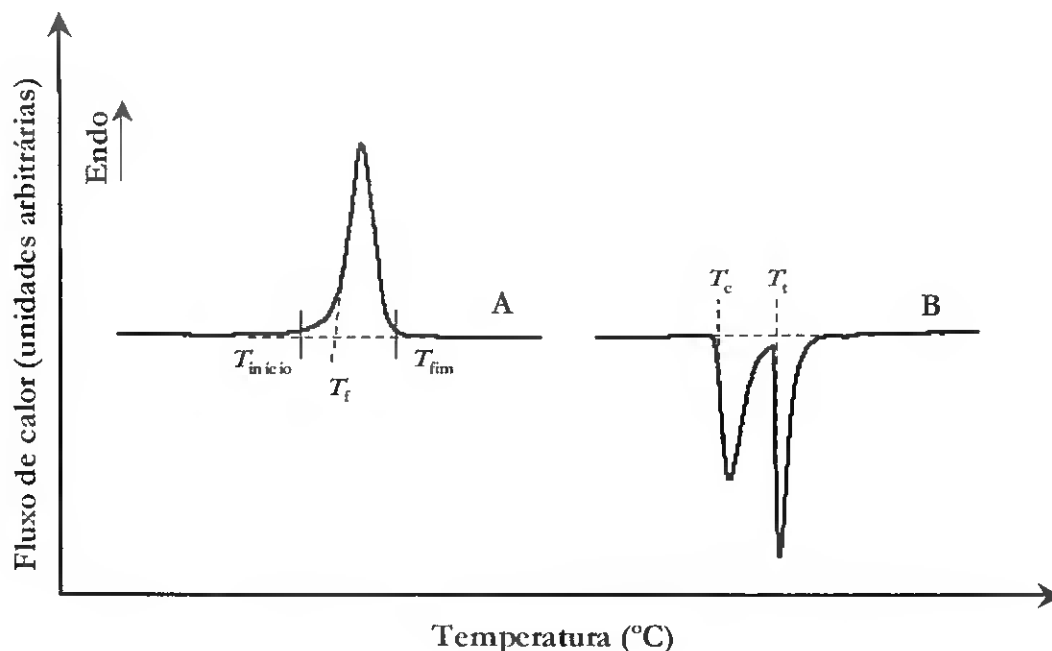
Processos de primeira ordem, como fusão, cristalização ou transições entre estados sólidos, originam um pico de fluxo de calor em função da temperatura. O respectivo integral corresponde à energia ou entalpia do processo,  $\Delta H$ . Em ciclos de aquecimento, são registados frequentemente processos endotérmicos, como fusão, sublimação ou transições entre sólidos enantiotrópicos. Uma vez que estes processos necessitam de energia, são representados convencionalmente por um fluxo de calor positivo. Por sua vez, em ciclos de arrefecimento registam-se frequentemente processos exotérmicos, representados por um fluxo de calor de sinal negativo, dos quais são exemplo processos de cristalização ou reacções de decomposição (Threlfall, 1995).

A temperatura à qual se regista um máximo de fluxo de calor, vulgarmente designada por  $T_m$ , pode ser utilizada para caracterizar a transição observada. No entanto, o seu valor depende muito do instrumento e das condições em que é efectuada a medição (Giron, 1990), pelo que se obtêm resultados mais reproduzíveis tomando como referência a temperatura de início de transição. Esta pode ser obtida do termograma por extrapolação, prolongando o ombro do pico de fluxo de calor sobre a linha de base, conforme se exemplifica na Figura 3.1.

Transições de segunda ordem, como é o caso de transições vítreas registadas em polímeros, são observadas por DSC como uma alteração da posição da linha de base, correspondente à variação de capacidade calorífica da amostra,  $\Delta C_p$ , em consequência da transição. Neste caso, a temperatura de transição corresponde ao ponto de inflexão da transição registada no termograma.

A informação obtida por DSC, nomeadamente no que diz respeito a temperaturas e entalpias de transição, pode ser utilizada na construção de diagramas de fase. Este tipo de estudos calorimétricos é, também, muito utilizado na identificação e caracterização de diversos compostos com diversas aplicações farmacológicas (Giron, 1990).

Uma revisão acerca dos múltiplos aspectos a considerar para a execução experimental de estudos de DSC pode ser consultada em Boerio-Goates e Callanan (1992).



**Figura 3.1.** Termograma típico ilustrando a transição endotérmica (A) e as duas transições exotérmicas (B), registadas durante a fusão e a cristalização de 1-tetradecanol, respectivamente. As temperaturas de fusão,  $T_f$ , de cristalização,  $T_c$ , e de transição,  $T_t$ , podem ser obtidas por extrapolação da linha do ombro do pico de fluxo de calor sobre a linha de base.  $T_{início}$  e  $T_{fim}$  indicam as temperaturas de início e fim de uma dada transição.

### 3.3.2 Espectroscopia vibracional com transformada de Fourier

Os diferentes estados físicos são caracterizados por diferentes interações moleculares, as quais se traduzem em distintas energias para os modos vibracionais registados. As transições entre diferentes níveis de energia vibracional traduzem-se em absorção ou emissão de energia de frequência entre  $3 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{14}$  Hz, na região de radiação infravermelha do espectro luminoso (Straughan e Walker, 1976). A espectroscopia de infravermelho ocupa-se, pois, do estudo destes fenómenos e pode ser aplicada na identificação de compostos ou na detecção de determinados grupos funcionais em compostos. Tem sido, também, muito utilizada em estudos de estrutura molecular, nomeadamente na caracterização do comportamento de fases de compostos puros e de suas misturas.

As transições entre estados vibracionais correspondem a alterações do momento dipolar da molécula em resultado de um deslocamento temporário do seu centro de distribuição de densidade electrónica. Para uma molécula composta por  $n$  átomos, são possíveis  $3n-5$  modos fundamentais de vibração, correspondentes a elongação e deformação angular das suas ligações covalentes. Contribuem, ainda, para o espectro vibracional, as combinações resultantes da adição ou subtracção de modos de vibração fundamentais correspondentes ao acoplamento de modos vibracionais (Straughan e Walker, 1976).

Os clássicos espectrómetros de infravermelho são utilizados em medições de absorção ou emissão de radiação de número de onda (o inverso do comprimento de onda) entre  $4000$  e  $200\text{ cm}^{-1}$ . Um aparelho utilizado para estas medições é composto fundamentalmente por uma fonte de radiação, um monocromador para a escolha de uma gama limitada de número de onda, um detector de radiação que transforma o sinal luminoso em sinal eléctrico, um amplificador e respectivo registador.

Espectrómetros de duplo feixe, ou interferómetros de Michelson, permitem a obtenção de espectros com uma maior sensibilidade e resolução, bem como uma maior velocidade de aquisição de dados. Neste tipo de aparelho, a radiação emitida pela fonte de radiação é dividida em dois feixes cujo percurso óptico é diferente e é variado de modo a produzir um padrão de interferências construtivas e destrutivas que vão irradiar a amostra. A radiação não absorvida, transmitida para o detector, é composta pela mesma gama de frequências da luz incidente e resulta num registo do sinal em função da diferença de percurso óptico entre os dois feixes, denominado interferograma. O valor de intensidade de luz absorvida, ou transmitida, correspondente a cada componente (número de onda) da radiação incidente obtém-se por cálculo computacional da transformada de Fourier do interferograma (Straughan e Walker, 1976). Esta técnica é, por isso, conhecida como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, em abreviatura FTIR<sup>11</sup>.

O espectro vibracional de vários compostos orgânicos, incluindo o de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol, pode encontrar-se numa compilação editada pela *Sadtler Research Laboratories, Inc.* (Simons, 1978). O comportamento de fases destes álcoois, bem como de misturas binárias dos dois, foi interpretado com base na descrição detalhada do espectro vibracional das várias

---

<sup>11</sup> Do Inglês: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*.

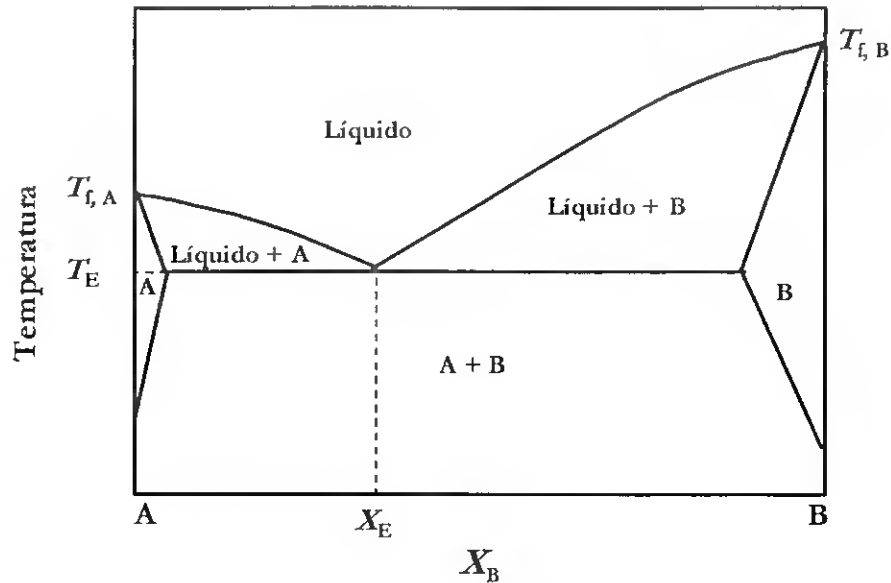
fases sólidas observadas para *n*-alcanos (Casal *et al.*, 1982; 1983) e da aplicação desta informação no estudo do comportamento de fases de lípidos puros e de suas misturas (Casal *et al.*, 1984).

### 3.3.3 Características de um sistema eutético

As condições de equilíbrio de um sistema termodinâmico são completamente especificadas quando se conhece a sua composição de fases, pressão e temperatura, conforme enunciado por Gibbs na denominada *regra das fases*. O número de graus de liberdade,  $N$ , de um sistema é definido pelo número de variáveis independentes que precisam de ser fixadas para que o sistema seja completamente caracterizado e consiste simplesmente na diferença entre o número de variáveis independentes associadas ao sistema e o número de equações independentes que podem ser escritas relacionando essas variáveis.

Um sistema de  $C$  componentes possui  $(C-1)$  frações molares independentes para cada fase e, considerando  $F$  o número de fases, um total de  $(C-1)F$  variáveis de composição. Sendo a temperatura e a pressão também variáveis, o sistema possui  $(C-1)F+2$  variáveis independentes. O número de equações de equilíbrio de fases independentes para cada componente é dado por  $(F-1)C$ . Subtraindo o número de equações independentes ao número de variáveis independentes, obtém-se  $N = C - F + 2$ . Para um determinado número de componentes, um aumento do número de fases se traduz numa diminuição do número de graus de liberdade. Assim, para o caso particular de sistemas polimórficos onde se observam várias fases sólidas, a limitação de número de graus de liberdade do sistema descrita pela regra das fases pode ser utilizada para uma melhor compreensão do equilíbrio de fases do sistema (Brittain, 1999).

Mesmo as misturas mais simples de *n*-alcanos e seus derivados são sistemas nos quais se observa frequentemente imiscibilidade completa ou parcial de fases sólidas, bastando para isso que a diferença de tamanho das cadeias hidrocarbonadas seja igual ou superior a dois átomos de carbono (Lee, 1977; Oonk, 1998). Este tipo de sistemas é caracterizado frequentemente por diagramas de fase do tipo eutético. O diagrama de fases do sistema eutético representado na Figura 3.2 é tipicamente obtido para sistemas em que se observa uma imiscibilidade parcial dos dois componentes no estado sólido e miscibilidade total no estado líquido.



**Figura 3.2.** Diagrama de fases eutético obtido para um sistema binário com imiscibilidade parcial dos componentes, A e B, cujas temperaturas de fusão são representadas por  $T_{f,A}$  e  $T_{f,B}$ , respectivamente. A temperatura eutética,  $T_E$ , e a composição (fracção molar) eutética,  $X_E$ , definem o ponto eutético do diagrama de fases.

Nos sistemas eutéticos, enquanto que os componentes puros fundem a uma temperatura característica,  $T_f$ , a sua mistura apresenta uma gama de temperaturas de fusão bastante alargada, ao longo da qual se encontram em equilíbrio uma fase líquida e uma fase sólida cujas composições variam com a temperatura. Para a maior parte das possíveis composições de mistura, o início da fusão ocorre à temperatura eutética,  $T_E$ , que caracteriza o sistema. A esta temperatura, inicia-se a fusão de uma fase sólida e surge uma fase líquida de composição eutética,  $X_E$ . No ponto eutético, definido por  $T_E$  e  $X_E$ , a fase líquida de composição eutética está em equilíbrio com duas fases sólidas de composição definida pelo diagrama. A temperaturas inferiores a  $T_E$ , obtém-se uma mistura mecânica de dois sólidos, com uma composição relativa de fases determinada pela composição do sistema. Neste tipo de diagramas, identificam-se duas regiões de coexistência de fases sólida e líquida, delimitadas superiormente pela linha de *liquidus*, acima da qual só a fase líquida é estável, e inferiormente pela linha de *solidus*, abaixo da qual só existem fases sólidas.

## 3.4 Execução Experimental

### 3.4.1 Reagentes

Os álcoois 1-dodecanol, 1-tetradecanol, 1-hexadecanol, 1-octadecanol e 1-docosanol (grau analítico) foram adquiridos a *Sigma-Aldrich* (Madrid, Espanha). O grau de pureza dos álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol foi verificado por cromatografia gasosa, num cromatógrafo *Crompack* CP 2001 (*Varian Inc.*, Palo Alto, USA) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna *Crompack* CP SilSCB, utilizando N<sub>2</sub> como gás de arrasto a uma pressão de 20 kPa e aquecimento da coluna entre 100 °C e 300 °C a uma velocidade de 10 °C min<sup>-1</sup>. Para a análise cromatográfica, os álcoois foram previamente sujeitos a acetilação. Para esse efeito, cerca de 7 mg de álcool ( $\pm 0,1$  mg, balança *Mettler*) foram dissolvidos em 0,2 ml de clorofórmio (grau analítico) e a esta solução foram adicionados 0,4 ml de reagente de acetilação, uma solução de anidrido acético (98%, grau analítico) e piridina (grau analítico) 5:1 (v/v). A reacção de acetilação decorreu na ausência de luz, à temperatura ambiente, durante um período de 16 horas. O reagente de acetilação foi completamente removido por evaporação sob um jacto de Argon com aquecimento a 40 °C, após o que as amostras foram dissolvidas em clorofórmio (grau analítico) e analisadas. O grau de pureza encontrado para 1-tetradecanol foi de 99,3% e para 1-octadecanol foi de 99,6%.

Os álcoois perdeuterados, 1-tetradecanol-D<sub>20</sub> (98%) e 1-octadecanol-D<sub>37</sub> (98%) foram adquiridos a *Larodan Fine Chemicals* (Malmö, Suécia) e utilizados sem purificação adicional.

### 3.4.2 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

As experiências de DSC foram realizadas num aparelho de marca *Setaram* DSC121 (Caluire, França), sujeitando as câmaras de referência e de amostra a um fluxo de Argon de 1 l h<sup>-1</sup>. O aparelho foi calibrado regularmente utilizando Índio 99,999% (*PerkinElmer*, Shelton, CT, USA) como referência (temperatura de fusão 156,4 °C e entalpia de fusão 3,26 kJ mol<sup>-1</sup>). A velocidade de varrimento utilizada na calibração do aparelho foi de 1 °C min<sup>-1</sup>.

Para a preparação das amostras, os componentes sólidos foram pesados ( $\pm 0,01$  mg, balança *Mettler*) para o interior de cadinhos de alumínio (*Setaram* Ref. 08/12725), não

excedendo 7 mg no total de massa da amostra. Os cadinhos foram selados com coberturas de alumínio (*Setaram* Ref. 08/HBB 37409). As misturas de 1-tetradecanol e 1-octadecanol foram preparadas directamente no cadinho de alumínio. Para o efeito, os álcoois, sólidos à temperatura ambiente, foram pesados para o cadinho e depois cuidadosamente pulverizados com a ajuda de um fino fio de arame antes da selagem do cadinho, de modo a facilitar a sua mistura homogénea.

No início da análise calorimétrica, as amostras foram aquecidas até à temperatura de 100 °C, a uma velocidade de 2 °C min<sup>-1</sup> e equilibradas a esta temperatura durante um período de cinco minutos. Seguidamente, procedeu-se ao arrefecimento da amostra, até à temperatura requerida para o início do programa de temperatura, a uma velocidade de 1 °C min<sup>-1</sup>. O arrefecimento a temperatura inferior à temperatura ambiente foi controlado promovendo a passagem de um fluxo de N<sub>2</sub> gasoso pelo circuito de refrigeração da câmara térmica do calorímetro. O fluxo de vapor de N<sub>2</sub> foi canalizado a partir de um contentor de N<sub>2</sub> líquido, sendo controlado com o auxílio de uma resistência activada de modo a manter constante a pressão de vapor no interior do contentor.

As amostras foram sujeitas a três ciclos de aquecimento e arrefecimento a uma velocidade de varrimento de temperatura de 1 °C min<sup>-1</sup>, excepto quando se especifique outra. Em geral, os termogramas obtidos no segundo e terceiro ciclos de aquecimento e arrefecimento eram idênticos. O terceiro ciclo de varrimento de temperatura foi o considerado para o estudo do comportamento termotrópico das amostras, dele se obtendo os valores de temperatura de início de transição e de entalpia relativos às transições registadas. As entalpias de transição foram obtidas por integração da área dos picos dos termogramas, utilizando o software fornecido com o equipamento (*Setaram*). A temperatura de fusão,  $T_b$ , de cristalização,  $T_c$ , e de transição polimórfica,  $T_p$ , dos álcoois puros correspondem à temperatura de início da respectiva transição e foram obtidas por extrapolação, prolongando a linha tangente ao ombro do respectivo pico de fluxo de calor sobre a linha de base do termograma (Figura 3.1). As temperaturas de início e fim de transição correspondem, respectivamente, às temperaturas de partida e regresso à linha de base do traço de fluxo de calor registado no termograma (Figura 3.1).

Para verificação da reprodutibilidade do método, amostras dos álcoois puros e de algumas misturas seleccionadas ( $X_{18} = 0,05, 0,15, 0,31, 0,56$ ) foram analisadas em triplicado. Nos termogramas obtidos para estas amostras, obtiveram-se desvios médios de  $\pm 0,4$  °C para

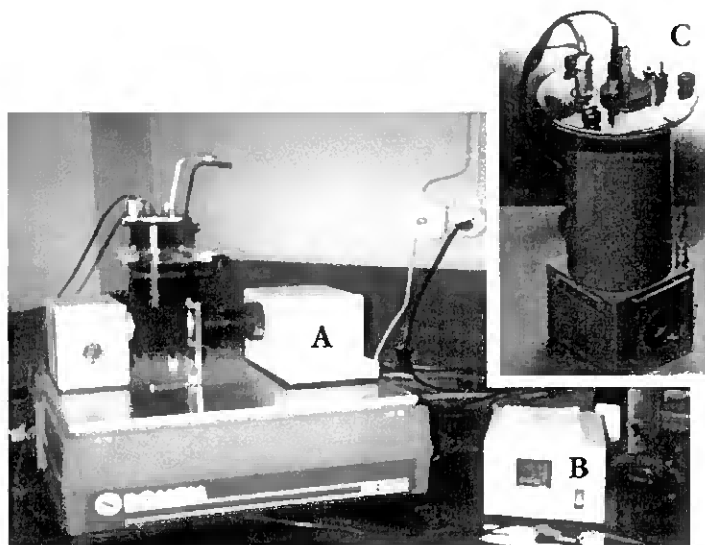
as temperaturas de início e fim de transição e de  $\pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o valor da entalpia total dos processos endotérmicos ou exotérmicos.

### 3.4.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção de infravermelho foram adquiridos num espectrómetro de infravermelho do tipo interferómetro de Michelson, marca *Bomem* MB 104 (Quebec, Canadá), equipado com um detector DTGS (sulfato de triglicina deuterado) e um divisor de feixe de Zn/Se. A resolução utilizada foi de  $4 \text{ cm}^{-1}$  para uma acumulação de 16 interferogramas, entre 500 e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . O registo e o tratamento dos espectros foi efectuado com o programa *Win Bomem*, versão 3.5. A amostra foi colocada numa célula de variação de temperatura (*Specac*, Inglaterra). A temperatura da amostra foi controlada, utilizando um termopar ligado a um controlador de temperatura *Red Lion Controls* T48. Na Figura 3.3 pode observar-se o conjunto de equipamento utilizado.

As amostras foram colocadas entre duas janelas de KBr de 0,5 cm de espessura. Para a preparação das amostras dos álcoois puros, as duas janelas de KBr foram aquecidas a uma temperatura superior à temperatura de fusão do álcool. Seguidamente, uma amostra de álcool sólido com cerca de 5 mg foi colocada sobre uma das placas e deixada derreter completamente, após o que se cobriu toda a superfície da amostra com a segunda janela de KBr aquecida. O conjunto de janelas de KBr e a amostra foram deixados arrefecer até à temperatura ambiente enquanto se aplicava sobre ele uma ligeira pressão de modo a promover a formação de um filme de amostra sólida de espessura reduzida.

Tentou-se um procedimento semelhante para a preparação de misturas binárias dos álcoois, sendo um deles perdeuterado. No entanto, os resultados assim obtidos não se revelaram reprodutíveis nem concordantes com o comportamento termotrópico registado por calorimetria diferencial de varrimento para amostras com a mesma composição. Desenvolveu-se, por isso, um procedimento alternativo de preparação das amostras das misturas binárias, procurando reproduzir o tratamento térmico aplicado às amostras analisadas por calorimetria. Para o efeito, a quantidade requerida de cada álcool foi pesada ( $\pm 0,01 \text{ mg}$ , balança *Mettler*) directamente numa placa de vidro, após o que a amostra foi incubada a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , numa estufa, durante a noite. Esta amostra foi sujeita a dois ciclos de aquecimento e arrefecimento entre 10 e  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo finalmente incubada a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 horas, em excicador. Após este



**Figura 3.3.** Interferómetro *Bomem* MB-104 (A), acoplado a um controlador de temperatura (B), destacando-se a célula de variação de temperatura onde se colocou a amostra (C).

tratamento, cerca de 5 mg de amostra foram cuidadosamente pulverizados com o auxílio de um almofariz, de modo a obter uma mistura mecânica dos dois componentes. A amostra foi, então, comprimida entre duas janelas de KBr, à temperatura ambiente, de modo a que fosse espalhada uniformemente entre as superfícies das janelas formando um filme de sólido com uma espessura reduzida. Para a análise espectroscópica, foram somente consideradas as amostras cujos valores de absorvância não excedessem 1,5 unidades em toda gama de radiação monitorizada.

Os espectros foram adquiridos a intervalos de temperatura de 1 °C, permitindo-se o equilíbrio de temperatura da amostra durante 1 minuto antes da aquisição do espectro. A escala de temperatura foi calibrada utilizando como referência a temperatura de fusão de uma série de álcoois de cadeia longa (temperaturas de fusão entre 20 e 70 °C) obtida por DSC. Para análise dos espectros, efectuou-se a subtracção de uma linha de base que passou pelos mínimos de absorção registados a 1800  $\text{cm}^{-1}$  e 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram normalizados utilizando o programa *Origin*, versão 5.0 (*MicroCal Software*, Northampton MA, USA). A posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2\delta$  (deformação angular fora do plano relativa ao grupo  $\text{CH}_2$ , tipo *rocking*) e  $\nu\text{CH}_2s$  (*stretching* simétrico relativa ao grupo  $\text{CH}_2$ ), observadas nas regiões de 700–750  $\text{cm}^{-1}$  e 2800–2900  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, foi registada por análise do espectro recorrendo ao software *Win Bomem*, versão 3.5.

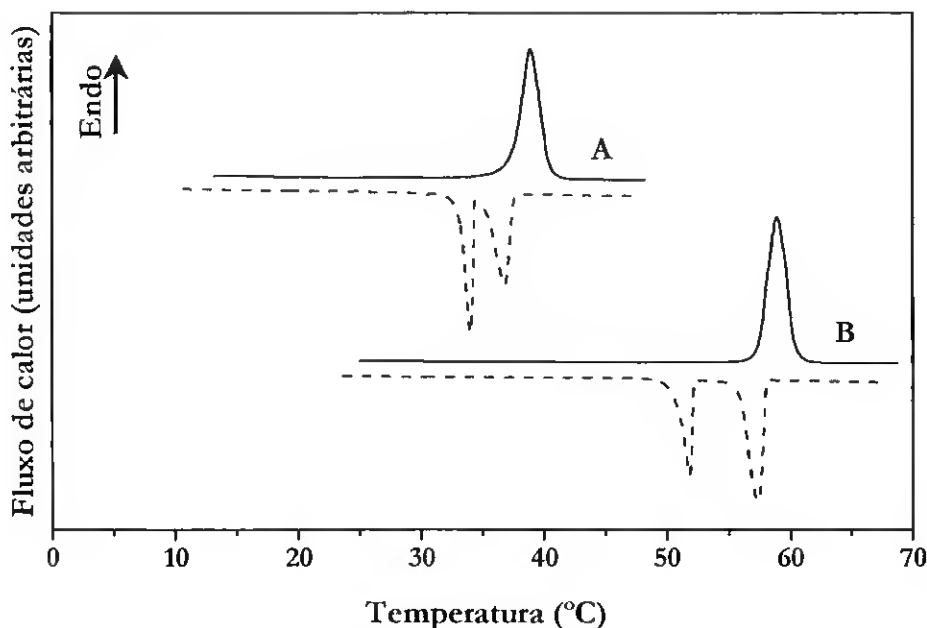
## 3.5 Resultados dos Estudos com 1-Tetradecanol e 1-Octadecanol

### 3.5.1 Comportamento termotrópico dos álcoois puros

O comportamento de fases dos álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol foi primeiro estudado por DSC. Utilizando esta técnica, obtiveram-se termogramas de aquecimento e arrefecimento de amostras destes álcoois na gama de temperaturas entre 10 e 70 °C, a uma velocidade de varrimento de 1 °C  $\text{min}^{-1}$ , os quais são apresentados na Figura 3.4.

Durante a fusão de 1-tetradecanol, e de 1-octadecanol, igualmente, registou-se uma única transição endotérmica. Deste registo, foi obtida a temperatura de fusão ( $T_f$ ) e a entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) respectivos. Os termogramas de arrefecimento também obtidos para estes

álcoois foram substancialmente diferentes dos de aquecimento, registando-se duas transições exotérmicas. De acordo com o que se conhece do comportamento de fases destes álcoois, a primeira transição exotérmica foi atribuída à cristalização do álcool, dela se obtendo a temperatura de início de cristalização ( $T_c$ ) e a entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) respectivas; a segunda transição exotérmica foi atribuída a uma transição entre duas fases sólidas e dela se obtiveram a temperatura de início de transição ( $T_t$ ) e a entalpia de transição ( $\Delta H_t$ ) características. As temperaturas de início de transição e as entalpias relativas às transições registadas nos termogramas de aquecimento e de arrefecimento para 1-tetradecanol e 1-octadecanol encontram-se listadas na Tabela 3.1. Pode notar-se que a temperatura de início de cristalização, retirada da primeira transição exotérmica, é praticamente coincidente com a temperatura de início de fusão.



**Figura 3.4.** Termogramas de aquecimento (linha a cheio) e arrefecimento (linha a tracejado) obtidos para 1-tetradecanol (A) e 1-octadecanol (B) entre 10 e 70 °C, a uma velocidade de varrimento de 1 °C min<sup>-1</sup>.

Na mesma gama de temperaturas em que se registaram as duas transições exotérmicas, durante o arrefecimento, registou-se uma só transição endotérmica, no aquecimento. Este comportamento foi reproduzível em ciclos sucessivos de aquecimento e arrefecimento, demonstrando que estas transições são reversíveis. O facto de a soma das entalpias das

transições exotérmicas ser idêntica à entalpia da única transição endotérmica mostra, também, a reversibilidade das transformações observadas, concluindo-se que o processo endotérmico registado durante o aquecimento só é completamente revertido com os dois processos exotérmicos registados no arrefecimento.

**Tabela 3.1.** Características termodinâmicas da transição endotérmica e das duas transições exotérmicas observadas para 1-tetradecanol e 1-octadecanol por DSC.

Álcool	$T_f$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_i$ (°C)	$\Delta H_f$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_c$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_i$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
1-Tetradecanol	37,1	37,6	34,5	45,4	-23,9	-21,5
1-Octadecanol	57,1	58,0	52,1	64,2	-39,9	-23,6

Álcoois de cadeia longa como 1-tetradecanol ou 1-octadecanol cristalizam numa fase cristalina rotacional hexagonal que se transforma num sólido não rotacional mais estável a baixas temperaturas. Este sólido não rotacional tem um empacotamento cristalino ortorrômbico nalguns membros desta família de compostos. Sendo assim, admitindo que, na primeira transição exotérmica registada durante o arrefecimento, se forma o sólido rotacional hexagonal e que, na segunda transição exotérmica, ocorre uma transformação deste sólido num sólido não rotacional, a transição endotérmica registada durante a fusão corresponderá à fusão do sólido não rotacional.

Em condições de equilíbrio de temperatura, a fusão e a cristalização de um composto devem ser registados na mesma gama de temperaturas. Contudo, no estudo do comportamento termotrópico de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol (Figura 3.4), foi notada uma histerese de cerca de 3 °C. A utilização de uma velocidade de varrimento demasiado elevada ou de uma massa de amostra demasiado grande são possíveis causas de histerese. No entanto, tanto a quantidade de amostra (inferior a 7 mg) como a velocidade de varrimento utilizada na obtenção dos termogramas (1 °C min<sup>-1</sup>) podem ser consideradas como adequadas para permitir condições de equilíbrio de temperatura em análises típicas de calorimetria diferencial de varrimento (Boerio-Goates e Callanan, 1992).

Com o objectivo de verificar se a histerese observada se ficaria a dever a uma velocidade de varrimento demasiado elevada, foram também obtidos termogramas de aquecimento e de arrefecimento a uma velocidade de  $0,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Este procedimento resultou numa redução da histerese de  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ , tanto no caso de 1-tetradecanol como de 1-octadecanol, devido à diminuição da temperatura a que se completou a transição endotérmica ( $T_{fm}$ ) quando se diminuiu a velocidade de varrimento.

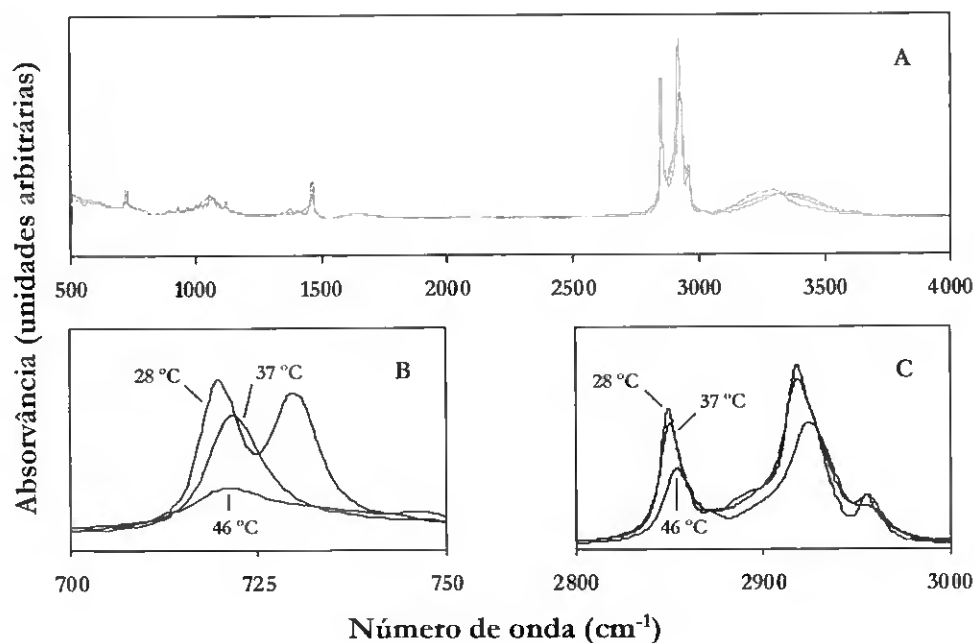
Foi interessante notar que no termograma de aquecimento obtido para 1-octadecanol a  $0,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  foi possível resolver duas transições endotérmicas, apesar de estas se encontrarem praticamente sobrepostas em temperatura, destacando-se somente uma ligeira inflexão no ombro do pico no início do processo endotérmico. Apesar disso, os valores de  $T_f$  e  $\Delta H_f$  obtidos à velocidade de  $0,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  coincidiram com os obtidos a  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Relativamente a 1-tetradecanol, registou-se um único pico de fluxo de calor endotérmico em qualquer das velocidades de varrimento utilizadas, obtendo-se também valores de  $T_f$  e  $\Delta H_f$  idênticos com as duas velocidades de varrimento testadas. Relativamente aos termogramas de arrefecimento, a redução da velocidade de varrimento de  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  para  $0,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  não afectou nem a posição nem a intensidade da primeira transição exotérmica. No entanto, a segunda transição exotérmica foi completada a uma temperatura cerca de  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  superior quando a velocidade de arrefecimento foi reduzida para  $0,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Não se registaram diferenças significativas entre  $T_c$  e  $T_p$ ,  $\Delta H_c$  ou  $\Delta H_p$ , obtidos a qualquer das velocidades de varrimento.

### 3.5.2 Caracterização de fases cristalinas por FTIR

Não sendo possível tirar conclusões definitivas quanto ao tipo de sólido formado durante a cristalização de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol analisando os termogramas de DSC, optou-se por recorrer a uma técnica mais informativa quanto ao tipo de interações moleculares que caracterizam as diferentes fases sólidas. Para o efeito, foram realizados alguns estudos de FTIR acompanhando a fusão e a cristalização de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol.

Foram obtidos espectros de absorção de infravermelho FTIR de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol entre  $500$  e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , em função da temperatura. Para ambos os álcoois, observaram-se alterações significativas na maior parte das bandas de absorção em

consequência da variação da temperatura a que foi adquirido o espectro, conforme pode constatar-se na Figura 3.5. Uma vez que se caracterizou  $T_f$ ,  $T_c$  e  $T_i$  para estes álcoois (Tabela 3.1), pode fazer-se uma correspondência entre o espectro FTIR obtido a uma determinada temperatura e a fase em que se encontra o álcool a essa temperatura.



**Figura 3.5.** Espectros de FTIR obtidos para 1-tetradecanol a 46 °C (fase líquida, L), 37 °C (fase  $S_{\text{HEX}}$ ) e a 28 °C (fase  $S_{\text{ORT}}$ ), durante a cristalização do composto (A). Destacam-se as regiões onde se registam as bandas de vibração  $\gamma\text{CH}_2$  (B) e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (C). Espectros semelhantes foram registados para 1-octadecanol, a 63 °C (fase líquida, L), 55 °C (fase  $S_{\text{HEX}}$ ) e 44 °C (fase  $S_{\text{ORT}}$ ).

Os trabalhos de espectroscopia vibracional utilizados como referência para a interpretação do comportamento de fases de 1-tetradecanol e 1-octadecanol nos estudos de FTIR, dizem respeito a estudos do comportamento de fases de  $n$ -alcanos. Nestes trabalhos, faz-se claramente a distinção entre o espectro vibracional de cadeias de polimetileno numa fase sólida rotacional hexagonal (designada por sólido  $II$ ) e o espectro de uma fase sólida não rotacional (designada por sólido  $I$ ). Esta última é referida como possuindo um empacotamento cristalino ortorrômbico (Casal *et al.*, 1982; Casal *et al.*, 1983). Contudo, não se aponta uma distinção entre o sólido ortorrômbico e outro sólido não rotacional, do tipo

monoclínico ou triclínico, que pode também ser observado nestes compostos (McClure, 1968). A razão de não se fazer esta discriminação entre vários sólidos não rotacionais prende-se com o facto de a energia dos vários modos vibracionais permitidos para as moléculas com um empacotamento cristalino ortorrômbico, monoclínico ou triclínico (sólidos não rotacionais) serem bastante semelhantes, não sendo, por isso, adequado fazer a sua distinção recorrendo a esta técnica. Assim, durante este estudo, será feita a distinção entre a formação de um sólido rotacional hexagonal e a formação de um sólido não rotacional, provavelmente ortorrômbico, não se excluindo, à partida, a possibilidade de este último poder corresponder, de facto, a um sólido monoclínico ou triclínico.

Os álcoois de cadeia longa, como 1-tetradecanol e 1-octadecanol, podem cristalizar em diferentes fases sólidas, ou polimorfos, designados por fase  $\alpha$  (sólido rotacional, hexagonal), fase  $\beta$  (sólido não rotacional, ortorrômbico) ou fase  $\gamma$  (sólido não rotacional, monoclínico ou triclínico). Por analogia com os trabalhos de caracterização de fases de *n*-alcanos por FTIR, pode-se distinguir entre a formação de uma fase rotacional,  $\alpha$ , e uma não rotacional mais estável a baixas temperaturas,  $\beta$  ou  $\gamma$  mas não entre estas duas últimas. Por este motivo, durante este trabalho julgou-se oportuno utilizar uma nomenclatura para as fases sólidas que reportasse imediatamente o leitor para um dos dois tipos de sólido distinguido por FTIR: a) sólido rotacional, hexagonal ou b) sólido não rotacional, provavelmente ortorrômbico. O sólido rotacional hexagonal será designado por  $S_{\text{HEX}}$ , enquanto que o sólido não rotacional, provavelmente ortorrômbico, passará a ser designado por  $S_{\text{ORT}}$ .

Tendo em conta as considerações anteriores sobre a nomenclatura das diferentes fases sólidas formadas pelos álcoois em estudo, e considerando o seu comportamento termotrópico registado por DSC, a primeira transição exotérmica registada nos termogramas de arrefecimento foi interpretada como correspondendo a uma transição líquido- $S_{\text{HEX}}$  e a segunda transição exotérmica como devida a uma transição  $S_{\text{HEX}}$ - $S_{\text{ORT}}$ . Assim, a transição endotérmica registada durante o aquecimento deverá corresponder a uma transição  $S_{\text{ORT}}$ -líquido. Esta atribuição será confirmada com os estudos de FTIR que se apresentam em seguida.

Na gama de radiações observadas, entre 500 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , os espectros FTIR obtidos para 1-tetradecanol e 1-octadecanol numa determinada fase, líquida ou sólida, apresentaram-se muito semelhantes. O conjunto de bandas de absorção registadas na região de

2800–3000  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos de vibração de *stretching*<sup>12</sup> simétrico e assimétrico dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de cadeias hidrocarbonadas. As bandas mais intensas nesta região são as relativas a *stretching* simétrico ( $\nu \text{CH}_2\text{s}$ ) e assimétrico ( $\nu \text{CH}_2\text{as}$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$ , e são localizadas a 2850  $\text{cm}^{-1}$  e 2920  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Casal e Mantsch, 1984). A banda larga observada a cerca de 3300  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à vibração de *stretching* da ligação O–H.

Foram ainda observadas bandas menos intensas, entre 1350  $\text{cm}^{-1}$  e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , relativas aos modos de vibração de deformação angular no plano dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  do tipo *bending* e *scissoring*, bem como uma série de bandas na região de 1190–1380  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao modo de vibração *wagging* dos grupos  $\text{CH}_2$ , cujo número e posição são característicos do comprimento de cadeias de polimetileno (Casal e Mantsch, 1984). As bandas localizadas entre 700  $\text{cm}^{-1}$  e 1150  $\text{cm}^{-1}$  são devidas a vibrações de deformação angular fora do plano dos grupos  $\text{CH}_2$  do tipo *rocking* ( $\gamma\text{CH}_2$ ), das quais se destaca a banda centrada a 720  $\text{cm}^{-1}$  como a mais intensa.

A posição e a largura das bandas  $\nu \text{CH}_2\text{s}$  e  $\nu \text{CH}_2\text{as}$  são bastante afectadas pelo grau de desordem conformacional das cadeias hidrocarbonadas. Em *n*-alcanos, o aumento repentino de conformações *gauche* induzido por transições de fase do tipo sólido–líquido traduz-se em alterações bruscas nos parâmetros destas bandas, verificando-se um aumento da sua largura e o seu deslocamento abrupto para números de onda superiores (Casal *et al.*, 1983). Estas alterações podem ser utilizadas para a determinação de temperaturas de fusão deste tipo de compostos e seus derivados. A banda  $\nu \text{CH}_2\text{s}$  é menos sobreposta por outras bandas localizadas na mesma região do espectro do que a banda  $\nu \text{CH}_2\text{as}$ , pelo que é geralmente mais utilizada para a monitorização de transições de fase.

A banda  $\gamma\text{CH}_2$  centrada a cerca de 720  $\text{cm}^{-1}$  também é afectada por alterações conformacionais registadas em transições de fase de *n*-alcanos e derivados. Particularmente, observa-se uma diminuição acentuada da intensidade desta banda, acompanhada por um aumento da sua largura, em consequência da fusão destes compostos (Casal e Mantsch, 1984). No entanto, são as alterações induzidas pela transição entre um sólido rotacional e um sólido não rotacional que tornam bastante útil a sua observação em estudos de comportamento de

---

<sup>12</sup> Para a designação dos modos de vibração optou-se por utilizar a nomenclatura em Inglês por ser mais condensada. A correspondência à designação dos modos de vibração em Português é: *stretching*, alongação linear; *scissoring*, deformação angular no plano de ligação; *wagging*, movimento para fora do plano da ligação; *rocking*, torção ou deformação angular fora do plano de ligação.

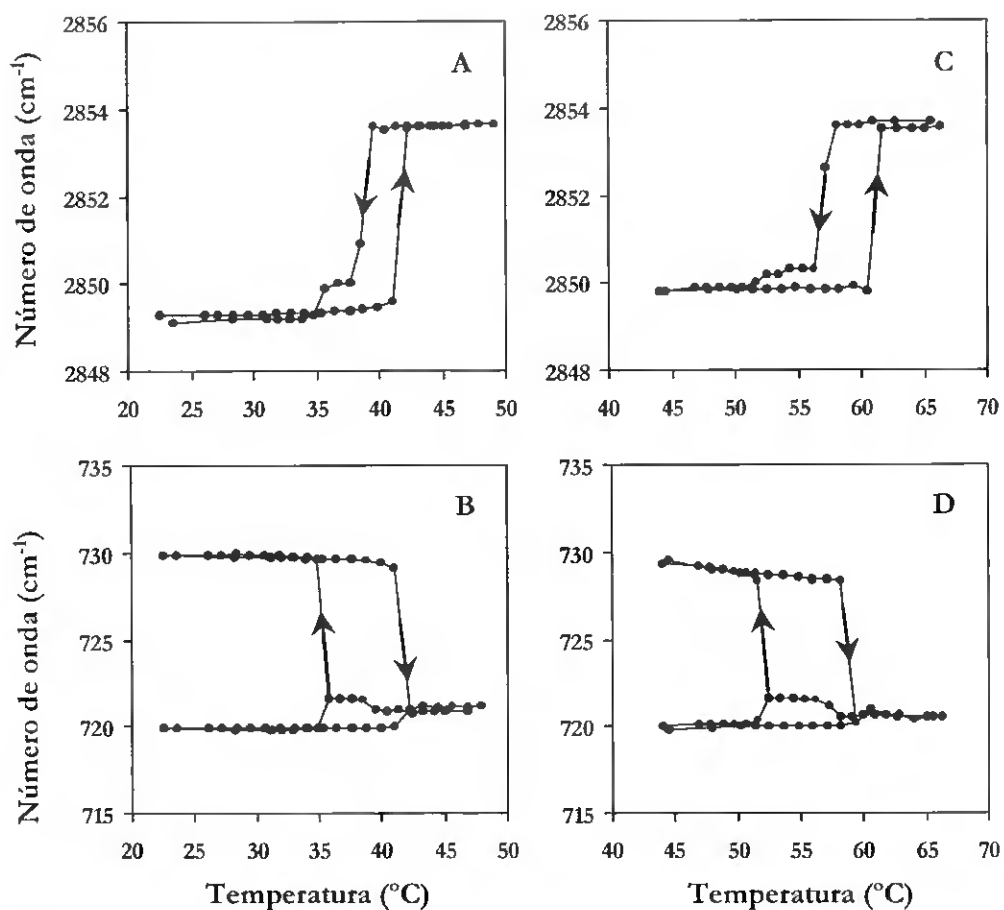
fases de compostos deste tipo. Na formação do sólido mais estável a baixas temperaturas, observa-se um aumento da largura da banda  $\gamma\text{CH}_2$ , a qual é acompanhada pelo aparecimento de uma outra banda intensa na sua proximidade, em resultado do acoplamento intermolecular do modo de vibração  $\gamma\text{CH}_2$  *rocking* (Casal *et al.*, 1982). No espectro FTIR de *n*-alcanos numa fase sólida não rotacional ortorrômbica observam-se duas bandas  $\gamma\text{CH}_2$ , uma, mais intensa, a  $719\text{ cm}^{-1}$  e outra a  $730\text{ cm}^{-1}$  (Casal *et al.*, 1982).

As alterações do espectro FTIR dos álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol registadas em consequência de transições de fases foram semelhantes às descritas para *n*-alcanos, nomeadamente no que diz respeito a alterações nos perfis das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  (Figura 3.5-B),  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  e  $\nu\text{CH}_2\text{as}$  (Figura 3.5-C).

Com o objectivo de distinguir entre a transição sólido-líquido e a transição rotacional, registou-se simultaneamente a posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  durante o aquecimento e o arrefecimento dos álcoois, numa gama de temperaturas entre 10 e 70 °C. Os resultados são apresentados na Figura 3.6.

Iniciou-se o estudo do comportamento termotrópico dos álcoois monitorizando a sua cristalização. A temperaturas superiores a  $T_c$ , o espectro de infravermelho dos álcoois apresentou a banda  $\gamma\text{CH}_2$  mais intensa posicionada a cerca de  $720\text{ cm}^{-1}$  e a banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  centrada a  $2853,6\text{ cm}^{-1}$ , características do espectro de compostos hidrocarbonados numa fase líquida. Por arrefecimento desta fase líquida, observou-se um deslocamento abrupto da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  para  $2850,2\text{ cm}^{-1}$ , acompanhado pelo aumento de intensidade da banda  $\gamma\text{CH}_2$  e o seu deslocamento para  $721,6\text{ cm}^{-1}$ , à temperatura  $T_c$ .

O desdobramento da banda  $\gamma\text{CH}_2$ , característico da transição do sólido rotacional para o sólido não rotacional, foi somente observado à temperatura  $T_i$ . Esta transição de fase observada a  $T_i$  originou, também, um ligeiro deslocamento da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  para números de onda inferiores. Estes resultados confirmaram que a primeira transição exotérmica registada por DSC na cristalização destes álcoois é uma transição do tipo líquido- $S_{\text{IEX}}$ , enquanto que a segunda transição exotérmica corresponde a uma transição  $S_{\text{IEX}}-S_{\text{ORT}}$ .



**Figura 3.6.** Posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  (715–735  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (2848–2856  $\text{cm}^{-1}$ ) do espectro de 1-tetradecanol (A e B) e de 1-octadecanol (C e D), observadas durante a fusão e a cristalização dos álcoois, em função da temperatura. As setas indicam o sentido de varrimento de temperatura.

Estudando o aquecimento da fase sólida formada à temperatura  $T_v$ , observou-se que a posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  do espectro FTIR se manteve praticamente constante até ser atingida a temperatura  $T_b$ , à qual se registou em simultâneo a coalescência das duas bandas  $\gamma\text{CH}_2$  numa só banda centrada a cerca de  $720\text{ cm}^{-1}$  e o deslocamento abrupto da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  para uma posição idêntica à registada quando o composto se encontrava na fase líquida. Tanto no caso de 1-tetradecanol como no caso de 1-octadecanol, as bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  características de uma fase  $S_{\text{IEX}}$  não foram observadas durante a fusão dos álcoois, concluindo-se que a transição endotérmica observada à temperatura  $T_f$  corresponde a uma transição do tipo  $S_{\text{ORT}}$ –líquido.

A histerese entre fusão e cristalização observada por FTIR foi ligeiramente superior à encontrada nos ensaios de DSC, principalmente porque nas experiências de FTIR se registou uma temperatura de início da fusão ligeiramente superior à registada por DSC. No entanto, é de salientar a boa correlação entre a diferença entre  $T_c$  e  $T_f$  observadas por calorimetria e por espectroscopia de infravermelho.

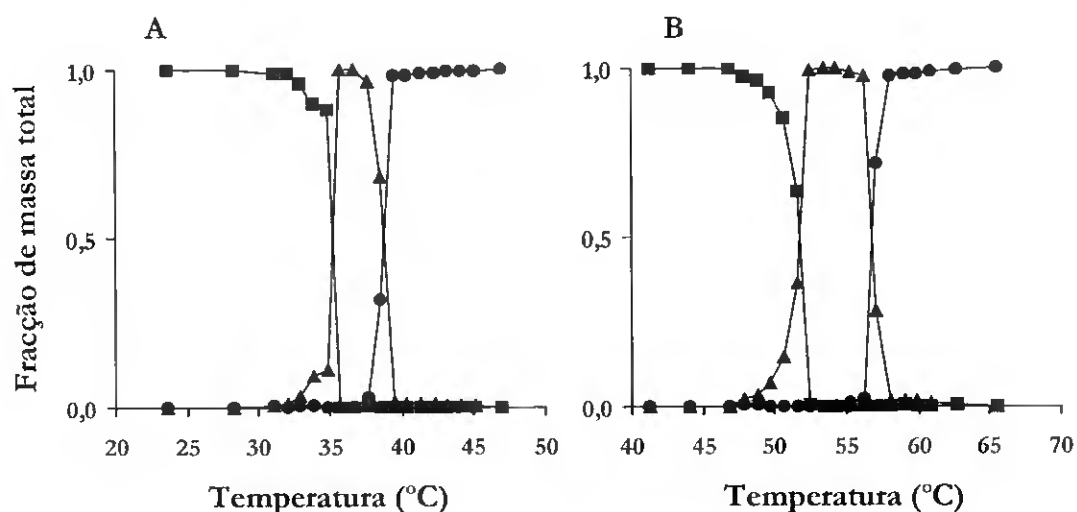
### 3.5.3 Composição relativa de fases em função da temperatura

O espectro de infravermelho obtido para 1-tetradecanol ou para 1-octadecanol a temperaturas em que se verifica coexistência de fases deverá reflectir a composição relativa em cada uma das fases presentes. Sendo assim, cada espectro experimental corresponde à adição dos espectros característicos de cada uma das fases observadas, ponderada pela fracção de massa de cada uma das fases. Uma vez que se conhece o espectro característico de cada uma dessas fases, a fracção de massa de cada uma das fases presente a uma determinada temperatura corresponderá ao factor de ponderação de cada um dos espectros adicionados de modo a que se obtenha a melhor simulação do espectro experimental.

Foram tentadas simulações dos espectros obtidos durante o arrefecimento dos álcoois nas regiões de  $700\text{--}750\text{ cm}^{-1}$  e  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ , nas quais se registam as bandas de vibração  $\nu\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2$ , respectivamente. Para o caso de cada álcool, considerou-se o espectro obtido a uma temperatura  $5\text{ }^\circ\text{C}$  superior a  $T_c$  como espectro característico da fase líquida, o espectro obtido a uma temperatura  $2\text{ }^\circ\text{C}$  inferior a  $T_c$  como espectro característico da fase  $S_{\text{HEX}}$  e, finalmente, o espectro obtido a uma temperatura  $5\text{ }^\circ\text{C}$  inferior a  $T_f$  como espectro característico da fase  $S_{\text{ORT}}$ . Cada coordenada do espectro experimental, intensidade de absorção em função do número de onda, foi considerada como uma função das coordenadas respectivas dos espectros característicos das fases líquida,  $S_{\text{HEX}}$  e  $S_{\text{ORT}}$ . Utilizando um método iterativo incluído no programa de software *Microsoft Excel* foram obtidos os factores de ponderação médios que resultavam na melhor simulação, procurando um valor mínimo para a soma dos quadrados da diferença entre o valor experimental e o simulado.

Em média, para cada coordenada, a diferença entre a intensidade do espectro calculado e a do espectro experimental foi inferior a 1%. Os resultados obtidos com as simulações nas duas regiões espectrais foram bastante semelhantes, apesar de se notar uma melhor discriminação entre a contribuição das fases líquida e  $S_{\text{HEX}}$  nas simulações na região de

2800–3000  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que a distinção entre fases  $S_{\text{HEX}}$  e  $S_{\text{ORT}}$  foi melhor nas simulações na região 700–750  $\text{cm}^{-1}$ . Em consequência, julgou-se mais correcto considerar como a fracção de fase líquida a resultante das simulações na região 2800–3000  $\text{cm}^{-1}$ , e considerar como fracção da fase  $S_{\text{ORT}}$  a obtida com as simulações na região 700–750  $\text{cm}^{-1}$ . A fracção de fase  $S_{\text{HEX}}$  foi, então, determinada como a diferença necessária para completar o total de massa da amostra. Os resultados das simulações são apresentados na Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Composição relativa de fases (fracção de massa total) em função da temperatura, determinada para 1-tetradecanol (A) e 1-octadecanol (B) a partir da simulação do respectivo espectro experimental, regiões 700–750  $\text{cm}^{-1}$  e 2800–3000  $\text{cm}^{-1}$ , como a soma ponderada dos espectros característicos da fase líquida (●),  $S_{\text{HEX}}$  (▲) e  $S_{\text{ORT}}$  (■).

As mesmas simulações foram tentadas utilizando apenas os espectros experimentais atribuídos à fase líquida e à fase  $S_{\text{ORT}}$  mas com piores resultados no que diz respeito à semelhança entre o espectro experimental e o simulado. Desta observação se conclui que o espectro atribuído à fase  $S_{\text{HEX}}$  não é resultante de uma combinação linear dos espectros das fases líquida e  $S_{\text{ORT}}$ , confirmando-se que as interacções moleculares existentes na fase detectada entre  $T_c$  e  $T_t$  são distintas das observados para a fase líquida ou para a fase  $S_{\text{ORT}}$ .

### 3.5.4 Estabilidade do sólido rotacional nos álcoois puros

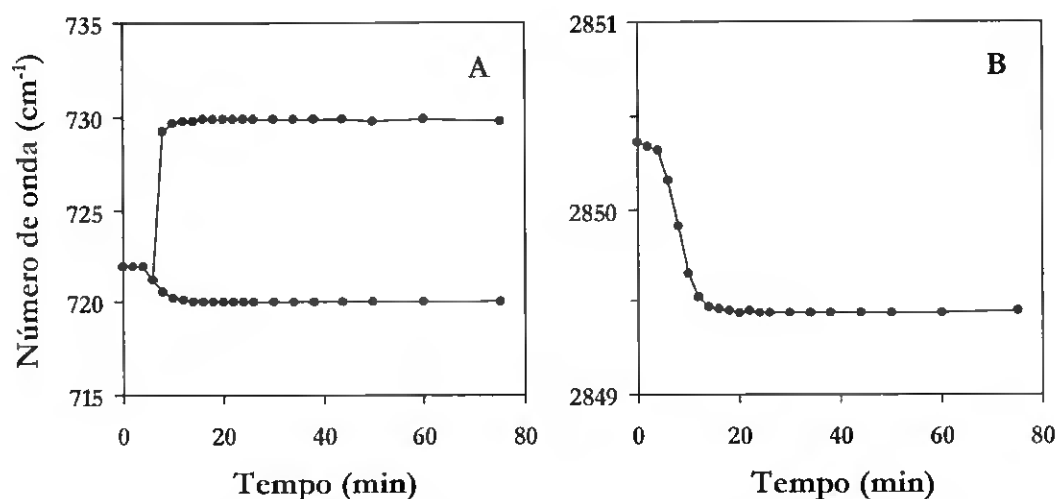
A fase  $S_{\text{HEX}}$  é referida como sendo metaestável (Watanabe, 1968; Mosselman *et al.*, 1974). No seguimento da caracterização do comportamento de fases de 1-tetradecanol e 1-octadecanol por FTIR, procurou-se realizar um estudo da estabilidade da fase  $S_{\text{HEX}}$  observada para estes álcoois. A cinética de conversão da fase  $S_{\text{HEX}}$  numa fase  $S_{\text{ORT}}$  pode ser estudada seguindo as alterações que esta transição implica na posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$ . As experiências realizadas neste âmbito são apresentadas em seguida.

O estudo da estabilidade da fase  $S_{\text{HEX}}$  foi iniciado com o seguimento da cristalização do álcool em estudo por FTIR. A posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  foi registada em intervalos de temperatura de 1 °C até que se observasse a formação de uma fase  $S_{\text{HEX}}$ . Uma vez obtido o espectro característico de uma fase  $S_{\text{HEX}}$ , a temperatura foi mantida constante e registou-se a posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  ao longo do tempo.

Com 1-tetradecanol, o espectro característico da fase  $S_{\text{HEX}}$  foi obtido à temperatura de 37 °C, isto é, 2,5 °C acima da sua temperatura de transição,  $T_f$  (Tabela 3.1), o que foi indicado pela detecção de uma única banda intensa  $\gamma\text{CH}_2$ , centrada a 721,9  $\text{cm}^{-1}$ , ao mesmo tempo que a banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  se posicionava a 2850,4  $\text{cm}^{-1}$ . Incubando a fase  $S_{\text{HEX}}$  a 37 °C, a posição destas bandas foi seguida ao longo do tempo. Observaram-se alterações significativas na posição destas bandas, registando-se o desdobramento da banda  $\gamma\text{CH}_2$  em duas bandas, centradas a 720,1  $\text{cm}^{-1}$  e a 729,8  $\text{cm}^{-1}$ , e o deslocamento simultâneo da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  para 2849,4  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3.8). Ao fim de cerca de 20 minutos, o espectro de 1-tetradecanol era característico do álcool numa fase  $S_{\text{ORT}}$ , concluindo-se que a fase  $S_{\text{HEX}}$  identificada para este álcool não é estável a 37 °C. Pode notar-se que esta temperatura é praticamente coincidente com  $T_f$  e  $T_c$  obtidas por DSC (Tabela 3.1).

De acordo com Mosselman *et al.* (1974), o polimorfismo de 1-tetradecanol entre o sólido rotacional e o sólido não rotacional é do tipo monotrópico. Neste tipo de polimorfismo, a temperatura de transição entre as duas fases sólidas é localizada teoricamente acima da temperatura de fusão, pelo que a fase rotacional é sempre instável a temperaturas inferiores à temperatura de fusão (Anexo B). Neste caso, a transição para uma fase sólida mais estável é irreversível e a transição  $S_{\text{HEX}}-S_{\text{ORT}}$  observada para 1-tetradecanol deveria ser irreversível, o que não é o caso pois, apesar de se observar uma transição  $S_{\text{ORT}}-\text{líquido}$  na fusão de 1-tetradecanol (e também no caso de 1-octadecanol), a entalpia de fusão corresponde

à soma das entalpias dos dois processos exotérmicos registados durante a cristalização do respectivo álcool, o que indica o contrário. Adicionalmente, este comportamento termotrópico é reprodutível em ciclos de aquecimento/arrefecimento sucessivos. Estas observações sugerem que a fusão de 1-tetradecanol (ou de 1-octadecanol) deve ser precedida por uma transição  $S_{ORT}$ - $S_{HEX}$ , inversa à transição registada à temperatura  $T_f$  durante a cristalização do álcool. De facto, no termograma de aquecimento obtido para 1-octadecanol a  $0,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , foram registadas duas transições praticamente sobrepostas. Assim, os nossos resultados apontam para que o polimorfismo entre os sólidos  $S_{HEX}$  e  $S_{ORT}$  seja do tipo enantiotrópico e não monotrópico, tanto para 1-tetradecanol como para 1-octadecanol.

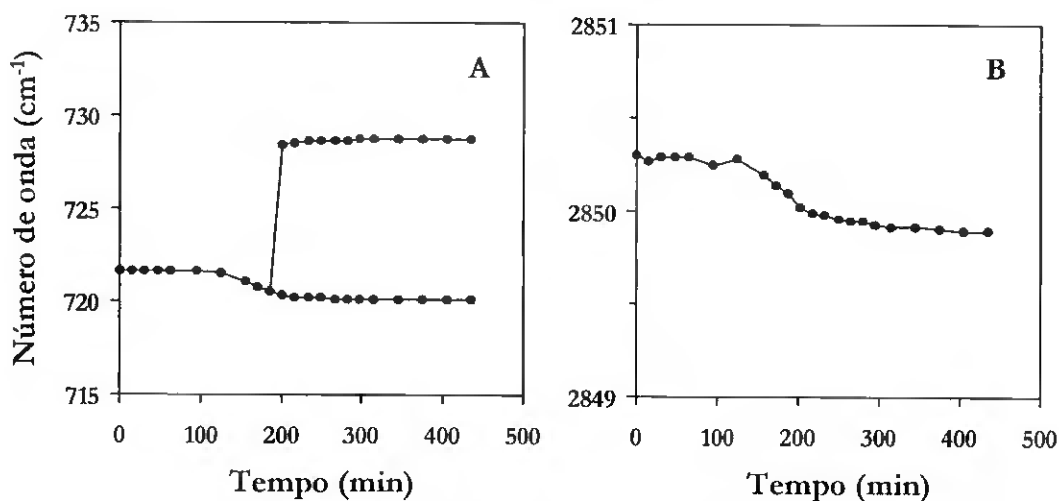


**Figura 3.8.** Estabilidade da fase  $S_{HEX}$  observada para 1-tetradecanol a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A posição das bandas correspondentes aos modos de vibração  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> (A) e  $\nu$ -CH<sub>2</sub>S (B) foi registada em função do tempo de incubação a esta temperatura.

Sendo o polimorfismo entre a fase  $S_{HEX}$  e a fase  $S_{ORT}$  do tipo enantiotrópico, compreende-se que não se registre a transição sólido-sólido durante a fusão se  $T_f$  for tão próxima de  $T_c$  que se torna impossível de detectar experimentalmente durante o aquecimento. É frequente registarem-se fenómenos de sobre-aquecimento de uma fase sólida quando esta funde (Cahn, 1992), e a sua ocorrência explicaria a sobreposição da transição sólido-sólido com a fusão nos termogramas de aquecimento. Por outro lado, durante o arrefecimento, o registo de  $T_f$  a uma temperatura bastante inferior a  $T_c$  pode ser devida a uma cinética de conversão entre polimorfos extremamente lenta, a qual se traduz num sobre-arrefecimento da fase  $S_{HEX}$ . Em consequência, esta fase será detectada numa gama de temperaturas em que já é

instável. No caso de 1-octadecanol as temperaturas  $T_c$  e  $T_i$  encontram-se mais afastadas, pelo que com este álcool poderá ser mais fácil identificar uma temperatura em que  $S_{\text{HEX}}$  seja estável.

A cristalização de 1-octadecanol foi seguida por FTIR até ao aparecimento de um espectro característico de uma fase  $S_{\text{HEX}}$ , a 56 °C, uma temperatura cerca de 2 °C inferior a  $T_c$  e 4 °C superior a  $T_i$  (Tabela 3.1). Como indicação da presença desta fase, considerou-se a ocorrência de uma banda  $\gamma\text{CH}_2$  intensa a 721,6  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que a banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  se localizou a 2850,3  $\text{cm}^{-1}$ . A incubação da fase  $S_{\text{HEX}}$  a 56 °C decorreu sem que se registassem alterações na posição ou intensidade destas bandas durante um período de 2 horas (Figura 3.9). No entanto, após um período de 6 horas observaram-se alterações significativas na posição das bandas monitorizadas, tendo-se registado o desdobramento progressivo da banda  $\gamma\text{CH}_2$  em duas bandas, localizadas a 720,1  $\text{cm}^{-1}$  e a 728,7  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que a posição da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  se foi aproximando de 2849,9  $\text{cm}^{-1}$ . Estas alterações são indicadoras da formação de uma fase  $S_{\text{ORT}}$ .



**Figura 3.9.** Estabilidade da fase  $S_{\text{HEX}}$  observada para 1-octadecanol a 56 °C. A posição das bandas correspondentes aos modos de vibração  $\gamma\text{CH}_2$  (A) e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (B) foi registada em função do tempo de incubação a esta temperatura.

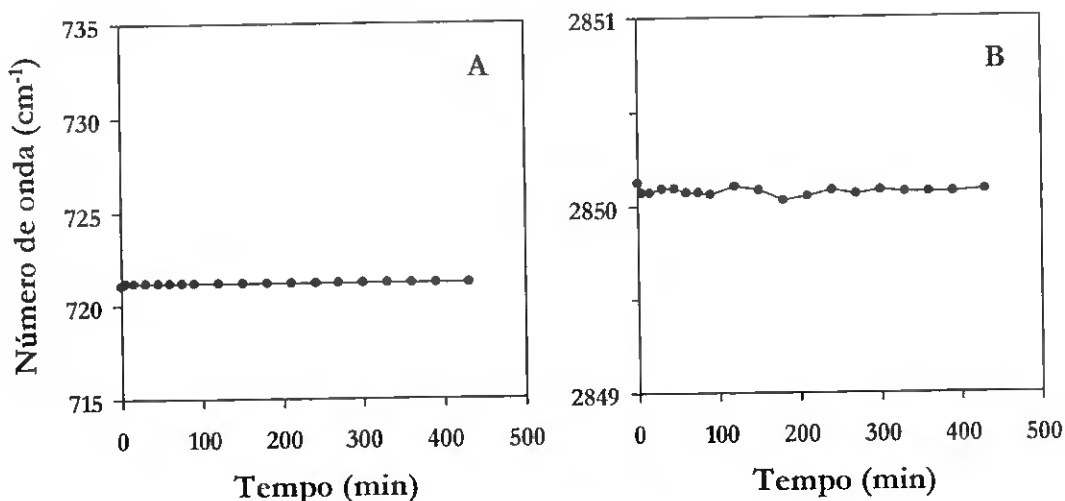
A conversão de  $S_{\text{HEX}}$  em  $S_{\text{ORT}}$  foi mais lenta no caso de 1-octadecanol do que no caso de 1-tetradecanol. Também, a diferença entre a temperatura de incubação da fase  $S_{\text{HEX}}$  e a temperatura  $T_i$  experimental foi maior na experiência realizada com 1-octadecanol. A cinética de conversão de  $S_{\text{HEX}}$  em  $S_{\text{ORT}}$  dependerá da proximidade entre a temperatura de incubação da fase  $S_{\text{HEX}}$  e  $T_i$ . De facto, em sistemas onde se observa polimorfismo enantiotrópico, a

velocidade de conversão do sólido estável a temperaturas mais elevadas no sólido estável a temperaturas mais baixas é mínima à temperatura  $T_i'$ , mas aumenta à medida que a temperatura decresce relativamente a  $T_i$  (Anexo B). A transição  $S_{\text{HEX}}-S_{\text{ORT}}$  pode estar a ser registada experimentalmente a uma temperatura inferior à qual ela se posiciona termodinamicamente. Assim, a temperatura de incubação escolhida para a observação de  $S_{\text{HEX}}$  formada por 1-tetradecanol (37 °C) ou 1-octadecanol (56 °C), pode ser, de facto, inferior a  $T_i$  real, apesar de ser superior a  $T_i$  estabelecida por DSC.

Em hipótese, num sistema enantiotrópico em que  $T_i$  seja suficientemente afastada de  $T_c$ , será possível encontrar experimentalmente uma gama de temperaturas na qual  $S_{\text{HEX}}$  seja observada como uma fase estável. Com este objectivo, investigámos em seguida o comportamento termotrópico de um álcool primário de cadeia mais longa, 1-docosanol.

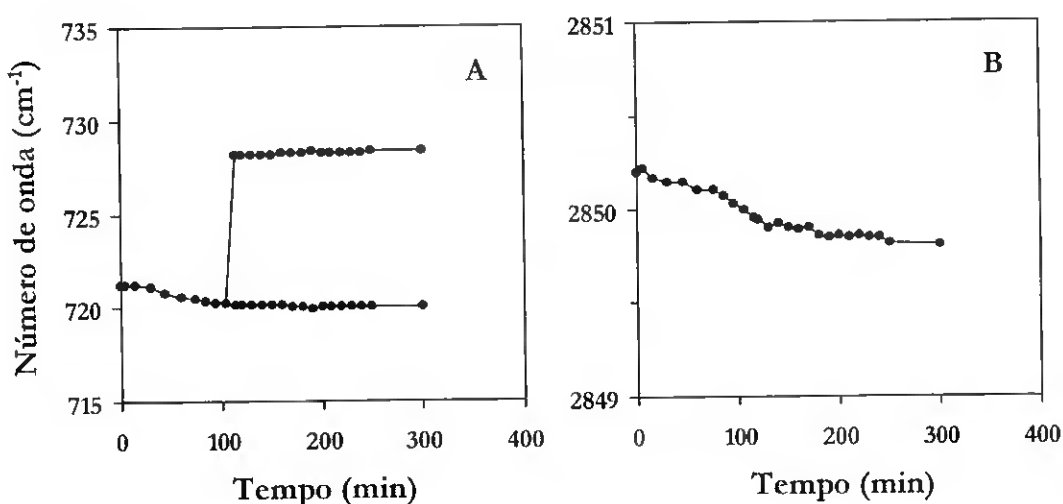
Antes dos estudos de FTIR, foi feita a caracterização termodinâmica da fusão e da cristalização de 1-docosanol, por DSC. Os termogramas de aquecimento e arrefecimento registados por DSC para 1-docosanol foram muito semelhantes aos observados para 1-tetradecanol e 1-octadecanol e deles se obtiveram as temperaturas características  $T_f$  de 71,0 °C,  $T_c$  de 70,5 °C e  $T_v$  de 63,7 °C. Tal como no caso dos álcoois mais curtos, a entalpia da transição endotérmica registada na fusão foi idêntica à soma das entalpias das duas transições exotérmicas registadas durante a cristalização. A entalpia associada à primeira transição exotérmica,  $\Delta H_c$ , foi de 53,1 kJ mol<sup>-1</sup>, enquanto que a entalpia associada à segunda transição exotérmica,  $\Delta H_v$ , foi de 25,8 kJ mol<sup>-1</sup>.

Após a caracterização termodinâmica por DSC, a cristalização de 1-docosanol foi seguida por FTIR utilizando o método já descrito para o mesmo estudo com 1-tetradecanol e 1-octadecanol. No caso de 1-docosanol, o espectro FTIR característico de uma fase  $S_{\text{HEX}}$  foi obtido à temperatura de 67 °C e a sua estabilidade foi monitorizada ao longo do tempo (Figura 3.10). Ao cabo de mais de 8 horas de incubação da fase  $S_{\text{HEX}}$  à referida temperatura, não foram registadas alterações na posição das bandas de absorção relativas aos modos vibracionais  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$ , concluindo-se que o sólido  $S_{\text{HEX}}$  formado por 1-docosanol é estável a 67 °C, a uma temperatura entre  $T_c$  e  $T_i$  experimentais. Repetindo a experiência mas incubando, agora, a fase  $S_{\text{HEX}}$  de 1-docosanol a 66 °C, observou-se o deslocamento das bandas  $\gamma\text{CH}_2\text{s}$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  para posições encontradas no espectro de uma fase  $S_{\text{ORT}}$  ao cabo de cerca de 2 horas (Figura 3.11).



**Figura 3.10.** Estabilidade da fase  $S_{\text{HEX}}$  observada para 1-docosanol a 67 °C. A posição das bandas correspondentes aos modos de vibração  $\gamma\text{CH}_2$  (A) e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (B) foi registrada em função do tempo de incubação a esta temperatura.

Os resultados mostram que a estabilidade da fase  $S_{\text{HEX}}$  e a cinética da sua transformação em fase  $S_{\text{ORT}}$  dependem da proximidade entre a temperatura a que esta é observada e a temperatura de transição  $T_c$ . A cinética da transição  $S_{\text{HEX}} \rightarrow S_{\text{ORT}}$  é demasiado lenta para que se registem condições de equilíbrio de composição de fases durante o arrefecimento, provavelmente em consequência do sobre-arrefecimento da fase  $S_{\text{HEX}}$ .



**Figura 3.11.** Estabilidade da fase  $S_{\text{HEX}}$  observada para 1-docosanol a 66 °C. A posição das bandas correspondentes aos modos de vibração  $\gamma\text{CH}_2$  (A) e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (B) foi registrada em função do tempo de incubação a esta temperatura.

Apesar de a transição  $S_{\text{ORT}} \rightarrow S_{\text{HEX}}$  não ser detectada durante a fusão, existem alguns indícios de que esta ocorre, embora a uma temperatura muito próxima de  $T_f$ , pois assim se explicaria que a entalpia da transição endotérmica seja idêntica à entalpia total das transições exotérmicas. É plausível que a histerese observada entre fusão e cristalização para estes álcoois seja devida ao sobre-aquecimento da fase  $S_{\text{ORT}}$  durante a fusão e ao sobre-arrefecimento da fase  $S_{\text{HEX}}$  durante a cristalização. Em conclusão, a elevada proximidade entre as temperaturas de fusão e de transição, aliada a fenómenos de sobre-aquecimento e sobre-arrefecimento das fases sólidas, determinam que a fase  $S_{\text{HEX}}$  não seja detectada durante a fusão de 1-tetradecanol, 1-octadecanol e 1-docosanol, e que seja observada como uma fase não estável durante a cristalização destes compostos a temperaturas suficientemente próximas da temperatura  $T_t$  determinada experimentalmente.

## 3.6 Resultados dos Estudos da Mistura (1-Tetradecanol + 1-Octadecanol)

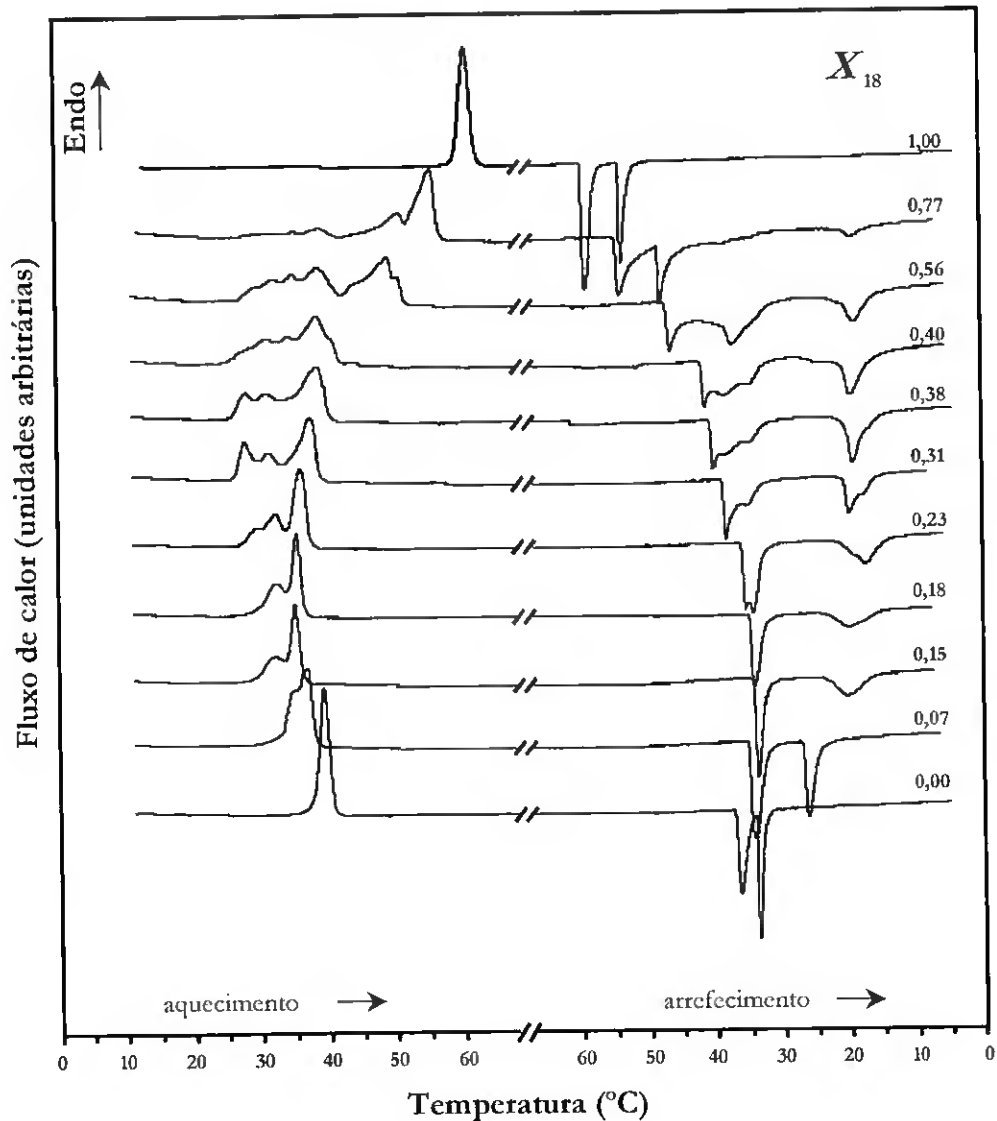
### 3.6.1 Comportamento termotrópico observado por DSC

O comportamento de fases da mistura binária composta por 1-tetradecanol e 1-octadecanol foi inicialmente estudado por DSC. Obtiveram-se termogramas de aquecimento e de arrefecimento para misturas de diferente composição em fracção molar de 1-octadecanol ( $X_{18}$ ), para temperaturas entre 0 e 70 °C. Os termogramas obtidos para o aquecimento e o arrefecimento de algumas das misturas analisadas são apresentados na Figura 3.12.

Os termogramas de aquecimento das misturas diferiram bastante dos de arrefecimento, tanto no que diz respeito ao número como à posição das transições registadas. A maior parte das misturas estudadas apresentaram várias transições largamente sobrepostas em temperatura, tanto na fusão, como na cristalização. Misturas de composição próxima da de álcoois puros fundiram com uma só transição endotérmica, enquanto que a cristalização foi completada com duas transições exotérmicas.

Tal como para os álcoois puros, também no caso das misturas se observou histerese entre a fusão e a cristalização. Em todas as misturas estudadas, a entalpia total de fusão foi

idêntica à entalpia total de cristalização (com um desvio de 5% em média para 23 misturas diferentes). Conclui-se, pois, que os processos registados durante a fusão e a cristalização foram reversíveis e completados dentro da gama de temperaturas observada.



**Figura 3.12.** Termogramas de DSC obtidos para o aquecimento e arrefecimento de misturas de 1-tetradecanol + 1-octadecanol de várias composições,  $X_{18}$ .

As temperaturas de início ( $T_{\text{início}}$ ) e de fim ( $T_{\text{fim}}$ ) das transições endotérmicas registadas nos termogramas de aquecimento, e das transições exotérmicas registadas nos termogramas de arrefecimento das várias misturas estudadas, bem como a respectiva entalpia total de transição ( $\Delta H_{\text{total}}$ ), podem ser consultadas na Tabela 3.2.

Na maior parte das misturas,  $\Delta H_{\text{total}}$  referente às transições exotérmicas foi ligeiramente superior a  $\Delta H_{\text{total}}$  referente às transições endotérmicas. A diferença foi, em média, inferior a  $3 \text{ kJ mol}^{-1}$ , valor que é superior ao erro associado à medição de  $\Delta H$  por integração dos picos de fluxo de calor, o qual foi de  $0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Esta diferença sistemática foi atribuída a alguma dificuldade em determinar  $T_{\text{fim}}$  para as transições exotérmicas nos termogramas de arrefecimento, a qual se traduziu numa subestimação sistemática de  $\Delta H_{\text{total}}$  para estas transições.

Algumas das transições registadas nos termogramas de aquecimento e de arrefecimento são isotérmicas numa larga gama de composições de mistura. Estas transições correspondem, provavelmente, a transições no estado sólido. Dado que se observa polimorfismo do estado sólido em 1-tetradecanol e 1-octadecanol no estado puro, o mesmo se pode verificar no caso da mistura destes dois álcoois, pelo menos para algumas das composições do sistema.

Demonstrou-se anteriormente que, por ser extremamente lenta no caso dos álcoois puros, a cinética de conversão  $S_{\text{HEX}}-S_{\text{ORT}}$  origina o sobre-arrefecimento da fase  $S_{\text{HEX}}$  durante a cristalização dos álcoois. Dado que podem não se verificar condições de equilíbrio de composição de fases durante o arrefecimento, consideraram-se apenas os resultados dos termogramas de aquecimento para a definição do diagrama de fases do equilíbrio sólido-líquido do sistema binário composto por 1-tetradecanol e 1-octadecanol. As temperaturas  $T_{\text{início}}$  e  $T_{\text{fim}}$  obtidas dos termogramas de aquecimento das várias misturas estudadas foram representadas graficamente em função da composição da mistura, na Figura 3.13.

A temperatura em que se completa a fusão define a linha de *liquidus* no diagrama de fases do sistema. Esta define a fronteira entre uma região de fase líquida e uma região de coexistência da fase líquida e de uma fase sólida. O mínimo na linha do *liquidus* observado no diagrama da Figura 3.13 indica que o diagrama de fases é do tipo eutético e corresponde à temperatura de fim de fusão de uma mistura de composição  $X_{18} = 0,18$ , indicando, assim, que a composição eutética,  $X_{\text{E}}$ , é próxima deste valor. A esta composição correspondeu, também, um mínimo de  $\Delta H_{\text{total}}$  (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Temperatura de início,  $T_{\text{início}}$ , temperatura de fim,  $T_{\text{fim}}$ , e entalpia total,  $\Delta H_{\text{total}}$ , relativas às transições endotérmicas e exotérmicas registadas para misturas de 1-tetradecanol e 1-octadecanol de composição (fracção molar de 1-octadecanol)  $X_{18}$ .

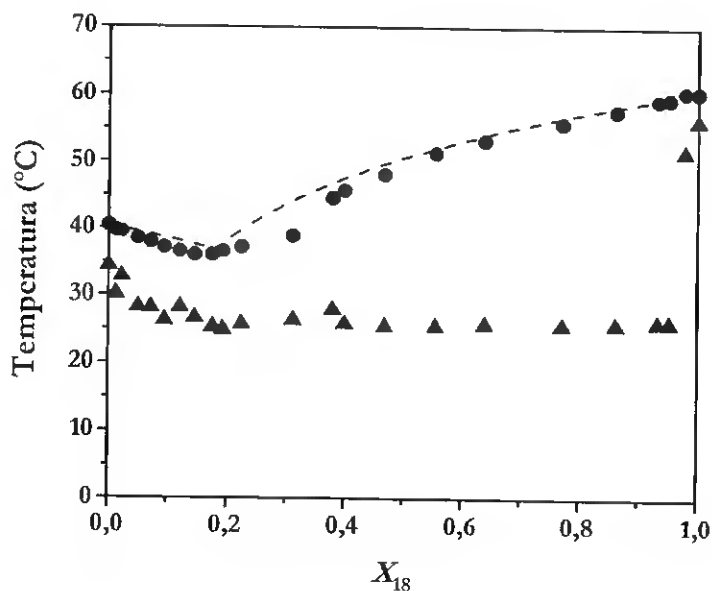
$X_{18}$	Transições endotérmicas <sup>a</sup>			Transições exotérmicas <sup>b</sup>		
	$T_{\text{início}}$ (°C)	$T_{\text{fim}}$ (°C)	$\Delta H_{\text{total}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_{\text{início}}$ (°C)	$T_{\text{fim}}$ (°C)	$\Delta H_{\text{total}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
0,00	34,2	40,4	45,4	37,6	31,0	45,4
0,01	30,0	39,7	43,5	37,1	22,1	45,1
0,02	32,7	39,5	43,5	36,8	22,7	44,4
0,05	28,2	38,5	42,9	35,5	17,9	44,6
0,07	28,1	37,9	42,0	34,9	16,5	43,8
0,10	26,2	37,1	42,0	34,3	16,0	44,0
0,12	28,2	36,6	41,8	33,9	16,0	42,8
0,15	26,5	36,0	42,2	34,2	12,5	43,2
0,18	25,2	36,0	40,2	34,4	11,8	42,4
0,19	24,8	36,5	42,5	34,8	11,9	45,9
0,23	25,7	37,2	43,2	35,6	11,2	45,5
0,31 <sup>c</sup>	26,3	38,9	43,2	37,8	14,5	48,1
0,38 <sup>c</sup>	27,9	44,6	45,3	39,6	13,7	47,2
0,40 <sup>c</sup>	25,8	45,6	44,8	40,7	13,7	53,7
0,47	25,5	48,1	48,6	42,7	11,0	53,5
0,56	25,5	51,3	48,7	45,9	11,7	53,6
0,64	25,7	53,2	50,6	48,7	12,0	53,5
0,77	25,5	55,8	54,1	52,5	12,2	53,9
0,86	25,7	57,7	50,1	55,0	11,6	55,6
0,93	26,0	59,3	54,6	56,6	12,0	56,0
0,95	26,0	59,5	58,1	57,0	11,4	59,1
0,98	51,5	60,5	61,4	57,7	46,5	64,2
1,00	56,1	60,4	64,2	58,0	48,2	63,5

<sup>a</sup>Termogramas de aquecimento; <sup>b</sup>Termogramas de arrefecimento; <sup>c</sup>Termogramas obtidos a uma velocidade de varrimento de 0,2 °C min<sup>-1</sup>.

Numa mistura binária com comportamento ideal, os componentes formam uma solução líquida e a linha do *liquidus* de um diagrama de fases eutético ideal é definida pelas equações de solubilidade ideal de cada componente do sistema. Para cada um dos componentes:

$$\ln X_A = \frac{\Delta H_{f,A}}{R} \left( \frac{1}{T_{f,A}} - \frac{1}{T} \right) \quad (3.1)$$

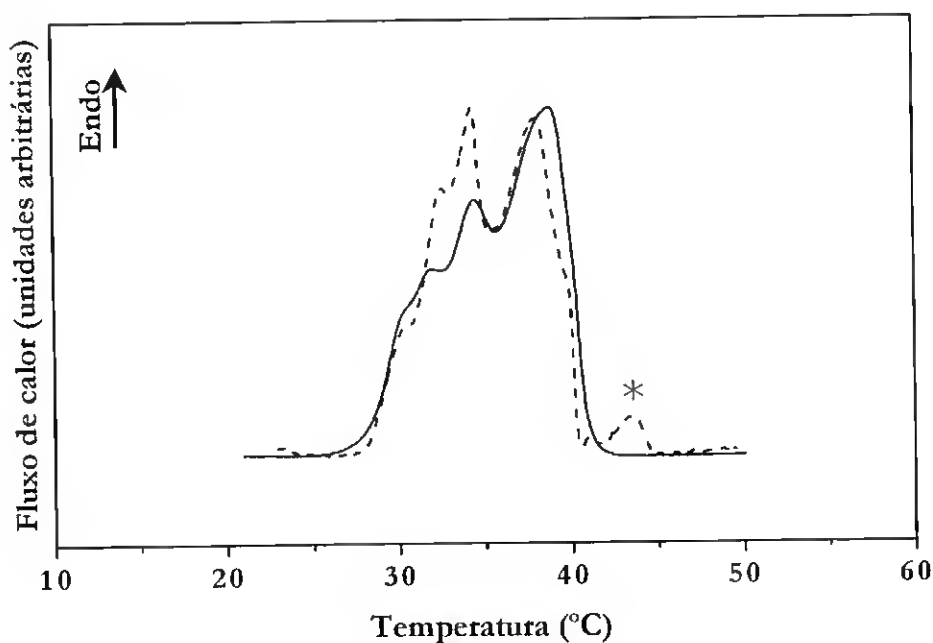
representando  $X_A$ , a fracção molar do componente A,  $\Delta H_{f,A}$ , a sua entalpia molar de fusão,  $T_{f,A}$ , a temperatura de fusão, e R, a constante dos gases perfeitos. O ponto eutético é definido pela intercepção das linhas definidas pelas equações que descrevem a solubilidade ideal dos dois componentes da mistura binária. No diagrama da Figura 3.13, representa-se a tracejado a linha do *liquidus* prevista pelas equações de solubilidade ideal de 1-tetradecanol e 1-octadecanol, calculada a partir dos parâmetros  $\Delta H_{\text{total}}$  e  $T_{\text{fim}}$  retirados dos respectivos termogramas de aquecimento, apresentados na Tabela 3.2.



**Figura 3.13.** Temperaturas  $T_{\text{inicio}}$ , (▲) e  $T_{\text{fim}}$ , (●) para o derretimento de misturas de (1-tetradecanol + 1-octadecanol), retiradas de termogramas de DSC obtidos a uma velocidade de varrimento de  $1^\circ\text{C min}^{-1}$ . Os dados relativos às misturas  $X_{18} = 0,31, 0,38$  e  $0,40$  foram obtidos a uma velocidade de varrimento de  $0,2^\circ\text{C min}^{-1}$  (ver texto). A linha a tracejado corresponde à linha de *liquidus* definida pela Equação (3.1) aplicada a cada componente.

A linha do *liquidus* que descreve o comportamento ideal do sistema binário apresenta um mínimo para uma composição correspondente a  $X_{18} = 0,18$  e uma temperatura de  $36,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A composição eutética,  $X_E$ , obtida por resolução das equações de solubilidade ideal é idêntica à composição eutética indicada pelos resultados experimentais. No entanto, registaram-se desvios ao comportamento ideal para a maior parte das composições da mistura, nomeadamente entre  $X_{18} = 0,07$  e  $X_{18} = 0,47$ . Estes desvios foram particularmente acentuados para misturas de composição entre  $X_{18} = 0,23$  e  $X_{18} = 0,40$ .

Com o objectivo de investigar os desvios ao comportamento ideal, foram obtidos novos termogramas para as misturas de composição  $X_{18} = 0,31$ ,  $0,38$  e  $0,40$  à velocidade de varrimento de  $0,2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Nestas condições, as misturas de composição  $X_{18} = 0,31$  e  $0,40$  apresentaram valores de  $T_{\text{início}}$  e  $T_{\text{fim}}$  de fusão semelhantes ( $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aos obtidos a uma velocidade de varrimento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . No entanto, o termograma obtido a  $0,2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  para a mistura de composição  $X_{18} = 0,38$  foi bastante diferente do obtido a  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Com a velocidade de varrimento mais baixa, foi identificada uma transição endotérmica adicional, de baixa intensidade, centrada a cerca de  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ , assinalada com um asterisco na Figura 3.14.



**Figura 3.14.** Termogramas de aquecimento de uma mistura de 1-tetradecanol e 1-octadecanol,  $X_{18} = 0,38$ , obtidos à velocidade de varrimento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (linha a cheio) ou de  $0,2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (linha a tracejado). Assinala-se, com asterisco, a transição endotérmica registada só à velocidade de varrimento de  $0,2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Os valores de  $T_{\text{início}}$  e de  $T_{\text{fim}}$  das misturas de composição  $X_{18} = 0,31, 0,38$  e  $0,40$  que foram considerados para a construção do diagrama de fases foram os obtidos à velocidade de varrimento de  $0,2 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ .

Em sistemas eutéticos regista-se imiscibilidade total ou parcial dos componentes no estado sólido. No diagrama da Figura 3.13 constata-se que, para a maior parte das composições do sistema, o processo de derretimento se iniciou a uma temperatura próxima de  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Podemos, pois, concluir que a temperaturas inferiores a  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$  apenas estão presentes fases sólidas. No entanto, para misturas com composição entre  $X_{18} = 0,09$  e  $X_{18} = 0,95$ , algumas das transições endotérmicas observadas entre  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$  e a linha de *liquidus* são isotérmicas (Figura 3.12), e podem corresponder a transições entre polimorfos do estado sólido. Nesta perspectiva, é possível que a linha que define o *solidus*, a fronteira entre a região do diagrama de fases onde se identificam fases sólidas e a região onde se verifica coexistência de sólido e de líquido, se localize acima de  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Para a maior parte das composições possíveis de um sistema eutético, a fusão é iniciada à temperatura eutética,  $T_E$ . Os resultados obtidos por DSC só por si não permitem a definição de  $T_E$  pois algumas das transições registadas no aquecimento das misturas que iniciam o seu derretimento a  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$  poderão corresponder a transições entre polimorfos do estado sólido que ocorrem a temperaturas inferiores a  $T_E$ . Procurou-se, pois, definir melhor a posição do *solidus* no diagrama de fases do sistema binário recorrendo à caracterização do comportamento de fases do sistema por FTIR, conforme já descrito para o estudo do comportamento de fases dos álcoois puros. Os resultados destes estudos são apresentados em seguida.

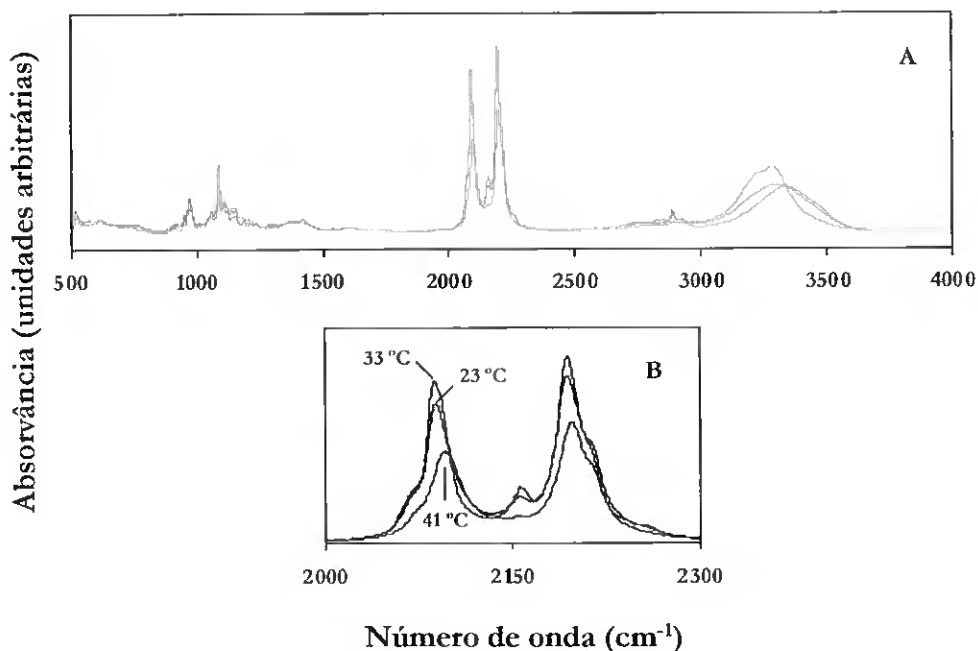
### 3.6.2 Comportamento de fases observado por FTIR

De modo a definir melhor o diagrama de fases da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol), realizaram-se estudos de FTIR em misturas de composição seleccionada. Com o objectivo de distinguir o comportamento de fases de cada um dos componentes da mistura individualmente, os estudos de FTIR foram realizados utilizando um dos componentes perdeuterado.

A substituição de hidrogénio pelo isótopo deutério nos compostos deuterados tem como consequência a diminuição da frequência de vibração dos vários modos vibracionais respeitantes aos grupos metilo e metileno. As bandas relativas aos modos de vibração de

*stretching* simétrico e assimétrico dos grupos  $\text{CD}_2$  e  $\text{CD}_3$  são registadas a  $2000\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ , uma região em que não se registam bandas de absorção de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  interferentes. Tal como a banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$ , a banda  $\nu\text{CD}_2\text{s}$ , registada a  $2089\text{ cm}^{-1}$  para *n*-alcanos, é afectada por alterações de conformação molecular e a sua observação tem sido utilizada em estudos do comportamento termotrópico de componentes deuterados em misturas lipídicas (Casal e Mantsch, 1984).

Em analogia com as bandas  $\gamma\text{CH}_2$ , as bandas  $\gamma\text{CD}_2$  correspondentes são sensíveis a acoplamentos vibracionais entre moléculas adjacentes. A banda mais intensa associada ao modo de vibração  $\gamma\text{CD}_2$  surge na região de  $600\text{--}690\text{ cm}^{-1}$  (Maroncelli *et al.*, 1985), a qual é bastante distinta da região onde se observa a banda  $\gamma\text{CH}_2$  mais intensa ( $700\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ ). No entanto, comparando a Figura 3.5 com a Figura 3.15 pode constatar-se que a banda  $\gamma\text{CD}_2$  coincide com algumas bandas de absorção relativas a outros modos vibracionais de grupos  $\text{CH}_2$ , o que dificulta a sua utilização quando se pretende estudar misturas de compostos deuterados e não deuterados.



**Figura 3.15.** Espectros de FTIR obtidos para 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  a  $41\text{ }^\circ\text{C}$  (fase líquida, L),  $33\text{ }^\circ\text{C}$  (fase  $\text{S}_{\text{HEX}}$ ) e a  $23\text{ }^\circ\text{C}$  (fase  $\text{S}_{\text{ORT}}$ ), durante a cristalização do composto (A). Destacam-se as regiões onde se registam as bandas de vibração  $\nu\text{CD}_2\text{s}$  (B). Espectros semelhantes foram registados para 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$ , a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  (fase líquida, L),  $53\text{ }^\circ\text{C}$  (fase  $\text{S}_{\text{HEX}}$ ) e  $45\text{ }^\circ\text{C}$  (fase  $\text{S}_{\text{ORT}}$ ).

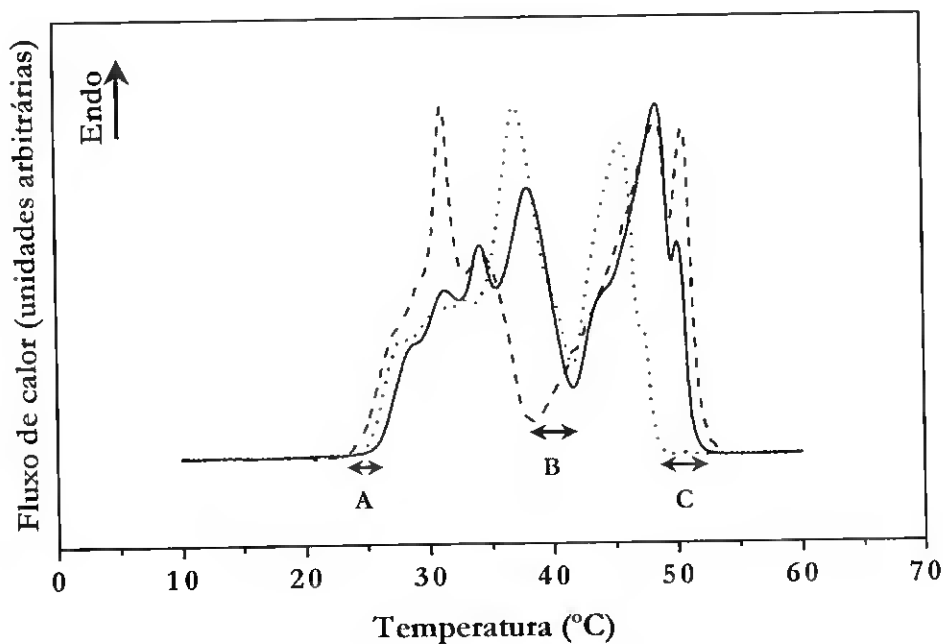
Em misturas binárias em que um dos componentes é perdeuterado, é possível observar em simultâneo o comportamento de fases de cada um dos componentes através do registo da posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  e da banda  $\nu\text{CD}_2\text{s}$  em função da temperatura. A transição entre os polimorfos  $S_{\text{HEX}}$  e  $S_{\text{ORT}}$  só pode ser claramente localizada em temperatura recorrendo à monitorização da posição da banda  $\gamma\text{CH}_2$ , uma vez que este tipo de transição não afecta significativamente a posição da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$ . Uma vez que se optou por não seguir o comportamento da banda  $\gamma\text{CD}_2$ , só o comportamento de fases do componente não deuterado é que pode ser completamente caracterizado pelo que, para definir o comportamento de fases de uma mistura seleccionada, foi necessário estudar duas misturas de igual composição, uma de (1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  + 1-octadecanol) e outra de (1-tetradecanol + 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$ ).

Os termogramas de aquecimento e de arrefecimento obtidos por DSC para 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  e 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$  (resultados não apresentados) mostraram que estes álcoois possuem um comportamento termotrópico idêntico ao dos respectivos álcoois não deuterados. No entanto, a perdeuteração dos álcoois traduziu-se numa diminuição das temperaturas de transição de cerca de 3 °C. O efeito da perdeuteração, vai, certamente, reflectir-se no comportamento termotrópico de uma mistura binária de álcoois em que um deles seja perdeuterado. Apesar disso, numa mistura de um álcool perdeuterado com um não deuterado, o comportamento do álcool não deuterado deverá ser qualitativamente semelhante ao seu comportamento numa mistura de álcoois não deuterados, pelo que se considerou ser de utilidade o estudo destas misturas por FTIR. O comportamento do componente perdeuterado pode ser extrapolado para o de um álcool não deuterado homólogo descontando o efeito da deuteração nas temperaturas de transição registadas. Foram estudadas as misturas de composição  $X_{18} = 0,50$ , superior a  $X_E$ , e  $X_{18} = 0,09$ , inferior a  $X_E$ , como misturas representativas de cada uma das regiões do diagrama de fases onde se regista coexistência de fases líquida e sólida (Figura 3.13).

### 3.6.3 Efeito da perdeuteração de um dos componentes da mistura

De modo a avaliar a extensão da influência da perdeuteração de um dos componentes no comportamento termotrópico da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol), compararam-se os termogramas de aquecimento de misturas de composição  $X_{18} = 0,56$ , com 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  ou 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$  e, ainda, da mistura dos dois álcoois não deuterados, na Figura 3.16. A gama de temperaturas para as quais se registaram as transições endotérmicas das várias

misturas referidas foi diferente. Enquanto que uma mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol fundiu entre 25,3 °C e 51,8 °C, a mistura de 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> + 1-octadecanol fundiu entre 23,6 °C e 52,8 °C, ao passo que a mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub> fundiu entre 25,0 °C e 48,7 °C. Além das diferenças em  $T_{\text{início}}$  e  $T_{\text{fim}}$ , são notórias, também, diferenças no perfil das transições endotérmicas dos termogramas de aquecimento obtidos para as três misturas. Apesar disso, em todas elas distinguem-se dois conjuntos de transições largamente sobrepostas, e que se destacam a temperaturas diferentes consoante a mistura em questão: enquanto que nas misturas de 1-tetradecanol + 1-octadecanol e de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub>, esses conjuntos se destacam a uma temperatura de 42 °C, na mistura de 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> + 1-octadecanol a separação ocorre a uma temperatura mais baixa, próxima de 38 °C (Figura 3.16-B). Também  $T_{\text{início}}$  para esta última mistura foi inferior ao verificado para as outras misturas (Figura 3.16-A). No que diz respeito a  $T_{\text{fim}}$ , a mais baixa foi a da mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub> (Figura 3.16-C).



**Figura 3.16.** Termogramas de aquecimento obtidos para misturas  $X_{18} = 0,56$  compostas por 1-tetradecanol + 1-octadecanol (linha a cheio), 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> + 1-octadecanol (linha a tracejado), e 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub> (linha a ponteadado). A velocidade de varrimento foi de 1 °C min<sup>-1</sup>.

A substituição de 1-tetradecanol por 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> teve como consequência a redução de  $T_{\text{início}}$ , verificando-se também uma redução na temperatura à qual se iniciou o segundo grupo de transições endotérmicas, mas não alterou  $T_{\text{fim}}$ . Por sua vez, a substituição de 1-octadecanol por 1-octadecanol-D<sub>37</sub> levou à redução de  $T_{\text{fim}}$  mas não afectou  $T_{\text{início}}$  nem a temperatura a que se destacaram os dois grupos de transições. Atendendo a que os álcoois perdeuterados possuem temperaturas de transição inferiores à dos seus homólogos não deuterados, é de esperar que as transições registadas em fases constituídas pelo componente perdeuterado ocorram a temperaturas inferiores às transições registadas para as mesmas fases compostas por álcoois não deuterados. Assim, as diferenças entre os termogramas das três misturas da Figura 3.16 são compatíveis com a ocorrência de separação de 1-tetradecanol e 1-octadecanol em fases sólidas diferentes. Uma dessas fases sólidas será, provavelmente, composta maioritariamente por 1-tetradecanol enquanto na outra o componente mais abundante será 1-octadecanol.

As transições endotérmicas reunidas no primeiro grupo de transições foram mais influenciadas pela perdeuteração do componente com 14 átomos de carbono, ao passo que as transições do segundo grupo foram mais influenciadas pela perdeuteração do componente com 18 átomos de carbono. A interpretação do comportamento de fases de misturas em que um dos álcoois é perdeuterado terá de ter em conta estas observações.

### 3.6.4 Estudos de FTIR para a mistura $X_{18} = 0,50$

Prepararam-se misturas de 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> + 1-octadecanol e de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub> de composição  $X_{18} = 0,50$  e registou-se o seu espectro FTIR em função da temperatura, durante a fusão. A posição das bandas  $\gamma\text{CH}_2$  (715–735  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (2848–2856  $\text{cm}^{-1}$ ) foi utilizada para caracterizar o comportamento de fases do componente não deuterado, enquanto que o registo da posição da banda  $\nu\text{CD}_2\text{s}$  (2086–2102  $\text{cm}^{-1}$ ) permitiu observar em simultâneo o componente não deuterado. Os resultados encontram-se representados na Figura 3.17.

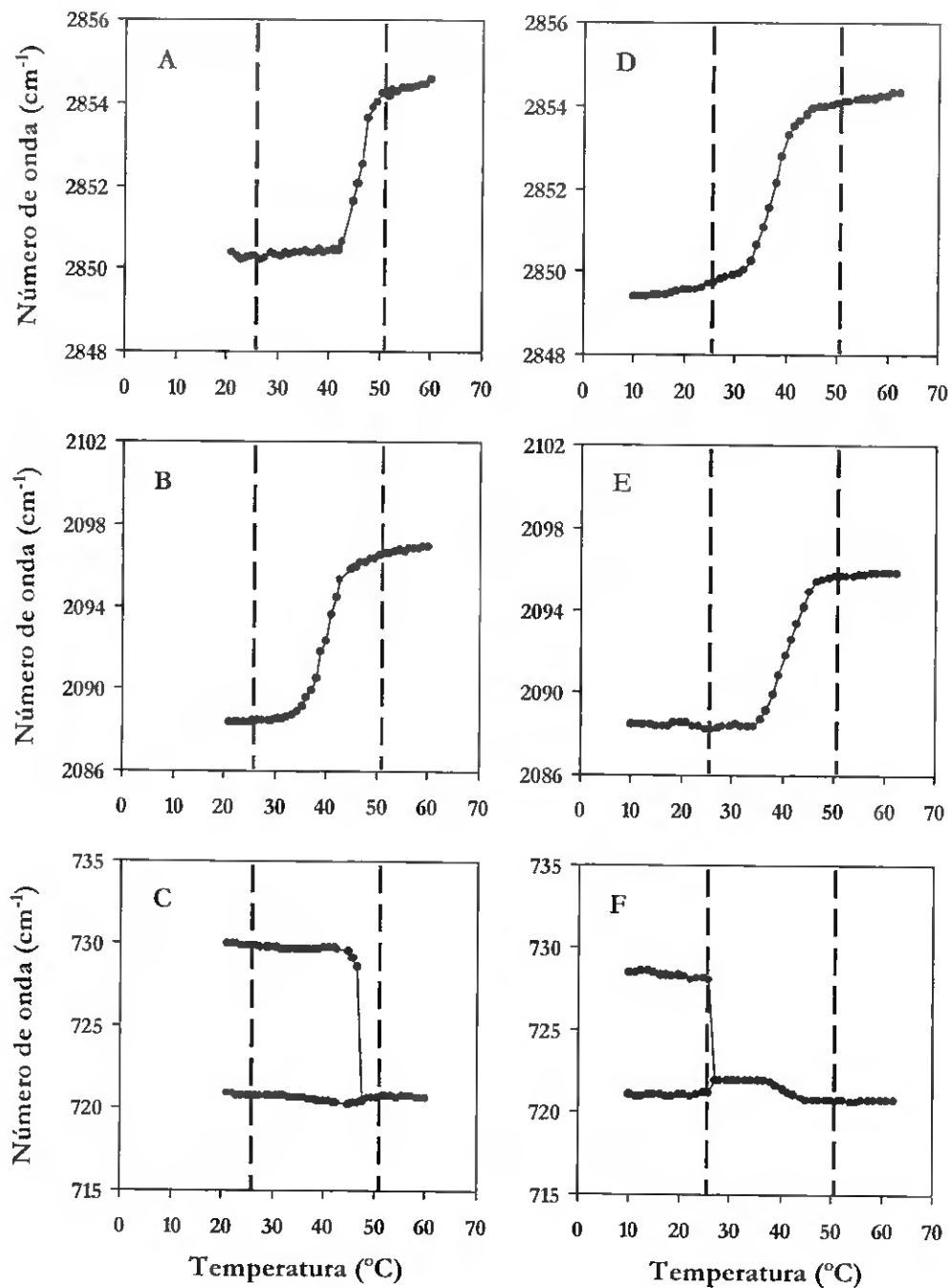
Com a mistura 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> + 1-octadecanol, observou-se um deslocamento da banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  (relativa ao componente 1-octadecanol) para números de onda superiores entre 42 e 51 °C (Figura 3.17-A). Esta alteração no espectro é indicativa da ocorrência de uma transição de fases que contém este álcool nesta gama de temperaturas. O deslocamento da

banda aparenta não ser constante, podendo notar-se na Figura 3.17-A uma variação da taxa de aumento de número de onda com a temperatura localizada a 46 °C, aproximadamente. No entanto, somente a 48 °C se observou a coalescência das duas bandas  $\nu\text{CH}_2$  devidas ao mesmo componente, surgindo em vez destas uma única banda centrada a 720,7  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3.17-C). O deslocamento da banda  $\nu\text{CD}_{2s}$  (relativa a 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$ ) para números de onda superiores, indicativo de fusão, foi registado entre 32 e 50 °C (Figura 3.17-B). Considerando o efeito da perdeuteração, o início desta transição deverá ser deslocada para uma temperatura cerca de 3 °C superior considerando uma mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol de composição equivalente.

Comparando as Figuras 3.17-A, B e C, a transição observada para a banda  $\nu\text{CD}_{2s}$  pode ser interpretada como o cumulativo de duas transições: uma, com início a 32 °C (ou a uma temperatura superior, se for tido em conta o efeito da perdeuteração de 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$ ), que corresponde à fusão de uma fase sólida rica em 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  e outra, iniciada a cerca de 46°C, que corresponde à fusão de uma fase sólida  $S_{\text{ORT}}$  rica em 1-octadecanol. A julgar pela posição da ligeira inflexão na linha da Figura 3.17-A, a fase  $S_{\text{ORT}}$  rica em 1-octadecanol será uma fracção minoritária do total de mistura que funde.

Uma vez que não se registou a posição da banda  $\nu\text{CD}_2$ , não se obteve informação quanto ao tipo de fase sólida rica em 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  que iniciou a sua fusão a 32 °C. De modo a obter informação acerca do tipo de fase sólida constituída maioritariamente por 1-tetradecanol, bem como do seu comportamento, realizou-se uma experiência semelhante à anterior, agora com uma mistura  $X_{18}=0,5$  composta por 1-tetradecanol + 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$ .

Observando a banda  $\nu\text{CH}_2s$  (relativa ao componente 1-tetradecanol) constata-se a ocorrência de uma transição de fase entre 32 e 45 °C, indicada pelo desvio desta banda para números de onda superiores (Figura 3.17-D). Aparentemente, esta transição não foi monotónica e o deslocamento na posição desta banda verificado entre 40 e 45 °C pode ser devido a uma transição de fase diferente da que foi iniciada a 32 °C. Estas observações são concordantes com a observação de uma transição também não monotónica registada para 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  na respectiva mistura (Figura 3.17-B).



**Figura 3.17.** Posição das bandas do espectro FTIR correspondentes aos modos de vibração  $\gamma\text{CH}_2$  (715–735  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu\text{CD}_{2\text{S}}$  (2086–2102  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{CH}_{2\text{S}}$  (2848–2856  $\text{cm}^{-1}$ ) de uma mistura de 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  + 1-octadecanol (A, B e C) e de uma mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$  (D, E e F), ambas de composição  $X_{18} = 0,50$ , durante o aquecimento. As linhas a tracejado indicam  $T_{\text{início}}$  e  $T_{\text{fim}}$  de fusão obtidas do termograma de aquecimento de uma mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol com a mesma composição.

Na mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub>, a coalescência de duas bandas  $\nu\text{CH}_2$  (relativas ao componente 1-tetradecanol) iniciou-se a 26 °C, indicando que a essa temperatura ocorre o desaparecimento de uma fase S<sub>ORT</sub> (Figura 3.17-F). No entanto, não se registou o desaparecimento de uma fase S<sub>ORT</sub> composta por 1-octadecanol à mesma temperatura (comparar as Figuras 3.17-C e 3.17-F), de onde se concluiu que o sólido S<sub>ORT</sub> que desaparece a 26 °C na mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub> é composto maioritariamente por 1-tetradecanol. Assim sendo, na outra mistura, 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> + 1-octadecanol, o sólido rico em 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> que começa a fundir a 32 °C (Figura 3.17-B) deve ser um sólido do tipo S<sub>HEX</sub> e terá de ser resultante da transformação de um sólido S<sub>ORT</sub> enriquecido em 1-tetradecanol-D<sub>29</sub> de igual composição.

Finalmente, a banda  $\nu\text{CD}_2\text{s}$  relativa a 1-octadecanol-D<sub>37</sub> (Figura 3.17-E) indica uma transição entre 35 e 46 °C correspondente à fusão de uma fase rica neste componente. Esta transição foi praticamente sobreposta pela transição observada para 1-tetradecanol na mesma mistura (Figura 3.17-D). No entanto, tendo em consideração o efeito da perdeuteração, as temperaturas que delimitam a transição registada na Figura 3.17-E, e em particular a temperatura a que esta se inicia, deverão ser mais elevadas numa mistura em que 1-octadecanol não seja deuterado.

Em resumo, e extrapolando os resultados obtidos para o caso de uma mistura de álcoois não deuterados, 1-tetradecanol + 1-octadecanol, de composição  $X_{18} = 0,50$ , conclui-se que: a) a baixas temperaturas, coexistem duas fases sólidas S<sub>ORT</sub>, uma rica em 1-octadecanol e outra onde predomina 1-tetradecanol; b) no início do derretimento da mistura, a fase rica em 1-tetradecanol sofre uma transição S<sub>ORT</sub>-S<sub>HEX</sub> a temperaturas relativamente baixas, entre 26 °C, conforme indicado por FTIR, e 25 °C, como observado por DSC (Figura 3.13); c) a fase S<sub>HEX</sub> rica em 1-tetradecanol, inicia a sua fusão a 32 °C, ou a uma temperatura ligeiramente superior, tendo em conta o efeito da perdeuteração de um dos componentes no comportamento das misturas estudadas por FTIR, definindo assim a posição do *solidus* e  $T_E$ ; d) entre 25-26 °C e cerca de 32 °C, coexistem duas fases sólidas, uma do tipo S<sub>HEX</sub>, rica em 1-tetradecanol e outra do tipo S<sub>ORT</sub>, rica em 1-octadecanol; e) entre cerca de 32°C e o *liquidus*, estabelecido a 51 °C por FTIR (Figura 3.17-A) e por DSC (Figura 3.13), encontra-se uma fase S<sub>ORT</sub> enriquecida em 1-octadecanol em equilíbrio com uma fase líquida enriquecida em 1-tetradecanol.

A anterior interpretação dos resultados é substanciada pelos resultados das experiências de DSC, uma vez que nos termogramas de aquecimento se observou uma transição

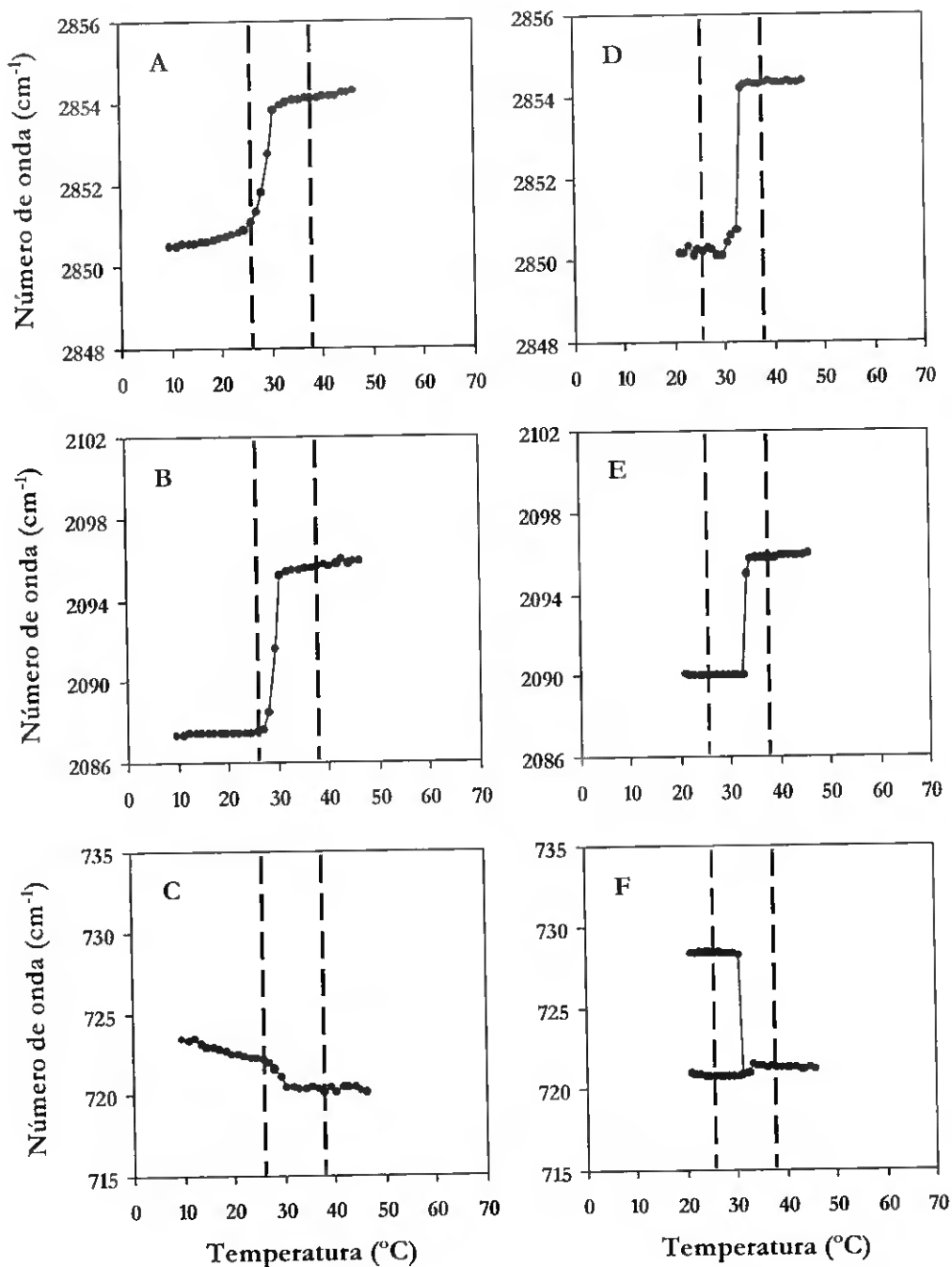
endotérmica sensivelmente a 32 °C numa vasta gama de composições da mistura, nomeadamente entre  $X_{18}=0,15$  e  $X_{18}=0,77$  (Figura 3.12). As conclusões retiradas dos estudos de FTIR são também concordantes com os resultados dos estudos de DSC realizados para as misturas de  $X_{18} = 0,56$  (Figura 3.16).

### 3.6.5 Estudos de FTIR para a mistura $X_{18} = 0,09$

O estudo do comportamento de fases de misturas de 1-tetradecanol- $D_{29}$  + 1-octadecanol e de 1-tetradecanol + 1-octadecanol- $D_{37}$  de composição  $X_{18} = 0,09$  foi feito utilizando o método descrito anteriormente para o estudo das misturas de composição  $X_{18} = 0,50$ . Os resultados são apresentados na Figura 3.18.

Durante o estudo da mistura de 1-tetradecanol- $D_{29}$  + 1-octadecanol foi observado um deslocamento simultâneo das bandas  $\nu$  CH<sub>2s</sub> (relativa a 1-octadecanol) e  $\nu$  CD<sub>2s</sub> (relativa a 1-tetradecanol- $D_{29}$ ) para números de onda mais elevados, entre 27 e 33 °C (Figura 3.18-A e B). Numa mistura de álcoois não deuterados estas temperaturas deverão corresponder a cerca de 30 e 36 °C, respectivamente, considerando o efeito da perdeuteração do componente presente em fracção maioritária na mistura (1-tetradecanol- $D_{29}$ ). Nesta mistura, não foi registado o acoplamento de vibração  $\gamma$ CH<sub>2</sub>, o qual se traduz no aparecimento de duas bandas muito próximas, que caracteriza o espectro da fase S<sub>ORT</sub> (Figura 3.18-C). Foi visível um deslocamento da banda  $\gamma$ CH<sub>2</sub> para números de onda inferiores à medida que se aumentou a temperatura indicando algum rearranjo molecular numa fase sólida não rotacional.

No caso da mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol- $D_{37}$ , foi detectada uma transição de fase entre 33 °C e 36 °C (Figura 3.18-D e E), a qual afectou simultaneamente a posição das bandas  $\nu$  CH<sub>2s</sub> (relativa a 1-tetradecanol) e  $\nu$  CD<sub>2s</sub> (relativa a 1-octadecanol- $D_{37}$ ). Esta transição ocorreu num intervalo de temperaturas distinto daquele em que se verificou a coalescência de duas bandas  $\gamma$ CH<sub>2</sub>, indicativa do desaparecimento de uma fase S<sub>ORT</sub> rica em 1-tetradecanol, entre 30 e 32 °C (Figura 3.18-F). Tendo em conta que esta transição não coincidiu com a transição registada pela alteração da posição da banda  $\nu$  CH<sub>2s</sub> relativa ao mesmo componente, e considerando o comportamento de fases discutido para as misturas  $X_{18} = 0,50$ , estes resultados indicam que a fase S<sub>ORT</sub> rica em 1-tetradecanol que desaparece entre 30-32 °C deu origem a uma fase S<sub>HEX</sub> de composição idêntica, a qual só começou a fundir a 33 °C.



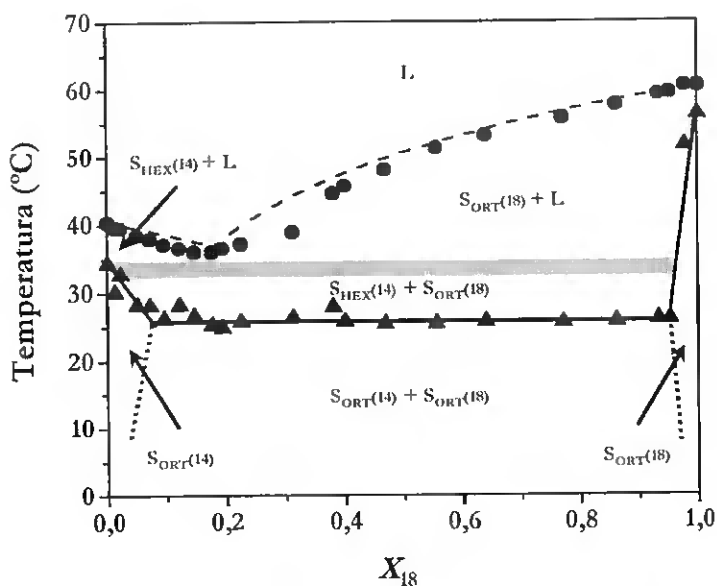
**Figura 3.18.** Posição das bandas do espectro FTIR correspondentes aos modos de vibração  $\nu\text{CH}_2$  (715–735  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu\text{CD}_{2\text{s}}$  (2086–2102  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{CH}_{2\text{s}}$  (2848–2856  $\text{cm}^{-1}$ ) de uma mistura de 1-tetradecanol- $\text{D}_{29}$  + 1-octadecanol (A, B e C) e de uma mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol- $\text{D}_{37}$  (D, E e F), ambas de composição  $X_{18} = 0,09$ , durante o aquecimento. As linhas a tracejado indicam  $T_{\text{início}}$  e  $T_{\text{fim}}$  de fusão obtidas do termograma de aquecimento de uma mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol com a mesma composição.

Notou-se uma ligeira discrepância entre as temperaturas  $T_{\text{início}}$  e  $T_{\text{fim}}$  obtidas por DSC e por FTIR para a mistura  $X_{18} = 0,09$ . De facto, a primeira das transições registada por FTIR (desaparecimento de uma fase  $S_{\text{ORT}}$  rica em 1-tetradecanol) foi observada a uma temperatura ligeiramente superior à que foi definida por DSC para  $T_{\text{início}}$  (Figura 3.13). Por outro lado,  $T_{\text{fim}}$  observada por FTIR foi ligeiramente inferior à determinada por DSC para uma mistura de composição equivalente. Esta diferença entre os resultados obtidos por DSC e FTIR pode ser resultante de 1-octadecanol (ou 1-octadecanol- $D_{37}$ , consoante o caso) estar presente em percentagem bastante reduzida, pelo que se observam predominantemente as transições entre fases em que 1-tetradecanol é o componente mais abundante. Em particular, a uma temperatura próxima de  $T_E$  deverá existir uma fase sólida  $S_{\text{ORT}}$  rica em 1-octadecanol que funde e que não foi facilmente detectada durante as experiências de FTIR.

Os resultados obtidos com as misturas  $X_{18} = 0,09$  confirmam  $T_E$  a cerca de 32 °C, ao mesmo tempo que não invalidam a conclusão anterior de que entre 25-26 °C e o *solidus* se identifique uma região em que uma fase  $S_{\text{ORT}}$  rica em 1-octadecanol coexiste com uma fase  $S_{\text{HEX}}$  rica em 1-tetradecanol. Conclui-se, ainda, que no derretimento de misturas com  $X_{18}$  inferior a  $X_E$ , se observa a coexistência de uma fase  $S_{\text{HEX}}$  rica em 1-tetradecanol e uma fase líquida na gama de temperaturas entre o *solidus* e o *liquidus*.

### 3.6.6 Diagrama de fases da mistura

Reunindo os resultados do estudo do comportamento de fases da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol), apresenta-se o diagrama de fases para o seu equilíbrio sólido-líquido, na Figura 3.19. Nele se observa a coexistência de duas fases sólidas do tipo  $S_{\text{ORT}}$ , uma rica em 1-tetradecanol e outra em 1-octadecanol, a temperaturas inferiores a 25-26 °C. A linha de *solidus* é traçada a cerca de 32 °C com uma incerteza de 2-3 °C para temperaturas superiores, devido à perdeuteração de um dos álcoois nas misturas estudadas. Entre o *solidus* e o *liquidus*, distinguem-se duas regiões de coexistência de fases líquida e sólida, uma para a região correspondente a  $X_{18}$  inferior a  $X_E$  e outra correspondente a  $X_{18}$  superior a  $X_E$ . Para composições abaixo de  $X_E$ , o sólido que coexiste com a fase líquida é um sólido  $S_{\text{HEX}}$  composto maioritariamente por 1-tetradecanol, enquanto que para composições acima de  $X_E$ , se encontra uma fase  $S_{\text{ORT}}$  composta maioritariamente por 1-octadecanol em coexistência com a fase líquida.



**Figura 3.19.** Diagrama de fases para o equilíbrio sólido-líquido do sistema binário (1-tetradecanol + 1-octadecanol), representando  $S_{ORT(14)}$ , um sólido ortorrômico rico em 1-tetradecanol,  $S_{ORT(18)}$ , um sólido ortorrômico rico em 1-octadecanol,  $S_{HEX(14)}$ , um sólido hexagonal rico em 1-tetradecanol e L, a fase líquida. A barra a sombreado representa o *solidus*, ilustrando alguma incerteza em  $T_E$ , as linhas a tracejado representam o *liquidus* e as linhas a pontilhado representam linhas de fronteira de fases sólidas de posição não determinada.

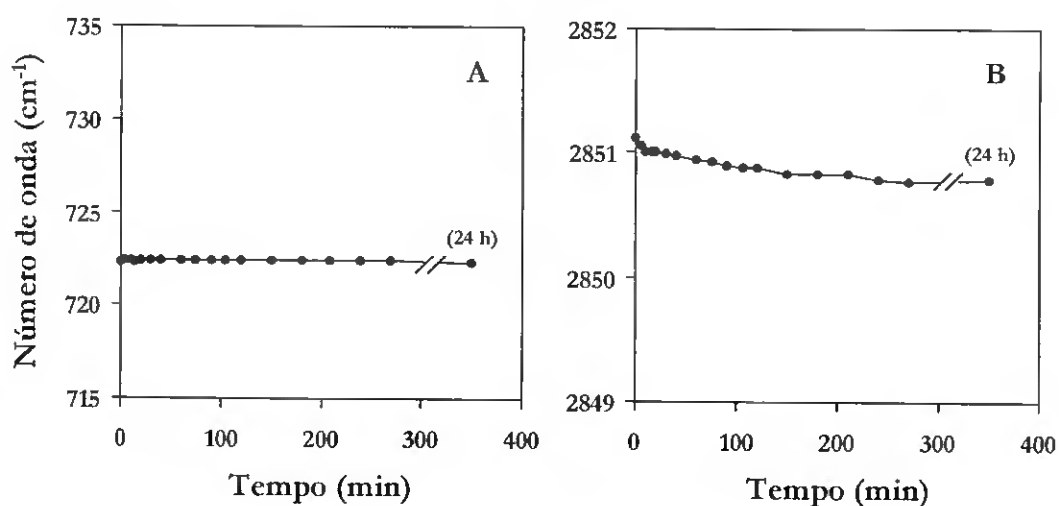
### 3.6.7 Estabilidade do sólido rotacional na mistura

No decurso de estudos de FTIR realizados para a caracterização do comportamento de fases da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol), observou-se a formação de uma fase  $S_{HEX}$  composta maioritariamente por 1-tetradecanol entre cerca de 25 °C e cerca de 32 °C. Da mesma forma que foi investigada a estabilidade da fase  $S_{HEX}$  formada pelos álcoois puros, também foi investigada a estabilidade da fase  $S_{HEX}$  rica em 1-tetradecanol que se observou no estudo da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol).

Iniciou-se o estudo seguindo a cristalização de uma mistura de composição  $X_{18} = 0,50$  de 1-tetradecanol + 1-octadecanol- $D_{37}$ , registando-se a posição das bandas  $\nu CH_2s$  e  $\gamma CH_2$  devidas a 1-tetradecanol. Uma vez atingida uma temperatura em que estas bandas apresentaram características próprias do espectro de uma fase  $S_{HEX}$ , fixou-se a temperatura e

registou-se a posição das mesmas bandas em função do tempo de incubação a essa temperatura.

Atingindo 28 °C, a banda  $\nu$  CH<sub>2s</sub> posicionou-se a 2851,1 cm<sup>-1</sup> ao mesmo tempo que se registava apenas uma banda  $\gamma$ CH<sub>2</sub> centrada a 722,3 cm<sup>-1</sup>. Simultaneamente, a banda  $\nu$  CD<sub>2s</sub> relativa ao componente 1-octadecanol-D<sub>37</sub> apresentava-se a 2089,2 cm<sup>-1</sup>, numa posição tipicamente observada para este componente numa fase sólida (do tipo S<sub>ORT</sub>, conforme concluído anteriormente). A observação da posição das bandas  $\nu$  CH<sub>2s</sub> e  $\gamma$ CH<sub>2</sub> relativas a 1-tetradecanol na mistura incubada a 28 °C permitirá concluir se a fase S<sub>HEX</sub> que contem este componente é uma fase estável ou se, pelo contrário, se transforma lentamente numa fase S<sub>ORT</sub> a esta temperatura. Os resultados desta experiência, apresentados na Figura 3.20, permitiram concluir que a fase S<sub>HEX</sub> rica em 1-tetradecanol detectada nesta mistura se comportou como uma fase estável durante um período de 24 horas de incubação a 28 °C.



**Figura 3.20** Estabilidade da fase S<sub>HEX</sub> rica em 1-tetradecanol detectada na mistura de 1-tetradecanol + 1-octadecanol-D<sub>37</sub> a 28 °C. A posição das bandas correspondentes aos modos de vibração  $\gamma$ CH<sub>2</sub> (A) e  $\nu$  CH<sub>2s</sub> (B) foi registada em função do tempo de incubação a esta temperatura.

A mesma experiência foi repetida, incubando a mistura a uma temperatura inferior, desta vez a 24 °C. A esta temperatura registou-se uma variação acentuada na posição da banda  $\nu$  CH<sub>2s</sub> ao fim de cerca de 2 horas (resultados não apresentados). No entanto, esta não foi acompanhada por alterações significativas na posição da banda  $\gamma$ CH<sub>2</sub> que se apresentou com as características registadas num espectro de uma fase S<sub>HEX</sub>. Prolongando a incubação a 24 °C

até um período de 8 horas não foi detectado o desdobramento da banda  $\gamma\text{CH}_2$  característico da transição de  $S_{\text{HEX}}$  para  $S_{\text{ORT}}$ , concluindo-se que, apesar de se ter iniciado a transformação da fase  $S_{\text{HEX}}$ , a 24 °C, o período de tempo monitorizado foi demasiado curto para que se registasse a transição completa para a fase  $S_{\text{ORT}}$ . É de referir que, prosseguindo com o arrefecimento, a transição  $S_{\text{HEX}}-S_{\text{ORT}}$  foi completada somente à temperatura de 15 °C (resultados não apresentados), muito abaixo da temperatura de início de derretimento desta mistura. Esta histerese foi observada para grande parte das composições do sistema binário estudadas (Figura 3.12) e deve-se ao sobre-arrefecimento da fase  $S_{\text{HEX}}$ , tal como anteriormente foi observado para os álcoois puros em resultado de uma cinética extremamente lenta de formação da fase  $S_{\text{ORT}}$ .

Quando a fase rotacional hexagonal identificada em álcoois de cadeia longa é apontada como metaestável, é também referido que esta fase pode ser estabilizada por pequenas quantidades de impurezas (Watanabe, 1961; Mosselman *et al.*, 1974). A fase  $S_{\text{HEX}}$  rica em 1-tetradecanol identificada entre 25 °C e 32 °C para a mistura de 1-tetradecanol e 1-octadecanol deverá conter uma fracção bastante reduzida de 1-octadecanol, comparável à presença de impurezas, a qual pode ser a responsável pela estabilização da fase  $S_{\text{HEX}}$ , permitindo que esta seja observada como uma fase estável numa gama relativamente alargada de temperaturas.

### 3.7 Conclusão

Pretende-se utilizar o sistema binário composto por 1-tetradecanol e 1-octadecanol como uma mistura simplificada de ceras que modele o comportamento das ceras epicuticulares da cutícula vegetal. A mistura de ceras modelo será posteriormente utilizada na reconstituição da camada cerosa de uma cutícula vegetal a partir de membranas cuticulares das quais foram extraídas as ceras nativas. Esta cutícula modelo permitirá a realização de estudos de permeação cuticular em função da composição de fases da camada cerosa de composição conhecida e com comportamento de fases caracterizado pelo respectivo diagrama de fases.

Os álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol reuniram as condições julgadas necessárias para serem os componentes desta mistura modelo, possuindo um comportamento de fases com a complexidade conhecida para os compostos que constituem as misturas de ceras

cuticulares. Estes álcoois também se revelaram uma boa escolha no que diz respeito à sua facilidade de utilização em condições laboratoriais, apresentando uma elevada solubilidade em solventes orgânicos à temperatura ambiente. Os resultados do estudo do comportamento de fases de 1-tetradecanol e de 1-octadecanol, tanto por DSC como por FTIR, foram concordantes com o que é apresentado na literatura sobre estes álcoois, nomeadamente no que diz respeito às transições de fase e suas características termodinâmicas como temperaturas e entalpias de transição (Domanska e Gonzalez, 1997).

A fase  $S_{\text{HEX}}$  registada para 1-tetradecanol e 1-octadecanol e outros membros desta classe de compostos tem sido observada como uma fase metaestável que se converte lentamente numa fase  $S_{\text{ORT}}$  (Watanabe, 1961; Mosselman *et al.*, 1974). Em acordo com esta classificação, verificou-se experimentalmente que a fase  $S_{\text{HEX}}$ , obtida por arrefecimento dos álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol até uma temperatura próxima do ponto de fusão, se converte lentamente numa fase  $S_{\text{ORT}}$  a uma temperatura constante. No decorrer deste trabalho caracterizou-se o polimorfismo existente entre o sólido rotacional hexagonal,  $S_{\text{HEX}}$ , e o sólido não rotacional ortorrômbico,  $S_{\text{ORT}}$ , como sendo do tipo enantiotrópico. A observação da mesma entalpia molar para a transição endotérmica registada na fusão do sólido  $S_{\text{ORT}}$  e para a entalpia molar total de duas transições exotérmicas registadas durante a cristalização do sólido  $S_{\text{ORT}}$ , substancia a conclusão de que a transição polimórfica entre  $S_{\text{HEX}}$  e  $S_{\text{ORT}}$  é reversível e, por isso, do tipo enantiotrópico, pelo menos no caso dos álcoois estudados, 1-tetradecanol, 1-octadecanol e 1-docosanol.

Demonstrou-se que a velocidade da transformação  $S_{\text{HEX}}-S_{\text{ORT}}$  dependeu da relativa proximidade entre a temperatura em que a fase  $S_{\text{HEX}}$  foi observada e a temperatura  $T_i$  do composto. Com 1-docosanol, a fase  $S_{\text{HEX}}$  foi observada como uma fase estável durante um período de algumas horas quando incubada a uma temperatura próxima de  $T_c$  e suficientemente afastada da temperatura  $T_i$ . O sobre-arrefecimento da fase  $S_{\text{HEX}}$  durante a cristalização está, provavelmente, na origem da metaestabilidade apontada para esta fase e surge em consequência de uma cinética de transformação  $S_{\text{HEX}}-S_{\text{ORT}}$  muito lenta. Em consequência da proximidade de  $T_c$  e  $T_i$ , a fase  $S_{\text{HEX}}$  é detectada a temperaturas para as quais já não é estável. Por outro lado, a proximidade entre  $T_c$  e  $T_i$ , aliada a um sobre-aquecimento do sólido  $S_{\text{ORT}}$ , justificam que  $S_{\text{HEX}}$  não seja detectada experimentalmente durante a fusão. O sobre-aquecimento de  $S_{\text{ORT}}$  durante a fusão e o sobre-arrefecimento de  $S_{\text{HEX}}$  na cristalização são, em conjunto, a causa da acentuada histerese registada para a fusão e cristalização destes álcoois.

Tal como no caso dos álcoois puros, também foi notada uma acentuada histerese no comportamento termotrópico de misturas destes álcoois. Os termogramas de aquecimento obtidos por DSC para várias misturas de 1-tetradecanol e 1-octadecanol foram os utilizados para a construção do diagrama de fases para o equilíbrio sólido-líquido desta mistura. Um mínimo na temperatura de fusão, típico de um sistema eutético, foi encontrado para uma mistura de composição aproximada de  $X_{18}=0,18$  e uma temperatura de, aproximadamente, 32 °C (Figura 3.2). Em diagramas de fase eutéticos identifica-se uma região onde se regista imiscibilidade (total ou parcial) dos componentes do sistema no estado sólido. No caso do diagrama de fases da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol), foi definida por DSC uma linha a cerca de 25 °C. A temperaturas inferiores, observa-se coexistência de duas fases sólidas do tipo  $S_{ORT}$ , uma rica em 1-tetradecanol e outra em que 1-octadecanol é o componente predominante, conforme apontado pelos resultados dos estudos de FTIR. No entanto, acima desta temperatura, foram observadas transições isotérmicas numa grande parte das composições de mistura estudadas (Figura 3.12), o que sugeriu a possibilidade de ocorrerem transições entre fases sólidas entre esta linha e o *liquidus*.

Com o objectivo de obter informação quanto ao tipo de fases observadas, caracterizou-se o comportamento de fases de misturas de álcoois em que um dos componentes se encontrava perdeuterado, utilizando técnicas de FTIR, de modo a examinar as transformações relativas a cada um dos componentes separadamente. Os resultados obtidos com misturas representativas das regiões do diagrama de fases correspondentes a uma composição  $X_{18}$  inferior e superior à composição eutética ( $X_{18}=0,09$  e  $X_{18}=0,50$ , respectivamente), demonstraram que a linha de *solidus* deve ser traçada a cerca de 32 °C. Esta linha deve ser traçada com uma incerteza de 2-3 °C para temperaturas superiores, corrigindo assim para o efeito da perdeuteração de um dos álcoois nas misturas estudadas (Figura 3.19).

Entre o *solidus*, definido por FTIR, e o *liquidus*, definido por DSC, distinguem-se duas regiões de coexistência de líquido e sólido. Pela regra das fases, em cada uma destas regiões existe uma fase líquida em equilíbrio com uma fase sólida. O diagrama de fases obtido, do tipo eutético, e os resultados dos estudos de FTIR em misturas em que um dos componentes foi perdeuterado permitem concluir que na região correspondente a  $X_{18}$  superior a  $X_E$ , a fase sólida coexistente com o líquido é uma fase  $S_{ORT}$  composta maioritariamente por 1-octadecanol enquanto que na região correspondente a  $X_{18}$  inferior a  $X_E$ , é um sólido  $S_{HEX}$  que coexiste com o líquido, o qual é composto maioritariamente por 1-tetradecanol.

Uma vez que a fase  $S_{\text{HEX}}$  rica em 1-tetradecanol é detectada em equilíbrio com a fase líquida ou com uma outra fase sólidas, em regiões distintas do diagrama de fases da mistura (1-tetradecanol + 1-octadecanol), tudo indica que seja uma fase estável em equilíbrio de fases e não uma fase metaestável na gama de temperaturas em que é detectada. De facto, esta fase foi observada como uma fase estável durante um período de 24 horas em que foi incubada a uma temperatura de 28 °C, entre a temperatura de transição sólido-sólido, definida por DSC a 25 °C, e a temperatura do *solidus*, definida a cerca de 32 °C. É provável que a presença de uma pequena quantidade de 1-octadecanol nesta fase  $S_{\text{HEX}}$  tenha o mesmo efeito estabilizador da fase rotacional que é atribuído à presença de impurezas no caso dos álcoois puros (Watanabe, 1961; Mosselman *et al.*, 1974).

O diagrama de fases obtido para o sistema (1-tetradecanol + 1-octadecanol) mostrou regiões de coexistência de fases sólida e líquida numa gama de temperaturas facilmente acessíveis em condições laboratoriais e com relevância para sistemas biológicos, pelo que a escolha deste sistema modelo para as ceras da cutícula vegetal se revelou bastante auspicioso para a continuação do trabalho projectado de modelização da cutícula vegetal. A imiscibilidade de fases sólidas encontrada neste sistema é observada em outros sistemas binários de compostos com cadeias hidrocarbonadas longas, tanto no caso de misturas de *n*-álcoois primários (Domanska e Gonzalez, 1997) e de *n*-alcanos (Hammami e Mehrotra, 1995; Oonk *et al.*, 1998) como em misturas de *n*-álcoois com *n*-alcanos (Plesnar *et al.*, 1990; Plesnar e Bylicki, 1993).

Tendo em conta os resultados obtidos para uma simples mistura binária de dois compostos quimicamente semelhantes, é de esperar que misturas mais complexas de ceras, com cadeias hidrocarbonadas mais longas, possuam um comportamento de fases bastante complexo, incluindo imiscibilidade e polimorfismo no estado sólido numa gama alargada de temperaturas. Embora os componentes dos sistemas de ceras naturais possuam temperaturas de fusão no estado puro tão elevadas que se tornam fisiologicamente irrelevantes, na cutícula são encontradas fases fluidas coexistentes com fases cristalinas à temperatura ambiente, tal como apontado por vários estudos em misturas de ceras naturais (Reynhardt e Riederer, 1991; 1994; Schreiber *et al.*, 1997; Merk *et al.*, 1998; Casado e Heredia, 1999). O transporte de massa através das ceras cuticulares deverá ocorrer por dissolução e difusão nos vários domínios fluidos ou através das interfaces de domínios fluidos e cristalinos, ou ainda por descontinuidades entre fases cristalinas. O transporte por difusão num meio de tal complexidade dependerá das propriedades de percolação do sistema.

Apresenta-se o projecto de desenvolvimento de uma cutícula vegetal modelo, de conteúdo de ceras manipulável. Desenvolve-se um método experimental para obtenção de cutículas com um conteúdo de ceras reconstituído artificialmente. Realizam-se estudos de transporte transcúticular em cutículas modelo de diferentes composições de ceras, comparando o efeito do extracto natural de ceras de tomate, de álcoois alifáticos puros e de uma mistura binária de álcoois com comportamento de fases previamente estudado na reconstituição da barreira cerosa da cutícula. Discutem-se os resultados obtidos com cutículas modelo tendo como referência os estudos de transporte realizados anteriormente em cutículas naturais de tomate e sua matriz cuticular. Interpreta-se a barreira difusional da cutícula, adaptando os conceitos do modelo clássico da membrana bipolarizada em matriz de cutina e ceras aos resultados obtidos neste trabalho.

---

# Capítulo 4

## Transporte em Cutículas Modelo com Diferentes Composições de Ceras

### 4.1 Estudos em Modelos da Cutícula Vegetal

A questão da permeabilidade cuticular tem sido frequentemente abordada recorrendo a sistemas modelo da cutícula natural, os quais, embora constituam uma simplificação do sistema em estudo, permitem melhor controlo de condições experimentais do que o sistema cuticular *in vivo*. São inúmeros os estudos realizados em cutículas isoladas das estruturas naturais de onde são provenientes, sejam estas folhas ou frutos. O isolamento da cutícula do

contexto fisiológico da planta constitui, em si, uma simplificação do sistema, necessária por razões de facilidade de manuseamento do objecto em estudo.

A maior parte dos estudos de permeabilidade cuticular são realizados em cutículas separadas do órgão da planta do qual são provenientes. A separação da cutícula da parede celular das células da epiderme que lhe são subjacentes pode ser facilmente realizada por hidrólise ácida (por exemplo, McFarlane e Berry, 1974). No entanto, tendo em conta que este tratamento é potencialmente danoso para a estrutura da membrana, esta abordagem inicial foi abandonada em favor do método de isolamento por digestão enzimática das extensões de polissacarídeos que ligam a matriz cuticular à parede celular. A utilização de celulases e pectinases tem sido largamente adoptada no isolamento de cutículas para estudos de transporte transcuticular, por vários autores (por exemplo, Schönherr e Bukovac, 1973; Schönherr 1976a,b; Tyree *et al.*, 1990b; Hauser *et al.*, 1993, Luque *et al.*, 1995; Schreiber e Riederer, 1996b; Baur *et al.*, 1997a).

Considerando que a desidratação a que a cutícula está sujeita durante o processo de isolamento e armazenamento pode induzir alterações estruturais irreversíveis que afectam a sua condutância, alguns autores (Hoad *et al.*, 1996, 1997) optam por realizar estudos de transporte, normalmente de água, em secções cilíndricas de folhas, as quais são colocadas num suporte que permite selar a superfície lateral do cilindro e a superfície abaxial da folha (com estomas) de modo a monitorizar o fluxo a partir da superfície adaxial (sem estomas). Desta forma, a cutícula é mantida num ambiente hidratado desde o momento da sua colheita. A comparação das propriedades de transporte de cutículas isoladas por digestão enzimática com as de cutículas mantidas em cortes de folhas, quer relativamente a compostos orgânicos (Kirsch *et al.*, 1997), quer no que diz respeito a medições de transpiração cuticular (Schreiber, 2001; Schreiber *et al.*, 2001), revelou que ambos os métodos originam cutículas com propriedades de transporte semelhantes.

Um outro modelo simplificado utilizado para a investigação das propriedades de transporte da cutícula têm sido os extractos totais de ceras (Riederer e Schreiber, 1995), obtidos por lavagem da cutícula com solventes orgânicos. Esta abordagem decorre da constatação de que as ceras determinam em grande medida as propriedades vedantes da cutícula e, de facto, os estudos de mobilidade de compostos orgânicos em extractos de ceras cuticulares recristalizados separadamente da cutícula têm reproduzido com sucesso as propriedades da membrana total relativamente a esta classe de compostos (Schreiber e

Schönherr, 1993; Schreiber e Riederer, 1996a; Schreiber *et al.*, 1996b,c; Kirsch *et al.*, 1997). Porém, além de uma simplificação da composição do sistema, este sistema faz, também, uma simplificação da questão da permeabilidade cuticular como um todo, uma vez que existem fortes indicações de que um outro mecanismo de permeação, mediado por poros hidrofílicos existentes na matriz cuticular e aparentemente independente da solubilidade dos permeantes na barreira de ceras, se encontra disponível para a permeação da cutícula. Este último, pelas suas características, aplicar-se à permeação de electrólitos (Schönherr, 2000, 2001) e também de água (Schreiber *et al.*, 2001) e tem sido objecto de uma investigação relativamente recente, com vista a compreender de que modo a cutícula medeia o efeito de chuvas ácidas (Smalley *et al.*, 1993; Hauser *et al.*, 1993), ou de formulações de herbicidas baseados em sais de glifosato (*N*-(fosfometil)-glicina), que a pH fisiológico são zwitteriões (Schönherr, 2002).

Do que foi dito anteriormente, juntamente com o que foi revisto no Capítulo 1, torna-se claro que a modelização de uma cutícula vegetal passa por incluir no sistema modelo a importante contribuição para as propriedades de transporte da membrana das ceras cuticulares e também da matriz cuticular. O objectivo desta investigação foi o de conceber e testar tal modelo, adicionando-lhe a possibilidade de controlar a composição em ceras presente na membrana. Só uma cutícula artificial com estas propriedades permitirá a realização de estudos de transporte em função do comportamento de fases das ceras cuticulares, como pretendido neste trabalho.

## 4.2 Concepção de um Modelo para a Cutícula Vegetal

O conceito de modelo da cutícula que se pretende explorar no contexto deste trabalho pressupõe uma abordagem da simplificação do complexo sistema cuticular que permita manter as características de membrana com duplo carácter, hidrofóbico, no que respeita ao domínio alifático dos seus componentes, e hidrofílico, quando se consideram as características polielectrolíticas da matriz cuticular. O sistema modelo deverá simular o sistema natural em todas as suas propriedades, incluindo estrutura e dinâmica molecular, ou pelo menos ao ponto de reproduzir os dois modelos de transporte por difusão passiva na cutícula que são actualmente discutidos, o que pressupõe o transporte de permeantes por dissolução na membrana e o que considera a existência de poros polares através dos quais estes podem difundir (Capítulo 1). O dito modelo terá de ser, também, tão bem caracterizado quanto

possível, química e estruturalmente, de modo a permitir a realização de estudos de permeabilidade membranar em função da variação de parâmetros singulares bem definidos.

O principal intuito do desenvolvimento de um modelo de cutícula foi o de obter uma membrana artificial com potencial para o estudos de transporte em função do comportamento de fases das ceras cuticulares. O modelo de cutícula que se propõe neste trabalho consiste, fundamentalmente, numa membrana de matriz bem estudada, na qual se possa fazer a substituição das ceras naturais por misturas de ceras artificiais de composição controlada.

#### 4.2.1 Base estrutural de cutina

Como base estrutural do sistema modelo, optou-se por utilizar uma matriz de cutina de proveniência natural. Esta opção, em detrimento de uma matriz polimérica sintética, mais bem caracterizada e uniforme, visou evitar que a substituição deste componente da cutícula se traduzisse na eliminação de algumas das características essenciais para o seu desempenho nos sistemas vivos. Além do mais, eventuais esforços para a simplificação do sistema cuticular também a este nível terão de ser suportados por estudos numa matriz cuticular de origem natural. Sendo assim, procedeu-se à escolha de uma cutícula dadora de cutina, tendo em conta factores como resistência mecânica à tracção, facilidade de obtenção e relevância do conhecimento das propriedades da cutícula de sua proveniência, recaindo a escolha sobre a cutícula de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

A matriz polimérica de cutina tem sido isolada com sucesso a partir de várias cutículas, incluindo a de tomate (Schönherr e Bukovac, 1973), possibilitando o estudo desta membrana separadamente do sistema cuticular (Schönherr, 1982), bastando para isso efectuar a extracção completa das ceras cuticulares. Como alguns trabalhos demonstram na prática, esse objectivo pode ser facilmente conseguido com a lavagem extensiva da membrana com solventes orgânicos (Baur *et al.*, 1996; Buckholz e Schönherr, 2000).

#### 4.2.2 Reconstituição do conteúdo em ceras

Esta etapa da modelização da cutícula consistiu na substituição das ceras naturais do sistema natural por ceras seleccionadas. Neste contexto, pretende-se utilizar uma mistura de ceras artificiais que, embora simplificada, possua um comportamento de fases que reflecta o de ceras

naturais. Em preparação para esta etapa da modelação, foi caracterizado o diagrama de fases de uma mistura de 1-tetradecanol e 1-octadecanol (Capítulo 3, Figura 3.19). Com a obtenção do referido diagrama, concluiu-se que grande parte das composições possíveis para o sistema binário constituído pelos dois álcoois possui um comportamento de fases adequado ao pretendido, incluindo o registo de transições de fase numa larga gama de temperaturas e polimorfismo do estado sólido, conforme encontrado em misturas de ceras naturais.

No desenvolvimento de um método para a re-introdução de ceras artificiais nas membranas modelo, pretendeu-se emular o processo natural de deposição de ceras. A respeito deste, sabe-se que as ceras são sintetizadas pelas células da epiderme cobertas pela cutícula e não na própria cutícula. Desde há muito que se discute de que forma é feita a impregnação da membrana com as ceras ou como estas chegam à superfície externa da cutícula para formarem a camada de ceras epicuticulares. Relativamente a esta questão, existem dois modelos de estudo: um que afirma que as ceras difundem desde o local de origem até à superfície externa da cutícula por um processo mediado por um solvente volátil (Baker, 1982) e outro que considera a existência de poros ou canais condutores de ceras, localizados perpendicularmente na cutícula, comunicando com a sua superfície externa (Hall, 1967; Hall e Donaldson, 1962; Miller, 1982, 1985). Estes poros serão distintos dos que são implicados no transporte transcuticular de electrólitos, observados por Schönherr (1976a,b), pelo menos no que diz respeito às suas dimensões, se não noutros aspectos, uma vez que se lhes reconhece um diâmetro da ordem de alguns  $\mu\text{m}$ , enquanto que o diâmetro dos poros implicados na permeação cuticular foi estimado em cerca de 0,9 nm. Alguns resultados experimentais indicam, contudo, que a hipótese da difusão através da cutícula é a mais provável, pelo menos numa larga selecção de espécies de plantas (Anton *et al.*, 1994; Neinhuis *et al.*, 2001). No entanto, esta distribuição das ceras na cutícula não é compatível com a observação de uma diferenciação de composição de ceras entre o seu interior e a superfície, ocasionalmente relatada (Jetter *et al.*, 1997). Fica, portanto, em consideração que este assunto não se encontra definitivamente esclarecido.

De modo a realizar a reconstituição da camada de ceras na cutícula modelo, considerou-se, como mais provável, a hipótese de difusão das ceras por acção de um solvente volátil. Assim, promoveu-se a impregnação da matriz cuticular com ceras respeitando o seu sentido de difusão natural, isto é, do interior para o exterior da cutícula. As ceras serão dissolvidas num solvente orgânico volátil e tanto quanto possível inócuo para a estrutura cuticular. Esta solução será colocada em contacto com a superfície interna de uma matriz cuticular, forçando-

se a evaporação do solvente a partir da superfície externa. No processo, espera-se estabelecer uma continuidade de solução de ceras através da matriz cuticular, até à superfície da membrana. Da evaporação total do solvente espera-se que resulte a formação de depósitos cristalinos na superfície externa da membrana, emulando o processo natural de deposição de ceras epicuticulares.

### 4.2.3 Composição em ceras

Para a reconstituição da barreira de ceras, optou-se por testar uma mistura de 1-tetradecanol e 1-octadecanol de composição equimolar. De acordo com o diagrama de fases já obtido para este sistema binário (Capítulo 3, Figura 3.19), uma mistura de composição  $X_{18}=0,5$  encontra-se no estado sólido a temperaturas inferiores a cerca de 32 °C, apresentando coexistência de uma fase sólida e uma fase líquida entre 32 e 50 °C. Observa-se, também, polimorfismo do estado sólido, registando-se a coexistência de um sólido rotacional (enriquecido em 1-tetradecanol) e de um sólido não-rotacional (onde predomina 1-octadecanol) entre 25 e 32 °C. A temperaturas inferiores a 25 °C, ambos os sólidos são não-rotacionais, provavelmente com um empacotamento cristalino ortorrômbico. A gama de temperaturas em que se regista coexistência de um sólido rotacional e de um sólido não-rotacional, bem como a gama de temperaturas onde ocorre coexistência de líquido e de sólido para esta mistura, são fisiologicamente relevantes para as funções cuticulares e também de fácil monitorização em condições laboratoriais. Além do mais, no âmbito do trabalho agora apresentado foram já realizados estudos de permeabilidade na cutícula natural e respectiva matriz cuticular entre 15 e 60 °C (Capítulo 2), pelo que seria interessante estudar uma cutícula com uma barreira cerosa que altera significativamente o seu equilíbrio de fases nessa gama de temperaturas.

Como controlo do processo de reconstituição, serão também reconstituídas cutículas com uma composição de ceras idêntica à da cutícula natural de tomate, com a re-introdução na matriz cuticular do extracto total de ceras. Pretende-se, ainda, testar o efeito da reconstituição da barreira cerosa com os álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol no estado puro. Estes álcoois têm pontos de fusão bem definidos e bastante distintos um do outro, nomeadamente de 37 °C para 1-tetradecanol e 57 °C para 1-octadecanol (Capítulo 3, Tabela 3.1). Assim, na gama de temperaturas que se pretende monitorizar, entre 15 e 60 °C,

será registada a transição de fase sólido-líquido no caso de 1-tetradecanol mas não de 1-octadecanol, que deverá permanecer no estado sólido.

#### 4.2.4 Propriedades das Cutículas Modelo

A importância das ceras para as propriedades de barreira à difusão constituída pela cutícula foi confirmada com os resultados obtidos no âmbito do trabalho apresentado no Capítulo 2. Nele se mostrou que a extracção das ceras da cutícula de tomate se traduziu num aumento de permeabilidade cuticular tanto relativamente a protões como a outros iões inorgânicos, assim como a uma série de álcoois de baixo peso molecular. O processo de reconstituição da barreira de ceras nas cutículas modelo que se pretende testar requer a introdução progressiva de ceras seleccionadas numa matriz cuticular que lhe serve de base. Espera-se que as membranas assim produzidas, denominadas de cutículas reconstituídas, recuperem as características da barreira difusional das cutículas naturais.

Uma forma de avaliar a eficiência da reconstituição da camada de ceras nas cutículas modelo é a comparação da permeância a protões,  $P_{H^+}$ , destas membranas com a da cutícula natural e sua matriz de cutina. Em hipótese, a re-introdução de ceras no sistema permitirá contrariar o efeito da sua extracção, nomeadamente com a recuperação da reduzida permeância a protões,  $P_{H^+}$  encontrados na cutícula natural.

No âmbito do Capítulo 2, estudou-se o transporte de alguns iões inorgânicos ( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $Br^-$ ) na cutícula de tomate e respectiva matriz. Os valores de permeância destas membranas aos vários iões,  $P_{iões}$ , foram relativamente elevados e os estudos em função da temperatura (entre 15 e 60 °C) não revelaram a relação de  $P$  com a energia livre de desidratação dos iões, que se esperaria ser muito acentuada se estes tivessem de se dissolver no meio apolar das membranas testadas. Estes resultados são, por isso, compatíveis com a hipótese do mecanismo de permeação alternativo ao da dissolução no meio apolar da membrana, sendo este o modelo de difusão por poros polares, provavelmente hidratados. Tal como foi determinado para a membrana natural, será, também, interessante investigar qual a energia de activação para a permeação das várias cutículas modelo a  $Na^+$ , por exemplo, ao mesmo tempo que se avalia a relevância do comportamento de fases das ceras usadas na reconstituição da cutícula para o processo de transporte do ião.

O estudo da permeância da cutícula e matriz cuticular de tomate a álcoois,  $P_{\text{álcool}}$ , sendo estes metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol (Capítulo 2), mostrou que estas membranas são permeáveis pelos dois mecanismos de transporte que se atribuem à cutícula, o de dissolução e o de difusão por poros, mostrando também que estes mecanismos são selectivos quanto ao grupo de permeantes para os quais estão disponíveis. Com a reconstituição de um sistema cuticular modelo, no qual a composição de ceras pode ser controlada, será possível realizar uma avaliação sistematizada da importância do comportamento de fases das ceras cuticulares para cada um dos dois mecanismos de transporte transcúticular. Assim, será determinada  $P_{\text{álcool}}$  para as cutículas modelo de diferentes composições de ceras em função da temperatura, entre 15 e 60 °C.

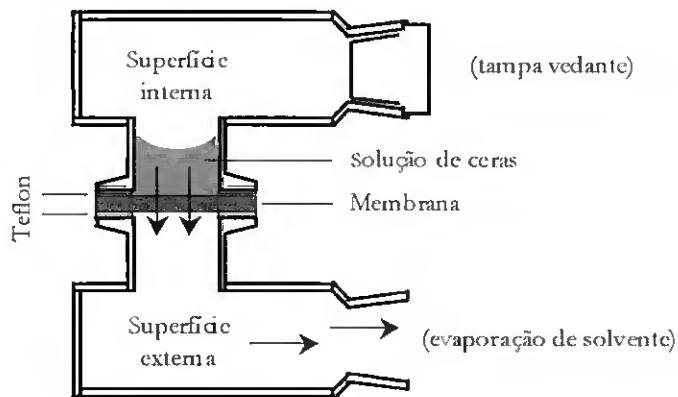
### 4.3 Método de Reconstituição de Ceras em Cutículas Modelo

A preparação de uma cutícula modelo, com conteúdo de ceras controlado, pressupõe, em primeiro lugar, que se eliminem as ceras da cutícula natural que lhe vai servir de base. Só após este procedimento, se poderão introduzir novas ceras na membrana com controlo da sua composição qualitativa e quantitativa. Após a extracção das ceras da cutícula de tomate, a matriz cuticular restante, designada por MC, fornecerá a base estrutural para a reconstituição do conteúdo de ceras nas cutículas modelo.

Para a obtenção de cutículas modelo, realizar-se-à a aplicação das ceras pretendidas numa membrana MC. As ceras serão dissolvidas em 2-propanol e aplicadas sobre a superfície interna de uma membrana MC, recorrendo à utilização da mesma célula de permeação desenvolvida para os estudos de transporte transcúticular apresentados no Capítulo 2 (Figura 2.4). Para tal, o modo de utilização da célula de permeação terá de ser adaptado às necessidades específicas do processo de reconstituição. Para o efeito, pode colocar-se uma membrana MC entre os dois compartimentos da célula de permeação, tal como descrito no caso das medições de fluxo transcúticular apresentadas no Capítulo 2, mas dispendo, agora, o conjunto de célula e membrana na posição horizontal, como ilustrado na Figura 4.1. A superfície interna da membrana ficará voltada para cima, de modo a que a extensão lateral do respectivo compartimento da célula de permeação seja utilizado como um recipiente (com capacidade para 1 ml de solução). A partir do momento em que se colocar a solução de ceras pretendida em contacto com a superfície interna da membrana MC, a evaporação do solvente

será permitida somente a partir da sua superfície externa, vedando a abertura do compartimento dador de ceras e deixando o compartimento aceitante em comunicação com a atmosfera. O objectivo deste procedimento é o de promover a dispersão da solução de ceras por toda a membrana e provocar a formação de depósitos cristalinos de ceras na sua superfície externa, emulando o processo de deposição das ceras epicuticulares. As membranas obtidas após o processo de reconstituição serão denominadas de cutículas reconstituídas, ou CR, em analogia ao efeito que se pretende atingir, o de reconstituição das propriedades de barreira das cutículas naturais.

Antes da utilização das membranas reconstituídas em estudos de permeabilidade, a superfície interna da membrana terá de ser sujeita a uma rápida lavagem com 2-propanol, de modo a remover algum depósito de ceras aí acumulado indevidamente. As ceras acumuladas nesta superfície deverão ser removidas porque não reflectem a distribuição de ceras numa cutícula, sendo somente o resultado do processo de reconstituição. Só após esta lavagem da superfície interna se considerou que as membranas CR estariam em condições de serem utilizadas para estudos de permeabilidade.



**Figura 4.1.** Representação esquemática da adaptação da célula de permeação desenvolvida para medições de permeância membranar a vários iões e álcoois de baixo peso molecular (Capítulo 2) para a utilização no processo de reconstituição do conteúdo de ceras em cutículas modelo.

## 4.4 Execução Experimental

### 4.4.1 Obtenção de cutículas reconstituídas

As cutículas reconstituídas, CR, foram preparadas a partir de membranas MC isoladas conforme descrito no Capítulo 2, Secção 2.5.1. Antes de iniciar o procedimento de reconstituição, a integridade membranar de MC foi verificada conforme descrito na Secção 2.5.2 do mesmo Capítulo, após o que a membrana MC ficou inserida na célula de permeação e foi seca à temperatura ambiente, em excicador, sob ligeiro vácuo, por um período de dois dias.

Os álcoois 1-tetradecanol e 1-octadecanol (*Sigma-Aldrich*, Madrid, Espanha) foram adquiridos com indicação de um grau de pureza de 98% e utilizados sem purificação adicional. O extracto total de ceras de cutícula de tomate foi obtido durante a preparação de membranas MC, conforme descrito no Capítulo 2, Secção 2.5.1.

As soluções de ceras utilizadas na reconstituição foram preparadas utilizando 2-propanol (grau analítico) como solvente. A solução de extracto total (ET) de ceras de cutícula de tomate foi preparada numa concentração de  $0,33 \text{ mg ml}^{-1}$ , enquanto que as soluções de 1-tetradecanol (C14), 1-octadecanol (C18), e da mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol (M) foram preparadas numa concentração de  $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Para o início da reconstituição, o conjunto de célula de permeação e membrana MC foram colocados numa posição horizontal, de modo a que a superfície interna da membrana, exposta no compartimento dador da célula de permeação ficasse virada para cima. A reconstituição do conteúdo de ceras nas cutículas modelo foi iniciada colocando 1 ml da solução de ceras requerida no recipiente formado pela extensão lateral do compartimento dador, agora na posição vertical (Figura 4.1). Este compartimento foi selado com uma tampa de vidro esmerilado, enquanto que o compartimento aceitante foi deixado em contacto com a atmosfera para permitir a evaporação do solvente na superfície externa da membrana. A célula de permeação foi, depois, colocada no interior de uma estufa térmica com ventilação para o exterior, a uma temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 24 horas, de modo a acelerar o processo de evaporação do solvente. Excepto quando referido outro procedimento, o processo de reconstituição foi repetido três vezes, com as soluções indicadas para cada caso, resultando na

aplicação de ET na quantidade total de 1 mg, enquanto que C14, C18 e de M foram aplicados numa quantidade total de 3 mg.

O excesso de ceras que poderia ficar, eventualmente, depositado na superfície interna da membrana, foi removido com uma rápida lavagem com 2-propanol, após o que a membrana foi deixada à temperatura ambiente em excicador, sob condições de vácuo ligeiro, durante a noite, de modo a permitir a evaporação completa do solvente. As cutículas modelo assim obtidas foram denominadas de cutículas reconstituídas, CR, indicando-se na nomenclatura também a sua composição em ceras, sendo referidas como CR-ET, CR-C14, CR-C18 e CR-M, as membranas reconstituídas com ET, C14, C18 e M, respectivamente.

#### 4.4.2 Quantificação de ceras depositadas à superfície de cutículas reconstituídas

Para a determinação da quantidade de ceras depositadas na superfície interna ou externa das cutículas reconstituídas, efectuou-se a recolha quantitativa dessas mesmas ceras após duas lavagens sucessivas da superfície requerida com 1 ml de 2-propanol, com um tempo de exposição da membrana ao solvente de 5 minutos. O extracto assim obtido foi sujeito a uma análise quantitativa do conteúdo de ceras por cromatografia gasosa num cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890A (Wilmington, DE, USA) equipado com um detector de ionização de chama e com uma coluna *Hewlett-Packard* HP-5, com um enchimento de (5%)-difenil-(95%)-dimetilpolisiloxano (30,0 m × 320 µm). O extracto a analisar foi primeiro seco sob um jacto de N<sub>2</sub> e depois dissolvido numa quantidade bem determinada de clorofórmio, adicionando-se 1-hexadecanol como padrão interno. Para a análise da amostra, injectou-se 1 µl da solução a analisar contendo o padrão interno, recorrendo a um injector do tipo *split/splitless*, com uma razão de *split* de 50:1. A temperatura de injector e detector foi de 300 °C. A separação dos álcoois foi realizada com N<sub>2</sub> como gás de arrasto, com um fluxo de 1,5 ml min<sup>-1</sup>, utilizando um programa de temperatura de coluna de 5 minutos a 230 °C, seguido de aquecimento de 230 a 280 °C a uma velocidade de 10 °C min<sup>-1</sup>, e terminando com 10 minutos a 280 °C.

### 4.4.3 Determinação de permeância e coeficiente aparente de difusão

Conforme indicado na Secção 2.4.2 do Capítulo 2, assumindo-se que a espessura da cutícula natural de tomate é de 9  $\mu\text{m}$  (Jeffree, 1996), e que esta não é significativamente alterada com a reconstituição de ceras nas cutículas modelo.

### 4.4.4 Medição de fluxo de $\text{H}^+$ e de $\text{Na}^+$

Conforme indicado na Secção 2.5.3 do Capítulo 2.

### 4.4.5 Medição de fluxo de álcoois

Conforme indicado na Secção 2.5.4 do Capítulo 2.

## 4.5 Resultados

### 4.5.1 Reconstituição de ceras

O procedimento para a reconstituição do conteúdo de ceras nas cutículas modelo projectado pressupôs a aplicação de ceras na matriz cuticular (MC) isolada de tomate recorrendo-se à utilização de um solvente volátil como veículo para a integração das ceras nas membranas reconstituídas. Antes de se concluir por um procedimento estandardizado e usado sistematicamente na reconstituição de membranas modelo, realizaram-se alguns controlos, nomeadamente de averiguação do efeito do solvente escolhido nas propriedades da membrana MC que lhe servia de base, e, ainda, de determinação da quantidade de ceras que seria necessário depositar na membrana para que fossem recuperadas as características de barreira da membrana cuticular original.

O solvente escolhido para a preparação das soluções de ceras foi 2-propanol. A razão desta escolha prendeu-se, em grande parte, com a realização de algumas experiências preliminares com as quais se testou um processo de reconstituição com algumas variações

relativamente ao definitivamente adoptado para a continuação dos estudos. A saber, nesse procedimento testado inicialmente, utilizou-se a mesma célula de permeação esquematizada na Figura 4.1 mas mantendo-a na posição vertical, como indicado na Figura 2.7 (Capítulo 2), como numa medição típica de fluxo transcúticular. De seguida, foi colocada uma solução de ceras em 2-propanol no compartimento dador e água destilada no compartimento aceitante da célula, de modo a promover a difusão de 2-propanol para o compartimento aceitante, arrastando consigo as ceras dissolvidas até à interface entre água e 2-propanol, onde se esperava que ocorresse a precipitação das ceras, insolúveis em água. Este procedimento requeria o uso de um solvente bastante solúvel em água e essa foi a razão da escolha de 2-propanol. Porém, esta forma de reconstituição foi abandonada em benefício da que se descreve em seguida devido à incerteza da localização exacta da interface entre 2-propanol e água, onde se esperaria que ocorresse a cristalização de ceras na membrana.

O processo definitivamente adoptado para a obtenção de cutículas com o conteúdo de ceras reconstituído (CR) consistiu na aplicação de uma solução de ceras em 2-propanol directamente na superfície interna de uma membrana MC desidratada, conforme representado na Figura 4.1. Após a difusão da solução através da matriz da membrana, esta atinge a interface entre a membrana e a atmosfera, onde se espera que ocorra a cristalização de ceras quando o solvente tiver sido completamente evaporado. Foram efectuados dois controlos do processo de reconstituição: o primeiro relacionou-se com a avaliação de possíveis alterações das características das membranas MC em consequência da utilização de 2-propanol como solvente; o segundo, prendeu-se com a necessidade de determinar a quantidade de ceras efectivamente necessária para obter membranas CR com propriedades de barreira semelhantes às de cutículas naturais.

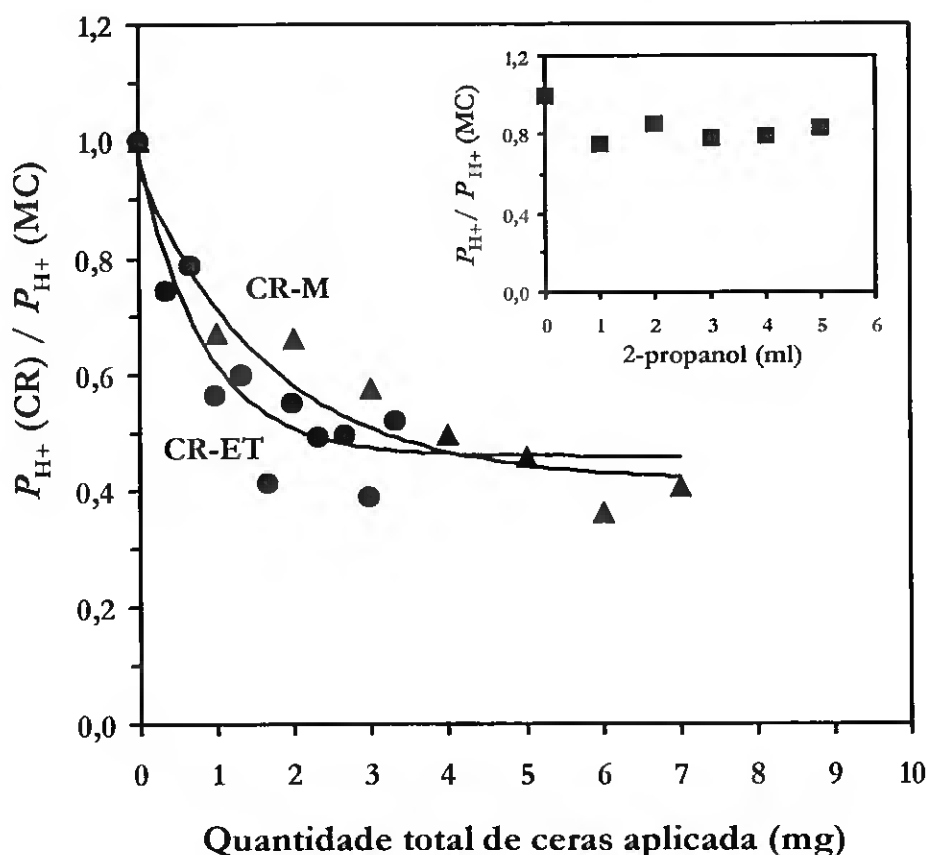
O efeito do solvente 2-propanol foi avaliado com a monitorização de  $P_{H^+}$  (permeância a protões) antes e após a incubação da membrana com alíquotas de solvente de igual volume das aplicadas na superfície interna da membrana na preparação de membranas CR. Deste modo, realizou-se uma simulação da reconstituição sem a utilização de ceras. Os resultados obtidos com algumas membranas MC ( $n=3$ ) foram consistentes em demonstrar que a aplicação sucessiva de solvente não afectou as propriedades da membrana MC. Como ilustração, apresenta-se, na Figura 4.2, a variação de  $P_{H^+}$  em função do número de aplicações de alíquotas de 1 ml de 2-propanol numa das membranas MC testadas.

Seguidamente, foi determinada a quantidade de ceras que seria necessário introduzir numa cutícula modelo de modo a recuperar as propriedades vedantes das cutículas naturais. Recordar-se que se pretende testar a inclusão de uma mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol (M) nas cutículas modelo. O processo de reconstituição será também realizado utilizando o extracto total de ceras de cutícula de tomate (ET), de modo a comparar a eficiência das duas misturas, o extracto natural e a mistura binária dos dois álcoois, na reconstituição. Assim, mediu-se  $P_{H^+}$  durante um processo de reconstituição gradual de ceras nas membranas CR-ET e CR-M, em função do aumento da quantidade de ceras total que foi sendo aplicada na membrana MC inicial. Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 4.2, através da comparação de  $P_{H^+}$  (CR)/ $P_{H^+}$  (MC) após cada aplicação de solução de ceras dissolvidas em 2-propanol, para um exemplar de cada tipo de membrana. Tanto no caso das membranas CR-ET como de CR-M,  $P_{H^+}$  sofreu uma redução exponencial à medida que foi aumentada a quantidade total de ceras aplicada. Com ambas as misturas de ceras, observou-se uma saturação na redução de  $P_{H^+}$  com a adição de ceras, fixando-se este parâmetro em cerca de 40% do seu valor inicial. Em ambas as membranas, esta saturação traduziu-se na obtenção de um valor de  $P_{H^+}$  muito semelhante ao encontrado em cutículas naturais (Capítulo 2, Tabela 2.2). Contudo, foi de notar que em CR-ET essa saturação de  $P_{H^+}$  foi atingida com a adição de cerca de 1 mg de ET, enquanto que no caso de CR-M foram necessários cerca de 3 mg de M para obter o mesmo efeito.

Os resultados apresentados na Figura 4.2, relativos à aplicação gradual de ceras para a obtenção de CR-ET e CR-M, foram levados em conta para a realização de uma comparação sistemática da reconstituição de membranas contendo ET e M, optando-se pela aplicação de um total de 1 mg de ET ou de 3 mg de M na obtenção de CR-ET e CR-M, respectivamente. A aplicação das ceras pretendidas foi realizada em etapas sucessivas, à semelhança do que tinha sido feito para a monitorização da redução progressiva de  $P_{H^+}$ . Este procedimento foi adoptado tendo em conta a limitação de volume de solução que podia ser comportado pela extensão lateral da célula de permeação que foi utilizada (Figura 4.1), cuja capacidade máxima de volume era de 1 ml. A distribuição da aplicação da quantidade total de ceras pretendida permitiu a utilização de uma solução diluída de ceras, o que ajudou a evitar a precipitação de ceras na superfície de aplicação da solução no decorrer da evaporação do solvente.

Ainda antes da sistematização do processo de reconstituição, foram realizados dois controlos adicionais, o de avaliação da quantidade de ceras que efectivamente atinge a superfície externa da membrana, e daí pode ser removida por lavagem com 2-propanol, e o da

quantidade de ceras que eventualmente cristaliza na superfície interna da membrana quando o solvente evapora totalmente, a qual pode igualmente ser removida com uma lavagem com 2-propanol. A quantidade de ceras efectivamente encontrada no interior da matriz cuticular pode ser estimada pela diferença entre a quantidade total aplicada e a quantidade removida das superfícies da membrana expostas na célula de permeação. A superfície de membrana exposta na célula de permeação para a deposição de ceras, e depois para a lavagem com 2-propanol, foi de cerca de  $1 \text{ cm}^2$  pois essa foi a área da abertura da extensão lateral dos componentes da célula de permeação utilizada.



**Figura 4.2.** Efeito do aumento progressivo do conteúdo de ceras em  $P_{H^+}$  numa cutícula reconstituída com extracto total de ceras de tomate (●), CR-ET ( $P_{H^+}(MC) = 8,4 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ ), e numa cutícula reconstituída com uma mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol (▲), CR-M ( $P_{H^+}(MC) = 9,0 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ ). O gráfico inserido no canto superior direito mostra o efeito em  $P_{H^+}$  do tratamento de uma membrana MC ( $P_{H^+}(MC) = 3,2 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ ) com o solvente 2-propanol (■).

No caso de membranas CR-ET ( $n=3$ ), preparadas por aplicação de 1 mg de ET, o extracto recolhido por lavagem da superfície interna da membrana com 2-propanol continha entre 0,1 e 0,2 mg de ceras. Em exemplares de membranas CR-M ( $n=3$ ), preparadas por aplicação de 3 mg de M, verificou-se também uma acumulação de 0,1 a 0,2 mg de ceras na superfície interna, o que sugere que a acumulação de ceras na superfície interna da membrana durante a reconstituição seja intrínseca ao processo de reconstituição. Em face destes resultados, concluiu-se que seria necessário proceder sempre a uma lavagem da superfície interna da membrana reconstituída após o processo de deposição de ceras ser completado, de modo a evitar aí a acumulação indevida de ceras. Relativamente à acumulação de ceras na superfície externa, constatou-se que a quantidade de ET e de M que daí podia ser removida, nos mesmos exemplares de CR-ET e de CR-M, se situou, em média, em cerca de 0,1 mg no caso de CR-ET e cerca de 0,2 mg em CR-M. Quanto à concentração de ceras embebidas na matriz das membranas CR-ET e CR-M, constatou-se que, após a aplicação de um total de 1 mg de ET, se teriam acumulado entre 0,7 e 0,8 mg cm<sup>-2</sup> de ceras ET na matriz cuticular, uma vez que foram removidos entre 0,2 e 0,3 mg de ceras de ambas as superfícies, tanto interna como externa. Paralelamente, em CR-M, após a aplicação de 3 mg de M removeram-se entre 0,3 e 0,4 mg de ceras, o que implicou a acumulação de entre 2,6 e 2,7 mg cm<sup>-2</sup> de ceras M na membrana. Em face destes valores, conclui-se que a concentração de ceras no interior das membranas CR-M foi, em média, cerca de 3,5 vezes superior à das membranas CR-ET.

#### 4.5.2 Permeância e coeficiente aparente de difusão para H<sup>+</sup>

A permeância a protões,  $P_{H^+}$ , registada após a reconstituição de cutículas com ET e M foi avaliada com a medição de  $P_{H^+}$  numa série de membranas CR-ET ( $n=12$ ) e CR-M ( $n=12$ ). O parâmetro comparado foi  $P_{H^+}(CR)/P_{H^+}(MC)$ . Em concordância com os testes preliminares de reconstituição, a aplicação de 1 mg de ET na série de membranas agora testada determinou uma redução média em  $P_{H^+}$  para 40% ( $\pm 17\%$ ), a qual foi bastante semelhante à redução média obtida com a aplicação de 3 mg de M numa outra série de membranas, para 46% ( $\pm 14\%$ ).

À semelhança do que foi observado nos estudos de permeância da cutícula de tomate (C) e da sua matriz de cutina (MC) apresentados no Capítulo 2, também nas membranas agora estudadas se registou uma elevada variabilidade nas medições de permeância a H<sup>+</sup>. Em concordância com o que foi discutido no âmbito da distribuição dos valores de  $P_{H^+}$

encontrados nas membranas C e MC (Capítulo 2, Figura 2.11), optou-se por referir a permeância membranar em termos da mediana dos valores obtidos, em vez da sua média aritmética, uma vez que a distribuição de resultados não se apresentou como normal e unimodal, como pressupõe a determinação de tal parâmetro. Assim, os valores de  $P_{H^+}$  apresentados para as membranas CR-ET e CR-M na Tabela 4.1 correspondem à mediana dos valores obtidos na amostra de membranas testadas, indicando-se também  $P_{H^+}$  máxima e mínima para o conjunto de resultados respectivos. Observou-se que  $P_{H^+}$  nas membranas reconstituídas foi bastante semelhante ao encontrado para um conjunto de cutículas (C), no âmbito dos resultados do Capítulo 2 (Tabela 2.2). Na Tabela 4.1 são também apresentados o valor máximo, mínimo e mediano para o coeficiente aparente de difusão de protões,  $D_{ap}$ , determinado nas membranas reconstituídas CR-ET e CR-M.

**Tabela 4.1.** Permeância a protões,  $P_{H^+}$ , e coeficiente aparente de difusão de protões,  $D_{ap}$ , medidos a 25 °C em membranas modelo reconstituídas com diferentes composição de ceras.

Membrana	$P_{H^+}(\times 10^{-9} \text{ m s}^{-1})$		$D_{ap}(\times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	
	Mediana	Intervalo de valores	Mediana	Intervalo de valores
CR-ET	3,0 ( $n=12$ ) <sup>a</sup>	[1,8 ; 6,2]	1,5 ( $n=8$ )	[0,6 ; 3,5]
CR-C14	4,2 ( $n=8$ )	[2,6 ; 7,2]	3,4 ( $n=6$ )	[1,2 ; 5,9]
CR-C18	4,1 ( $n=8$ )	[1,5 ; 7,2]	2,5 ( $n=6$ )	[0,6 ; 4,4]
CR-M	2,3 ( $n=12$ )	[1,4 ; 9,3]	2,0 ( $n=7$ )	[0,3 ; 4,5]

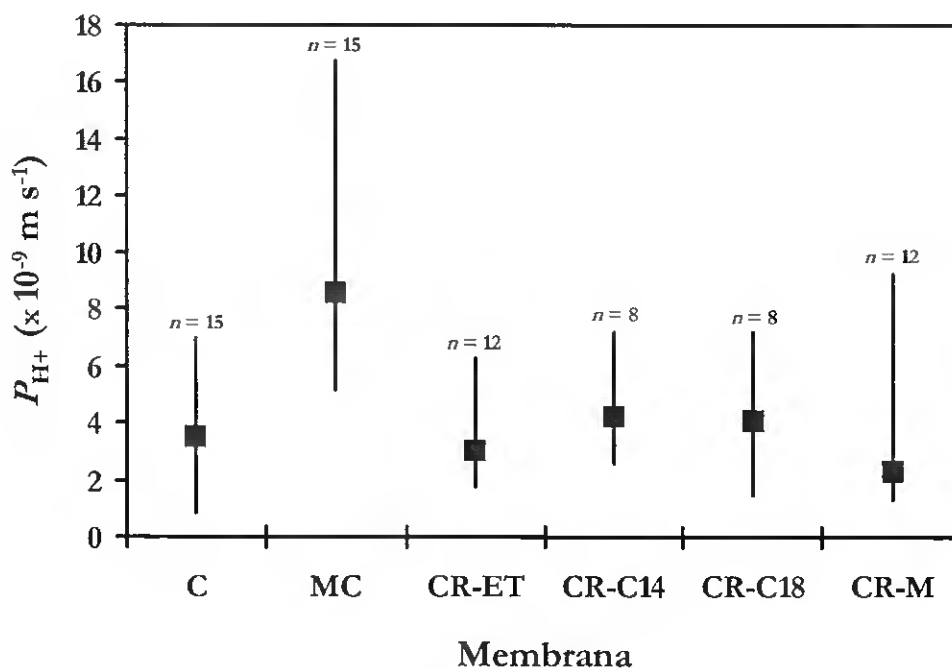
<sup>a</sup> Número de determinações.

Foi também realizada a reconstituição de cutículas modelo utilizando 1-tetradecanol (C14) e 1-octadecanol (C18). Estas ceras foram aplicadas na mesma quantidade que foi utilizada na reconstituição com mistura M, de modo a comparar a eficácia dos álcoois puros e da sua mistura na recuperação de valores de  $P_{H^+}$  da cutícula natural. Os resultados obtidos para uma série de membranas de CR-C14 ( $n=8$ ) e CR-C18 ( $n=8$ ) mostraram que a reconstituição com C14 originou uma redução média de  $P_{H^+}$  para 58% ( $\pm 11\%$ ), muito semelhante à atingida pela aplicação da mesma quantidade de C18, que foi para 57% ( $\pm 21\%$ ).

Neste último caso, contudo, registou-se uma maior variabilidade na redução em  $P_{H^+}$ . Os valores máximo, mínimo e mediano relativos a  $P_{H^+}$  e a  $D_{ap}$  para protões em membranas CR-C14 e membranas CR-C18 podem ser consultados na Tabela 4.1.

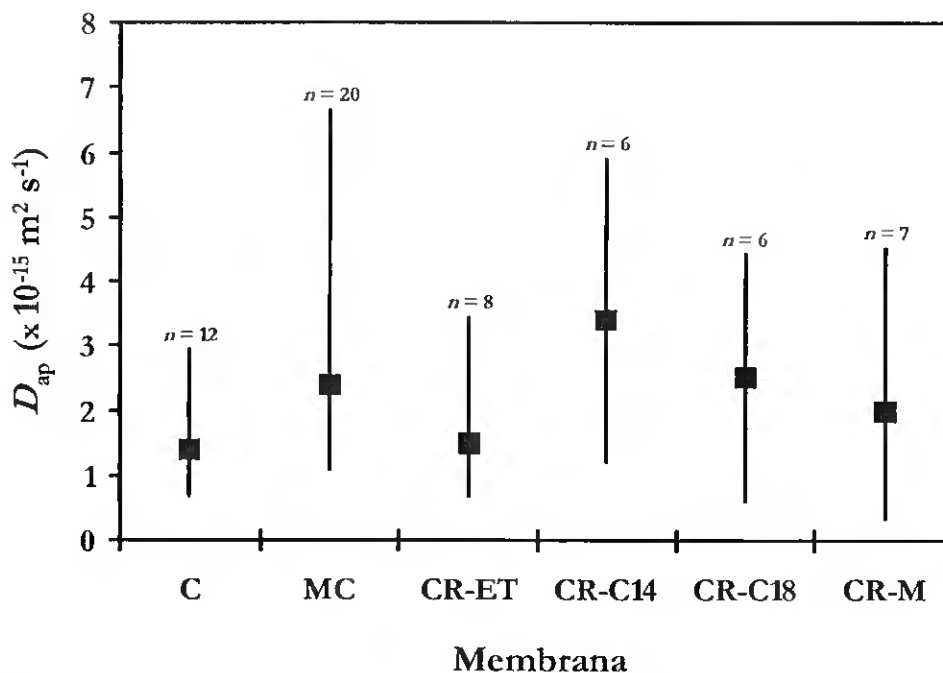
Em algumas das membranas não foi possível obter uma resolução suficiente do tempo de saturação para obter um valor para  $D_{ap}$ . Em consequência, os valores de  $D_{ap}$  apresentados na Tabela 4.1, referem-se a uma população de membranas reduzida relativamente à considerada para a obtenção de  $P_{H^+}$ . Mesmo assim, os valores compilados permitem constatar que  $D_{ap}$  em membranas CR-ET foi semelhante ao valor encontrado previamente na cutícula natural (Capítulo 2, Tabela 2.2), enquanto que  $D_{ap}$  em CR-C14, CR-C18 ou CR-M foi semelhante, ou mesmo um pouco superior, ao determinado na matriz cuticular.

Para melhor comparação dos valores de  $P_{H^+}$  obtidos na cutícula natural e nas membranas modelo, reúnem-se, na Figura 4.3, os resultados apresentados na Tabela 4.1 relativos às diferentes membranas CR estudadas e os resultados obtidos para membranas C e MC apresentados no Capítulo 2 (Tabela 2.2 e Figura 2.11).



**Figura 4.3.** Permeância a protões,  $P_{H^+}$ , de cutícula de tomate (C) e respectiva matriz cuticular (MC), comparada com a de cutículas reconstituídas com extracto total de ceras (CR-ET), 1-tetradecanol (CR-C14), 1-octadecanol (CR-C18) ou com uma mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol (CR-M). Os símbolos indicam a mediana e as barras o intervalo de distribuição dos valores obtidos.

Na Figura 4.4, comparam-se os valores de  $D_{ap}$  para prótons observados nas diferentes membranas reconstituídas, CR-ET, CR-C14, CR-C18 e CR-M, com os obtidos em membranas C e MC, previamente apresentados no Capítulo 2 (Tabela 2.2 e Figura 2.11).

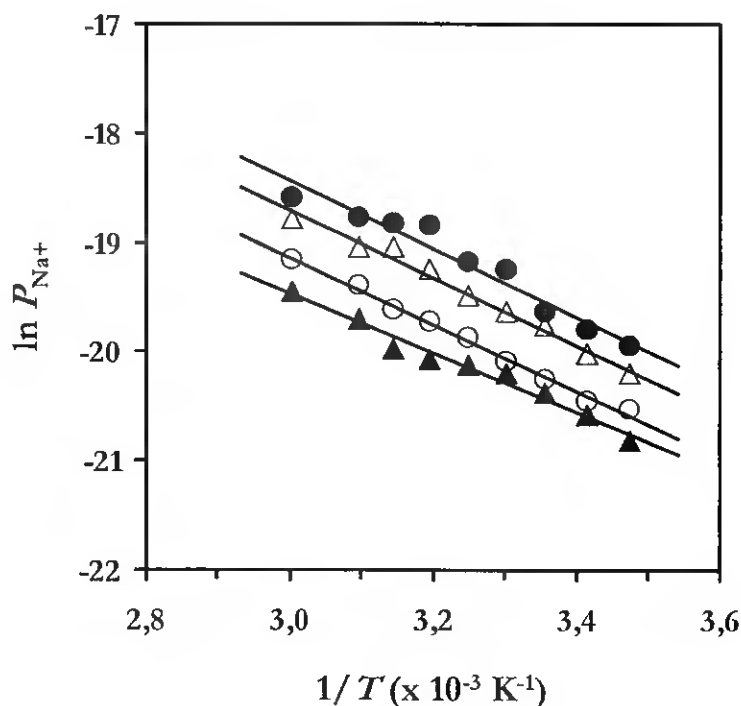


**Figura 4.4.** Coeficiente aparente de difusão de prótons,  $D_{ap}$ , na cutícula de tomate (C) e respectiva matriz cuticular (MC), comparado com o encontrado em cutículas reconstituídas com extracto total de ceras (CR-ET), 1-tetradecanol (CR-C14), 1-octadecanol (CR-C18) ou com uma mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol (CR-M). Os símbolos indicam a mediana e as barras o intervalo de distribuição dos valores obtidos.

#### 4.5.3 Influência da temperatura em $P_{Na^+}$

A permeância de cutículas modelo, reconstituídas com ET, C14, C18 ou M, ao ião  $Na^+$ ,  $P_{Na^+}$ , foi medida em função da temperatura, entre 15 e 60 °C. Os resultados obtidos para uma série de membranas de cada tipo ( $n=4$ ) mostraram que a variabilidade já encontrada em membranas C e MC relativamente a  $P_{Na^+}$  (Capítulo 2) foi também observada nas membranas CR, independentemente da sua composição de ceras, resultando em desvios relativamente ao valor médio bastante elevados (40 – 50%).

A análise do histograma de frequência de valores de  $P_{Na^+}$  medidos em membranas C e MC, apresentado no Capítulo 2 (Figura 2.16), indicou que o modelo de distribuição normal unimodal não se aplica aos valores encontrados nas medições de permeância a  $Na^+$  nestas membranas, pelo que se considerou ser mais correcto comparar os valores medianos obtidos para  $P_{Na^+}$  do que os valores médios e respectivos desvios padrão. Os valores medianos de  $P_{Na^+}$  a cada uma das temperaturas testadas são apresentados na Figura 4.5, sob a forma de gráfico de Arrhenius, omitindo-se a indicação do intervalo de valores obtidos para simplificação da avaliação de resultados. A relação linear entre  $\ln P_{Na^+}$  e  $1/T$  encontrada com os valores medianos reflectiu a relação linear encontrada no caso de cada uma das membranas testadas, individualmente.



**Figura 4.5.** Gráficos de Arrhenius obtidos para  $P_{Na^+}$  em membranas modelo com diferente composição de ceras: CR-ET (●), CR-C14 (○), CR-C18 (△) e CR-M (▲). As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação linear ( $r^2 > 0,97$ ).

A energia de activação,  $E_a$ , para o transporte de  $Na^+$  em cada membrana reconstituída pode ser obtida do respectivo gráfico de Arrhenius. A  $E_a$  (mediana) registada em membranas CR-ET foi de  $22 \text{ kJ mol}^{-1}$ , enquanto que em CR-M foi de  $24 \text{ kJ mol}^{-1}$ , em CR-C14 foi de  $27 \text{ kJ mol}^{-1}$  e em CR-C18 foi de  $26 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

#### 4.5.4 Influência da temperatura em $P_{\text{álcool}}$

A permeância de cutículas modelo, CR-ET, CR-C14, CR-C18 e CR-M, relativamente aos álcoois metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol,  $P_{\text{álcool}}$ , foi medida em função da temperatura, entre 15 e 60 °C. Para o efeito, prepararam-se várias membranas de cada tipo ( $n=4$ ) e determinou-se  $P_{\text{álcool}}$  em simultâneo para todos os álcoois testados numa mesma membrana, na gama de temperaturas indicada. A variabilidade encontrada nos resultados obtidos foi elevada, independentemente da composição de ceras das cutículas reconstituídas. Tendo em conta a distribuição de resultados que foi obtida com um maior número de determinações de  $P_{\text{álcool}}$  quando este parâmetro foi determinado na cutícula e na matriz cuticular (Capítulo 2, Figura 2.18), optou-se por apresentar os resultados das medições de  $P_{\text{álcool}}$  em termos da mediana dos valores obtidos. Os resultados das medições efectuadas à temperatura de 20 °C são apresentados na Tabela 4.3, para comparação de  $P_{\text{álcool}}$  entre membranas a uma mesma temperatura.

**Tabela 4.3.** Permeância,  $P_{\text{álcool}}$ , de cutículas reconstituídas com diferente composição de ceras, CR-ET, CR-C14, CR -C18 e CR -M, a uma série de álcoois, a 20 °C.

Álcool	$P_{\text{álcool}} (\times 10^{-9} \text{ m s}^{-1})$			
	CR-ET ( $n = 4$ ) <sup>a</sup>	CR-C14 ( $n = 4$ )	CR-C18 ( $n = 4$ )	CR-M ( $n = 4$ )
Metanol	29,8	25,8	28,0	25,0
Etanol	19,3	17,5	19,0	17,2
1-Propanol	23,8	25,5	26,7	22,1
2-Propanol	13,0	12,6	13,3	11,5
1-Butanol	45,1	48,0	49,6	40,4
2-Metil-1-propanol	28,4	30,5	31,8	25,9
2-Metil-2-propanol	7,8	8,4	9,3	7,1

<sup>a</sup> Número de determinações.

Relativamente a um dado álcool,  $P_{\text{álcool}}$  foi muito semelhante em todas as membranas reconstituídas (Tabela 4.3), independentemente da composição de ceras, registando-se em todas as membranas uma diminuição progressiva de  $P_{\text{álcool}}$  na série de álcoois de 1-butanol,

2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol, assim como na série de álcoois de metanol, etanol e 2-propanol. A permeância das membranas a 1-propanol foi relativamente elevada, semelhante à encontrada para metanol. A divisão em duas séries, ou dois grupos, de permeantes reflecte a anterior discussão dos resultados apresentados para a cutícula e sua matriz, no Capítulo 2, onde se evidenciou uma distinta relação entre  $P_{\text{álcool}}$  e o coeficiente de partição entre a membrana e água ( $K_p$ ) e o raio molecular de van der Waals,  $r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  do álcool nas duas séries de permeantes. Também nas membranas reconstituídas, para os álcoois 2-metil-2-propanol, 2-metil-1-propanol e 1-butanol, a permeância das membranas aumentou proporcionalmente ao aumento de  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  do álcool, enquanto que, para os álcoois metanol, etanol e 2-propanol, a relação entre a permeância das membranas e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  foi inversa.

Os gráficos de Arrhenius, representando  $\ln P_{\text{álcool}}$  em função de  $1/T$ , permitiram a determinação da energias de activação para o transporte transmembranar de cada álcool em cada uma das cutículas reconstituídas que foram testadas. Observou-se uma relação linear de  $\ln P_{\text{álcool}}$  com  $1/T$ , para todas as membranas, sem que houvesse indicação da ocorrência de transições de fase. O ajuste de uma equação linear aos dados experimentais resultou em coeficientes de correlação geralmente superiores a 0,98 e nunca inferiores a 0,96. A energia de activação para o transporte de cada álcool em cada tipo de cutícula reconstituída é apresentada como a mediana dos valores obtidos para cada caso, na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Energia de activação,  $E_a$ , para o transporte de vários álcoois em cutículas reconstituídas com diferente composição de ceras, CR-ET, CR-C14, CR-C18, CR-M.

Álcool	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )			
	CR-ET ( $n = 4$ ) <sup>a</sup>	CR-C14 ( $n = 4$ )	CR-C18 ( $n = 4$ )	CR-M ( $n = 4$ )
Metanol	52,8	53,3	52,6	49,4
Etanol	61,5	61,3	61,4	56,1
1-Propanol	60,9	61,1	60,8	55,2
2-Propanol	70,2	68,9	70,9	65,7
1-Butanol	55,4	56,8	55,0	49,6
2-Metil-1-propanol	61,8	62,3	61,7	56,3
2-Metil-2-propanol	74,7	75,2	74,4	71,5

<sup>a</sup>Número de determinações.

Registou-se um aumento progressivo de  $E_a$  na série de 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol, na medida em que diminuiu  $K_p/r_{vdw}(f/f_0)$  para o álcool, enquanto que na série de álcoois que compreende metanol, etanol e 2-propanol,  $E_a$  aumentou gradualmente com o aumento de  $r_{vdw}(f/f_0)$  do álcool. A energia de activação para o transporte de 1-propanol foi semelhante à encontrada para metanol.

## 4.6 Discussão

O modelo de cutícula vegetal que se projectou desenvolver neste trabalho pretende simular uma cutícula vegetal natural na sua estrutura básica, tornando, ao mesmo tempo, manipulável a sua composição no que diz respeito aos componentes solúveis da cutícula, as ceras. Com esse objectivo, desenvolveu-se e testou-se uma membrana semelhante a uma cutícula natural, composta por uma matriz cuticular natural isolada da cutícula de tomate, na qual se procurou reconstituir a barreira difusional de ceras introduzindo ceras artificiais de comportamento de fases conhecido. As cutículas modelo foram denominadas cutículas reconstituídas (CR) por se pretender reconstituir (em sentido lato) a barreira ao transporte difusional desempenhada pela cutícula natural.

Para obtenção de membranas CR, pretendeu-se reproduzir o modo como as ceras são colocadas numa cutícula natural, o que, segundo se pensa, ocorre por difusão das ceras desde as células da epiderme onde são sintetizadas até à superfície externa da cutícula. Considerando essa característica da impregnação natural da matriz cuticular com ceras, iniciou-se a reconstituição de cutículas modelo com a colocação de uma solução das ceras pretendidas em contacto com a superfície interior de uma matriz cuticular. Essa solução foi deixada a embeber a membrana, ao mesmo tempo que se promoveu a evaporação do solvente a partir da superfície exterior, o que foi levado a cabo recorrendo à utilização da célula de permeação desenvolvida e utilizada nos estudos de permeação apresentados no Capítulo 2. Com este processo de reconstituição, pretendeu-se que as ceras fossem arrastadas pelo solvente até à superfície, onde devem formar depósitos cristalinos após a evaporação completa do solvente.

Para o desenvolvimento de um procedimento para a reconstituição do conteúdo de ceras das cutículas modelo, comparou-se primeiro o efeito da introdução de extracto total de ceras de tomate (ET) e de uma mistura artificial de ceras, a mistura equimolar de

1-tetradecanol e 1-octadecanol (M). Registrando a permeância a protões,  $P_{H^+}$ , de membranas CR-ET e CR-M à medida que se aumentou gradualmente o seu conteúdo em ceras, demonstrou-se que tanto a mistura natural de ceras, ET, como a mistura artificial, M, reduziram  $P_{H^+}$  para cerca de 40% do valor inicialmente medido numa matriz cuticular, atingindo-se a esta percentagem de redução uma saturação do efeito de barreira das ceras introduzidas na cutícula modelo. No entanto, a mistura natural foi mais eficiente na reconstituição da barreira de ceras da cutícula do que a artificial pois, numa membrana com uma área superficial de  $1 \text{ cm}^{-2}$ , foi necessário aplicar cerca de 3 mg de M para conseguir o mesmo efeito da aplicação de 1 mg de ET (Figura 4.2).

Após estabelecer a quantidade de ET e de M necessárias para recuperar valores de  $P_{H^+}$  idênticos aos encontrados numa cutícula natural, confirmou-se que o processo de reconstituição das ceras nas cutículas modelo resultou, não só, na impregnação da membrana MC base com as ceras aplicadas, como também, na acumulação de depósitos de ceras na superfície externa das membranas, conforme se pretendia inicialmente. A quantidade de ceras que foram removidas da superfície externa das membranas CR-ET e CR-M testadas situou-se, em ambos os casos, entre 0,1 e 0,2 mg  $\text{cm}^{-2}$ . A primeira conclusão a tirar destes resultados é a de que a quantidade de ceras que se depositou na superfície externa das membranas não foi directamente proporcional à quantidade total de ceras aplicada durante o processo de reconstituição (por  $\text{cm}^2$  de membrana exposta, 1 mg, no caso de ET, ou 3 mg, no caso de M). Para comparar o rendimento de deposição de ceras na superfície externa das cutículas reconstituídas com a quantidade de ceras encontrada à superfície de uma cutícula de tomate natural, considere-se que esta última possui um conteúdo total de ceras situado entre 3% e 5% do seu peso seco total (Capítulo 2, Secção 2.6.1). Sabendo que a massa por unidade de superfície desta cutícula (conforme determinado gravimetricamente) é de cerca de 2 mg  $\text{cm}^{-2}$ , conclui-se que a quantidade de ceras encontrada à superfície das membranas reconstituídas com ET ou M foi muito superior à quantidade total de ceras que se poderia encontrar uma cutícula de tomate com essa área superficial.

Após o processo de reconstituição das membranas CR-ET e de CR-M, foi também patente que a concentração de ceras atingida nas membranas CR-M foi muito superior à encontrada em membranas CR-ET. Neste ponto, outra questão que se coloca é a de como se compara a quantidade de ET incluída em CR-ET com o conteúdo de ceras de uma cutícula natural. Atendendo a que a espessura da cutícula de tomate pode ser estimada em 9  $\mu\text{m}$

(Jeffree, 1996), e considerando o conteúdo relativo de ceras e a densidade por unidade de superfície da cutícula natural de tomate referidos anteriormente, calcula-se que a densidade de ceras numa cutícula de tomate se situe entre 60 e 100 mg cm<sup>-3</sup>. Do mesmo modo, conclui-se que a quantidade de ET acumulada no interior da matriz e na superfície externa das membranas CR-ET foi superior a 800 mg cm<sup>-3</sup>. Apesar de este valor ser muito superior ao que é encontrado em cutículas naturais, foi o necessário para recuperar em CR-ET uma permeância a protões semelhante à encontrada numa cutícula natural. Conforme se pode constatar pelos resultados apresentados na Figura 4.2, a aplicação de uma quantidade de ET semelhante à encontrada nas cutículas naturais na membrana CR-ET não se traduziria nessa recuperação, a qual era um dos objectivos pretendidos com a reconstituição da camada de ceras nas membranas artificiais.

A introdução das duas misturas de ceras, ET e M, nas quantidades já referidas levou à recuperação dos valores de  $P_{H^+}$  encontrados na cutícula natural de tomate (Figura 4.3). No entanto, só o extracto natural de ceras de tomate foi eficaz em reduzir a mobilidade de protões ( $D_{ap}$ ) para um valor semelhante ao encontrado em cutículas naturais (Figura 4.4). Também se testou a utilização de álcoois alifáticos puros, 1-tetradecanol ou 1-octadecanol, na reconstituição da barreira de ceras na matriz cuticular, sendo evidente o seu efeito em reduzir  $P_{H^+}$  da membrana, mas numa percentagem menor do que a atingida com a mesma quantidade da mistura binária equimolar dos mesmos álcoois. Ao mesmo tempo, a presença dos álcoois puros na membrana não alterou  $D_{ap}$  para protões encontrado para a matriz cuticular.

De acordo com os modelos de transporte transcuticular (Capítulo 2), por dissolução na membrana (Equação 2.3), ou por difusão através de poros polares (Equação 2.5), compreende-se que  $P_{H^+}$  seja dependente não só de  $D_{ap}$  como também da espessura da membrana e da concentração de protões na membrana. A quantidade de protões que uma membrana de dissolução pode comportar é traduzida pelo coeficiente de partição destes iões para a membrana enquanto que numa membrana porosa, essa quantidade é uma função da fracção de área porosa da membrana. Assim, quando a alteração observada em  $P_{H^+}$  pela introdução de ceras não é da mesma medida que a alteração registada em  $D_{ap}$ , conclui-se que ocorreram alterações na concentração de protões na membrana, ou na área de poros da membrana, ou na sua tortuosidade, ou em todos estes factores em simultâneo, como consequência da introdução destas ceras na matriz cuticular. Só com a determinação de  $K_p$  para protões ou com uma estimativa da área efectiva dos poros na membrana e sua capacidade

de fixação destes iões, antes e depois da introdução de ceras, se poderia esclarecer este aspecto do transporte de protões nas membranas modelo.

A natureza do percurso de difusão de protões, ou de iões em geral, nas cutículas reconstituídas é desconhecida e pode, eventualmente ser distinto do que existirá numa cutícula natural. A determinação de energias de activação para o transporte de vários tipos de permeantes através das membranas reconstituídas fornecerá mais informações acerca desta questão. Com esse fim, estudou-se a influência da temperatura na permeância a  $\text{Na}^+$  e aos álcoois metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol, de todas as cutículas reconstituídas, CR-ET, CR-C14, CR-C18 e CR-M, à semelhança do estudo que foi feito no Capítulo 2 em cutículas naturais de tomate e sua matriz cuticular. Os resultados obtidos para a cutícula natural, sua matriz polimérica e nas membranas reconstituídas podem, então, ser comparados.

A determinação de  $P_{\text{Na}^+}$  e de  $P_{\text{álcool}}$  a temperaturas entre 15 e 60 °C, numa série de membranas reconstituídas, permitiu obter a energia de activação,  $E_a$ , para o transporte de cada permeante em cada membrana testada. Em todos os casos, foi observada uma relação linear entre  $\ln P$  e  $1/T$ , sem descontinuidades indicadoras de transições de fase, independentemente das ceras utilizadas na reconstituição, fossem elas naturais (ET) ou artificiais (C14, C18, M). Já anteriormente, nos estudos em cutícula de tomate (C) e sua matriz cuticular (MC) apresentados no Capítulo 2, tinha sido relatada a ausência de transições de fase que afectassem o transporte destes permeantes tanto na cutícula como na sua matriz, na mesma gama de temperaturas. Se bem que esta observação se poderia justificar em MC, pela ausência de ceras, e em C, pela larga gama de temperaturas em que se registou a transição de fase do extracto natural de ceras (Figura 2.15 do Capítulo 2), foi inesperada no que diz respeito às cutículas reconstituídas no caso de CR-C14 e CR-M, pois tanto 1-tetradecanol como a mistura binária de álcoois apresentam uma transição de sólido a líquido na região de temperaturas examinada. Mais exactamente, esta transição situa-se a 37 °C, no caso de C14 (Capítulo 3, Tabela 3.1), e entre 32 °C e 50 °C no caso de M (Capítulo 3, Figura 3.19). Estas observações sugerem que as ceras depositadas nas membranas CR não constituíram o meio de difusão, nem de  $\text{Na}^+$ , nem dos álcoois em estudo, pelo menos não mais do que a própria matriz cuticular.

A observação anterior, de que a introdução de ceras na reconstituição de cutículas modelo não alterou o mecanismo de permeação de iões  $\text{Na}^+$ , foi corroborada pela grande semelhança encontrada entre  $E_a$  medida para o transporte deste ião nas várias membranas

reconstituídas, CR-ET, CR-C14, CR-C18 e CR-M, e nas membranas C e MC (resultados do Capítulo 2). Em qualquer das membranas mencionadas,  $E_a$  para a permeação de  $\text{Na}^+$  esteve compreendida entre  $22 \text{ kJ mol}^{-1}$  (registada para membranas C e CR-ET) e  $26 \text{ kJ mol}^{-1}$  (registada em membranas CR-14). Face à variabilidade das membranas pode concluir-se, mesmo, que  $E_a$  para o transporte de  $\text{Na}^+$  foi idêntica em todas elas.

Tal como observado para as membranas C e MC, a barreira energética encontrada para o transporte de  $\text{Na}^+$  nas cutículas reconstituídas foi inferior à energia livre de desidratação do ião, de  $365 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Marcus, 1991). Este resultado indica que a difusão do ião através das referidas membranas não envolveu a sua desidratação, uma vez que, se fosse esse o caso, a barreira energética a superar teria de ser pelo menos igual à respectiva energia livre de desidratação. A difusão transcúticular do ião hidratado pode ser melhor entendida considerando o modelo de transporte por difusão numa membrana porosa, com poros de diâmetro superior ao do ião hidratado, do que tomando em conta o modelo de permeação por dissolução na membrana. A dissolução do ião no meio apolar da membrana, nomeadamente nas ceras aí contidas, implicaria a perda da esfera de hidratação que rodia o ião em solução aquosa. Por outro lado, a dimensão do ião  $\text{Na}^+$  hidratado, com um raio hidrodinâmico de  $0,164 \text{ nm}$  (Tabela 2.3, Capítulo 2) é compatível com a difusão através de poros polares com as dimensões propostas para estas estruturas, com um raio médio de  $0,45 \text{ nm}$ , (Schönherr, 1976a,b).

Na série de álcoois testados como permeantes das várias cutículas reconstituídas, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-2-propanol, o raio molecular de van der Waals variou entre  $0,236 \text{ nm}$  (para metanol) e  $0,293 \text{ nm}$  (para os álcoois com 4 átomos de carbono), conforme pode constatar-se nos dados da Tabela 2.4, apresentada no Capítulo 2. O reduzido raio molecular de todos os álcoois testados torna-os, pois, bons candidatos ao transporte através de poros polares com as dimensões anteriormente referidas. No entanto, a barreira de energia encontrada para o transporte destes mesmos álcoois em qualquer das membranas CR foi, em todos os casos, superior a cerca de  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Tabela 4.6), bastante superior, pois, à energia de activação para o transporte de  $\text{Na}^+$ , o que indica que as membranas reconstituídas oferecem uma maior resistência ao transporte de qualquer dos álcoois do que de iões  $\text{Na}^+$ . O mesmo tinha já sido observado em C e MC (resultados do Capítulo 2).

Colocando a hipótese de que os álcoois testados são transportados por dissolução no meio apolar das membranas CR, deve esperar-se um aumento linear da permeância das membranas a estes álcoois,  $P_{\text{álcool}}$ , em função do aumento do coeficiente de partição do álcool entre a membrana e a solução aquosa,  $K_p$ , e em função da diminuição das dimensões da molécula, expressas pelo seu raio molecular de van der Waals  $r_{\text{vdw}}$ . De acordo com a Equação 2.12, apresentada no Capítulo 2, isso mesmo seria expresso por uma relação de proporcionalidade entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$ , a uma temperatura constante e num meio de difusão comum. No entanto, e tal como já observado com membranas C e MC, em qualquer das membranas CR só se observou a relação esperada entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  para os álcoois 2-metil-2-propanol, 2-metil-1-propanol e 1-butanol (Tabela 4.3). Estes foram classificados num Grupo I de permeantes, assumindo que o modelo de transporte transmembranar que melhor se aplica a estes álcoois é o de dissolução na membrana. No entanto, para outros álcoois (metanol, etanol e 2-propanol), classificados num Grupo II de permeantes, registou-se uma melhor correlação entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  do que entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$ . Isso mesmo seria o esperado de acordo com os factores que podem limitar a difusão numa membrana porosa, como é o caso das dimensões do permeante quando próximas das dimensões dos poros. Todas as medições de  $P_{\text{álcool}}$  em membranas CR-ET, CR-C14, CR-C18 e CR-M a diferentes temperaturas revelaram a mesma boa correlação entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  para os álcoois do Grupo I e entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  para os álcoois do Grupo II, à semelhança do que já fora observado na cutícula e sua matriz cuticular.

Os valores de  $P_{\text{álcool}}$  medidos nas membranas CR foram semelhantes aos encontrados para a matriz cuticular (comparar a Tabela 4.3 deste Capítulo com a Tabela 2.4 do Capítulo 2). Também a barreira energética para o transporte de álcoois nas membranas CR, quer na série do Grupo I, quer na série do Grupo II, foi semelhante à encontrada em membranas MC (comparar a Tabela 4.4 deste Capítulo com a Tabela 2.5 do Capítulo 2), o que leva a concluir que a reconstituição da camada de ceras nas cutículas modelo não se traduziu no restabelecimento da barreira à difusão destes permeantes desempenhada pela cutícula. No entanto, a introdução de ceras na matriz cuticular para obtenção de membranas CR resultou sistematicamente numa redução de  $P_{\text{H}^+}$  para valores próximos dos encontrados em cutículas naturais (Figura 4.4). Relacionando a permeância de membranas C e MC e de todas as membranas CR relativamente a todos os álcoois testados com a respectiva permeância a protões, sob a forma de razão  $P_{\text{álcool}}/P_{\text{H}^+}$ , conforme apresentado na Tabela 4.5, tornou-se evidente que nas membranas reconstituídas se reduziu, efectivamente,  $P_{\text{H}^+}$  mas não  $P_{\text{álcool}}$ .

Calculando a relação entre  $P_{\text{álcool}}$  e a permeância encontrada para metanol nas várias cutículas reconstituídas,  $P_{\text{álcool}}/P_{\text{metanol}}$ , a partir dos valores apresentados na Tabela 4.3, e incluindo nesta comparação as membranas C e MC a partir dos valores apresentados na Tabela 2.4 (Capítulo 2), pode notar-se que a relação entre a permeabilidade dos vários álcoois é a mesma nas várias membranas, independentemente da presença de ceras ou da sua composição. Reforça-se, pois, a conclusão de que a inclusão artificial de ceras em qualquer das membranas CR preparadas afectou o transporte de protões mas não o transporte dos álcoois, independentemente da composição de ceras utilizada. As observações anteriores só poderão ser conciliadas considerando que o mecanismo de permeação de cada um dos álcoois testados é comum entre a cutícula, a sua matriz e qualquer das cutículas reconstituídas. Compreende-se que  $P_{\text{álcool}}$  seja reduzido na cutícula natural, não por esta apresentar um meio de difusão diferente do da matriz cuticular, mas porque o percurso de difusão destes álcoois na cutícula apresentará uma maior tortuosidade, independentemente de a difusão implicar a dissolução do álcool na membrana, ou ocorrer através de poros. O mecanismo de transporte de álcoois terá de ser distinto, em todos os casos, do mecanismo de transporte de protões. Mas, se assim for, o proposto transporte de alguns dos álcoois por difusão através de poros polares teria de se distinguir também do mecanismo de transporte de protões pelos mesmos poros polares. Essa possibilidade pode ser considerada se for tido em conta que os grupos funcionais com carga negativa que participam na composição dos poros polares (Schönherr e Bukovac, 1973) facilitam a adsorção de iões com carga positiva e, em consequência, o seu transporte através da membrana, podendo não influenciar o transporte de pequenos solutos não carregados, como os álcoois em questão. Considere-se a possibilidade de que a inclusão de ceras da maneira artificial que se propôs resulte, afinal, num isolamento, total ou parcial, dessas cargas, independentemente da composição das ceras. Nesse caso, com a introdução artificial de ceras ocorreria uma *hidrofobização* da membrana, a qual se traduziria numa diminuição do coeficiente de partição de protões para a membrana ou na redução do grau de percolação do percurso de difusão utilizado por estes iões. Em ambos os casos, o resultado seria uma redução da permeância a protões. A permeância a álcoois não diminuiria, conforme foi registado, desde que não se alterasse o diâmetro nem o número de poros uma vez que, segundo o raio estimado por Schönherr (1976a, b), de 0,45 nm, poderão acomodar, pelo menos, o diâmetro de uma cadeia de polimetileno e permitir a difusão dos álcoois em questão.

**Tabela 4.5.** Comparação de  $P_{\text{álcool}}/P_{\text{H}^+}$  em membranas C, MC (resultados do Capítulo 2), e em cutículas reconstituídas com diferentes composição de ceras, CR-ET, CR-C14, CR-C18, CR-M.

Álcool	$P_{\text{álcool}} / P_{\text{H}^+}$					
	C ( $n = 20$ ) <sup>a</sup>	MC ( $n = 22$ )	CR-ET ( $n = 4$ )	CR-C14 ( $n = 4$ )	CR-C18 ( $n = 4$ )	CR-M ( $n = 4$ )
Metanol	3,0	5,9	7,2	6,1	7,7	6,1
Etanol	2,3	4,1	4,7	4,1	5,2	4,2
1-Propanol	2,5	5,3	5,7	6,0	7,3	5,4
2-Propanol	1,5	3,0	3,1	3,0	3,6	2,8
1-Butanol	3,8	8,8	10,9	11,3	13,6	9,8
2-Metil-1-propanol	2,7	5,9	6,8	7,2	8,7	6,3
2-Metil-2-propanol	1,2	2,1	1,9	2,0	2,5	1,7

<sup>a</sup> Número de determinações.

Se a hipótese anterior pode explicar as diferenças encontradas entre  $P_{\text{H}^+}$  e  $P_{\text{álcool}}$  em consequência da introdução de ceras na matriz cuticular para obtenção das membranas CR, e se o mecanismo de permeação de  $\text{Na}^+$  for semelhante ao de prótons, então, acompanhando a redução de  $P_{\text{H}^+}$  com a introdução de ceras, devia registrar-se uma correspondente redução em  $P_{\text{Na}^+}$ . No entanto os valores de  $P_{\text{Na}^+}$  medidos nas membranas reconstituídas (Figura 4.5) foram da ordem dos encontrados nas membranas MC, e não semelhantes aos medidos em C, como se esperaria se o mecanismo de permeação de  $\text{Na}^+$  fosse o mesmo que o de prótons. Daqui se conclui, pois, que o transporte de prótons através da cutícula e das outras membranas dela derivadas foi distinto do de outros íons ou de pequenas moléculas polares potenciais utilizadoras do mecanismo de permeação por poros polares, como os álcoois classificados no Grupo II de permeantes.

A relação encontrada entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $P_{\text{H}^+}$  nas várias membranas CR não foi a encontrada em cutículas naturais. Este resultado é uma indicação de que a distribuição de ceras conseguida com o processo de reconstituição desenvolvido não emulou como se pretendia o modo natural de colocação das ceras na membrana cuticular modelo. Afinal, o processo de impregnação da matriz cuticular com ceras e o seu alcance da superfície externa da cutícula como ceras epicuticulares pode ser bem mais complexo do que o proposto por alguns autores (Anton *et al.*, 1994; Neinhuis *et al.*, 2001), os quais consideram ter recolhido evidências

experimentais de que as ceras cuticulares difundem homoganeamente através da cutícula, desde as células da epiderme até à superfície, onde cristalizam.

Colocando a hipótese de a barreira de ceras encontrada na cutícula natural não ter sido reconstituída nas membranas modelo, coloca-se agora a questão da interpretação dos resultados obtidos para os álcoois mais hidrofóbicos, do Grupo I de permeantes (2-metil-2-propanol, 2-metil-1-propanol e 1-butanol), com os quais se verificou uma boa correlação entre  $P_{\text{álcool}}$  e  $K_p/r_{\text{vdw}}(f/f_0)$  nas membranas reconstituídas, tal como na cutícula e na matriz cuticular (Capítulo 2). Os resultados obtidos sugerem que também a dissolução num meio de características apolares não foi influenciada significativamente pela composição em ceras da membrana, pelo menos para o caso de permeantes de reduzidas dimensões moleculares como são os álcoois classificados no citado Grupo I de permeantes.

As considerações anteriores podem ser uniformizadas com o conhecimento actual da estrutura da cutícula se considerarmos que a matriz cuticular congrega em si um carácter anfífilico, uma vez que contém grupos polares, alguns com carga iónica negativa, resultantes da polimerização incompleta de alguns dos ácidos gordos polihidroxilados que constituem os monómeros deste biopolímero, e que contém, também, domínios de cadeias de polimetileno que separam os seus grupos funcionais hidroxilo e carbonilo. Enquanto que os grupos funcionais polares são bons candidatos a constituir o meio hidrofílico da cutícula e os seus poros polares, os segmentos de polimetileno são um bom meio de dissolução de compostos hidrofóbicos. E, deste modo, são congregadas as características de membrana de dissolução e também de matriz porosa na própria matriz cuticular. As observações feitas no âmbito deste Capítulo, relativas a cutículas reconstituídas com diferentes composições de ceras, e do Capítulo 2, relativas à cutícula e sua matriz polimérica de cutina, indicam que a presença de ceras constituirá mais um factor de tortuosidade no percurso de difusão de permeantes do que efectivamente um meio onde os permeantes se dissolvem e difundem para o seu transporte através da cutícula.

Em resumo, as observações feitas no presente trabalho apontam para o aumento de tortuosidade da membrana com a introdução de ceras e registam a mesma selectividade relativamente aos permeantes testados,  $H^+$ ,  $Na^+$  e álcoois de  $C_1$  a  $C_4$ , para a cutícula natural, sua matriz cuticular e membranas reconstituídas, independentemente da presença ou da composição de ceras na membrana. Estes resultados surgem em concordância com observações de uma selectividade idêntica entre matriz cuticular e cutícula relativamente à

permeação de vários compostos orgânicos, com as quais se havia concluído que o conteúdo em ceras da cutícula contribui essencialmente para aumentar a tortuosidade da barreira difusional (Baur *et al.*, 1996; Baur *et al.*, 1999a). Além do mais, estes últimos estudos demonstraram que se observa a mesma dependência entre o coeficiente de difusão de um permeante lipofílico e o respectivo volume molar, tanto na matriz cuticular como na cutícula, sendo esta relação também a mesma que é encontrada em polímeros de polimetileno sintéticos (Schlotter e Furlan, 1992). Destas observações, conclui-se que a matriz polimérica de cutina diferirá das ceras cuticulares principalmente na viscosidade, pelo menos relativamente à difusão de compostos orgânicos nelas dissolvidos.

Em face do anteriormente exposto, coloca-se a questão da finalidade das diferenças encontradas na composição de ceras entre diversas cutículas. É provável que constituam um factor de regulação da tortuosidade do percurso de difusão, com implicações directas no equilíbrio de fases que é necessário para as ceras, de modo a obter uma dada tortuosidade no meio onde os permeantes podem difundir, num determinado contexto ambiental. Essa alteração poderá afectar tanto o transporte de compostos que se dissolvem e difundem num meio apolar, como o transporte de permeantes que particionem para os poros polares da cutícula, embora se possa colocar a hipótese de afectar mais significativamente o primeiro tipo de transporte. Em concordância com esta interpretação, encontra-se uma melhor correlação entre diferenças na permeância de cutículas de várias espécies de plantas e diferenças de mobilidade de compostos orgânicos nas mesmas cutículas do que entre a permeância e o coeficiente de partição desses compostos para a cutícula, o qual é muito semelhante entre cutículas de diferentes composições de ceras (Bauer e Schönherr, 1992).

Discute-se a capacidade da cutícula modelo de emular a barreira difusional da cutícula natural de tomate. Propõe-se uma revisão do modelo de organização estrutural da cutícula que é actualmente considerado como hipótese de estudo das propriedades de transporte da cutícula vegetal. Apresentam-se novas estratégias para o estudo do transporte difusional na cutícula vegetal, explorando o modelo de cutícula proposto inicialmente para o presente trabalho.

---

# Conclusões Gerais

## e Perspectivas de Investigação Futura

### Conclusões Gerais

Muito está ainda por esclarecer relativamente à barreira cuticular. Particularizando para os objectivos que foram propostos no início deste trabalho, com o qual se pretendeu observar as consequências do polimorfismo das ceras cuticulares para a função de barreira da cutícula vegetal, muito fica por esclarecer relativamente ao papel das ceras cuticulares no transporte transcuticular. Como expresso no início, o objectivo de encontrar uma correlação entre propriedades de transporte da cutícula e o comportamento termotrópico das suas ceras seria melhor atingido recorrendo a sistemas modelo. A justificação é tão somente a da complexidade de composição do sistema cuticular tal como encontrado *in vivo*. Tal complexidade de composição reflecte-se, necessariamente, numa complexidade de estrutura que será dificilmente emulada em sistemas modelo se não forem aí respeitadas condições o mais próximas possível das encontradas nos sistemas naturais.

O modelo de cutícula desenvolvido foi o de uma membrana composta pela matriz cuticular natural da cutícula de tomate, na qual as ceras originais, de composição complexa e

variável, foram substituídas por ceras de composição qualitativa e quantitativa controlada. Seria necessário conhecer o comportamento de fases em função da temperatura das ceras finalmente utilizadas na obtenção de membranas modelo e por isso se caracterizou o comportamento termotrópico da mistura binária de 1-tetradecanol e 1-octadecanol, pelas razões já explicitadas no Capítulo 3.

Sendo o objectivo principal do trabalho conceber e produzir uma membrana modelo da cutícula vegetal, embora mais simples e flexível que esta, também seria necessário que a membrana modelo imitasse a cutícula original no que diz respeito às propriedades de transporte, as quais se pretendem, finalmente, examinar, muito embora possa descurar outras funções desempenhadas pela cutícula (Capítulo 1). Utilizou-se como base estrutural da membrana modelo a matriz cuticular da cutícula de tomate, na qual se depositaram as ceras pretendidas de acordo com um procedimento desenvolvido no âmbito do Capítulo 4. Foram obtidas cutículas modelo com composições bastante diferentes de ceras, desde extracto natural de ceras da cutícula de tomate, a uma mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol, passando pela utilização de cada um dos referidos álcoois alifáticos, individualmente, como ceras reconstituíntes.

Foi necessário avaliar a proximidade do modelo à cutícula original, pelo que se realizaram, primeiro, estudos de transporte na cutícula de tomate e sua matriz cuticular, no Capítulo 2. Os permeantes testados incluíram protões, uma série de iões de metais alcalinos, o ião amónio, uma série de iões halogeneto, e, finalmente uma série de álcoois de baixo peso molecular, entre  $C_1$  e  $C_4$ , de crescente volume molar e hidrofobicidade. Com esta série de permeantes, pretendeu-se recolher informação acerca das restrições à difusão de iões e de pequenas moléculas polares não electrolíticas através de uma membrana com características essencialmente apolares, como é a cutícula. Ao mesmo tempo, estudou-se a selectividade dos mecanismos de permeação apontados como responsáveis pelas propriedades de transporte da cutícula, o de dissolução na membrana apolar e o de difusão por poros polares aí existentes, relativamente a estes grupos de permeantes. Após os estudos de permeabilidade da membrana cuticular, na presença e na ausência de ceras, foi levado a cabo um estudo semelhante nas cutículas modelo com diferentes composições de ceras, no Capítulo 4.

Fazendo uma avaliação global dos resultados obtidos para a cutícula natural e sua matriz, concluiu-se que a presença de ceras na cutícula de tomate se traduziu numa diminuição generalizada da permeância da membrana, quer relativamente a iões quer relativamente a

qualquer dos álcoois testados. Com as medições da permeância a protões,  $P_{H^+}$ , da cutícula e sua matriz, e também do coeficiente aparente de difusão de protões,  $D_{ap}$ , nas mesmas membranas, observou-se que o aumento de  $P_{H^+}$  registado em consequência da extracção das ceras se deveu tanto a um aumento  $D_{ap}$ , embora ligeiro, como também à diminuição da tortuosidade ou a um aumento da capacidade de dissolução de protões na membrana. A concentração de protões na membrana será função do seu coeficiente de partição para a membrana, de acordo com o modelo de transporte por dissolução do permeante na membrana (Equação 2.3), ou função da fracção de membrana porosa, se for considerando o modelo que prevê a possibilidade de difusão de permeante através de poros polares (Equação 2.5). Só a determinação destes dois parâmetros na cutícula e na sua matriz esclareceria definitivamente a questão de quais dos factores que determinam  $P_{H^+}$  são afectados pela presença das ceras.

Nas cutículas modelo, demonstrou-se uma ligeira diminuição de  $D_{ap}$  relativamente ao encontrado na matriz cuticular somente no caso das membranas em que foi depositado o extracto total de ceras de tomate. Com todas as outras composições de ceras, a mistura equimolar de 1-tetradecanol e 1-octadecanol, ou cada um dos álcoois no estado puro, a recuperação de  $P_{H^+}$  encontrado em cutículas naturais não foi acompanhada por uma redução de  $D_{ap}$ . Assim, a diferença de  $P_{H^+}$  encontrada entre a matriz cuticular e membranas reconstituídas com a mistura de álcoois, ou com os álcoois puros, deveu-se a alterações capacidade de dissolução ou no percurso de difusão do ião na membrana e não na sua mobilidade. Acrescenta-se, como dado importante, que a redução de  $P_{H^+}$  conseguida com os álcoois puros foi inferior à conseguida com a utilização da sua mistura em proporções equimolares, ou com o extracto total de ceras de tomate, sendo esta mistura a mais eficiente em reduzir  $P_{H^+}$  inicial na matriz cuticular.

Tentando encontrar uma correlação entre a permeância da cutícula, e da sua matriz, a iões e as dimensões dos iões, obtiveram-se resultados indicativos de que as diferenças no transporte dos vários iões testados deverão ser bastante reduzidas e terão sido, por isso, mascaradas pela elevada variabilidade de permeância encontrada entre membranas do mesmo tipo. Porém, verificando que a energia de activação para o transporte de  $H^+$  e  $Na^+$  foi inferior à energia necessária para a desidratação destes iões, concluiu-se que o mais provável é que os iões sejam transportados tanto na cutícula natural como na matriz cuticular por um mecanismo que não implique a sua desidratação. Esta seria necessária se ocorresse a sua dissolução no meio apolar da cutícula, como o constituído pelas ceras cuticulares. Assim,

conclui-se que os iões deverão permear estas membranas utilizando as facilidades de difusão por poros aí existentes. Determinando a energia de activação para o transporte de  $\text{Na}^+$  nas membranas modelo, concluiu-se que este ião deverá permea-las, também, no seu estado hidratado, pelo que estas possuirão as facilidades de membrana porosa da cutícula natural e da matriz cuticular. Apesar da presença das ceras nas membranas reconstituídas ter diminuído a sua permeância a protões, não afectou a permeância das membranas a  $\text{Na}^+$  pois, como demonstrado, esta foi idêntica à encontrada na matriz cuticular. Assim, aparentemente, iões  $\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+$  são transportados através da membrana cuticular por mecanismos diferentes, um deles sendo influenciado pela presença de ceras e o outro não.

Nos estudos de transporte de álcoois, os resultados obtidos no âmbito do Capítulo 4 mostraram que não houve um bom restabelecimento da barreira de ceras nas cutículas reconstituídas com a deposição artificial de ceras. Muito embora as ceras tenham reduzido a permeância das membranas modelo relativamente a protões, verificando-se este efeito com todas as composições de ceras testadas, não se observou uma efectiva redução na permeância das mesmas membranas à generalidade dos álcoois, uma vez que esta foi idêntica à encontrada na matriz cuticular. Apesar de tudo, os álcoois foram transportados através da cutícula, da matriz cuticular e das membranas modelo consoante as mesmas condicionantes: o transporte dos álcoois mais hidrofílicos foi marcadamente influenciado pelas dimensões moleculares do álcool, enquanto que os álcoois mais hidrofóbicos foram transportados segundo a sua facilidade de partição para o ambiente apolar da membrana.

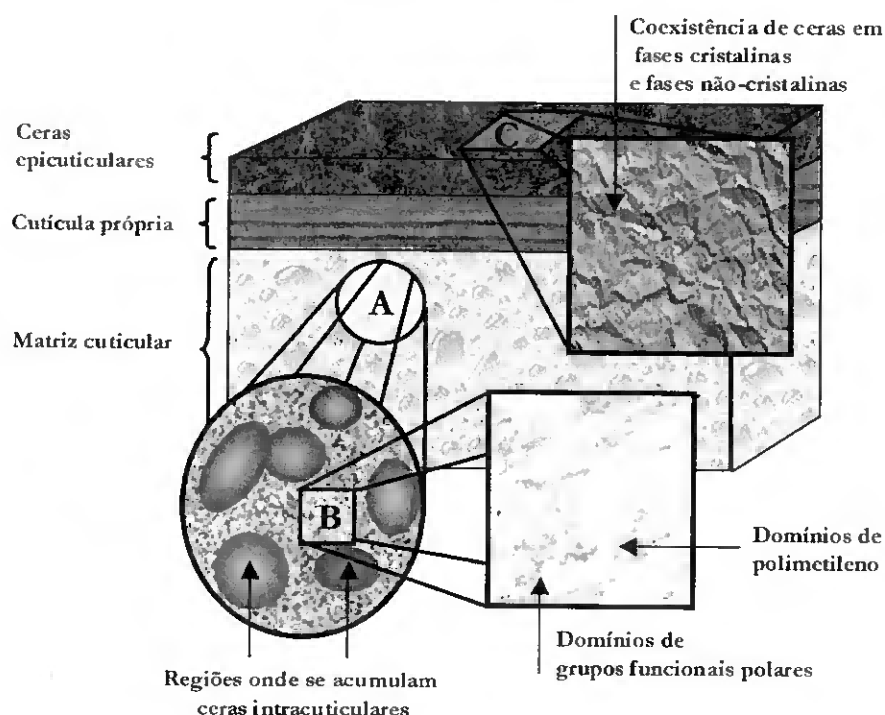
Os resultados indicam diferenças de transporte entre os iões  $\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+$  e entre álcoois hidrofóbicos e álcoois hidrofílicos. Os iões e este último grupo de álcoois são potenciais difusores através dos poros que se evidenciam na cutícula e na matriz cuticular, enquanto que os álcoois mais hidrofóbicos são potenciais permeantes por dissolução na barreira de ceras cuticulares. Enquanto que se pode entender facilmente que a difusão por poros polares não seja influenciada pela presença de ceras, quer na cutícula natural quer em qualquer das cutículas reconstituídas, uma vez que estas possam ser excluídas deste meio de difusão, o mesmo já não pode ser facilmente justificado para o transporte dependente da dissolução num meio hidrofóbico, considerando que as ceras se distribuem uniformemente na membrana e que aumentam a sua resistência à difusão passiva de permeantes. A independência do transporte dos álcoois mais hidrofóbicos relativamente à composição de ceras e ao seu estado físico pode ser, à partida, uma consequência de não se ter conseguido a reconstituição da

barreira cerosa com qualquer uma das composições de ceras testadas. No entanto, já em cutículas naturais se havia concluído que nem o transporte de íões  $H^+$  ou  $Na^+$ , nem o transporte de qualquer dos álcoois, tinha sido influenciado pelo comportamento de fases das ceras cuticulares (Capítulo 2).

Inúmeros resultados experimentais existentes na literatura sobre a permeabilidade cuticular mostram irrefutavelmente que a cutícula possui características de membrana de dissolução e de membrana porosa e ambos os mecanismos de permeação são associados a meios de difusão de diferente natureza e propriedades. Neste contexto, a cutícula é entendida como o cumulativo de duas resistências paralelas, uma relativa ao transporte por dissolução na membrana e outra à difusão por poros polares (Figura 1.7, Capítulo 1). Para conciliar os resultados obtidos neste trabalho com o modelo estrutural de cutícula actualmente aceite, é necessário propor um modelo de barreira difusional cuticular que congregue os dois percursos de difusão numa organização estrutural que permita a existência de domínios de características polares e apolares na própria matriz cuticular, além da importante contribuição das ceras intracuticulares e das ceras epicuticulares para as características de barreira da membrana cuticular.

Apresenta-se, na Figura 1, uma representação esquemática da organização estrutural de uma cutícula vegetal, proposto como conclusão deste trabalho. Nela é patente, não só a clássica distinção entre a matriz cuticular e a camada de ceras limitante à difusão, esta última concentrada junto à superfície externa da cutícula, como também se adiciona a interpretação da matriz cuticular como um compósito de domínios polares, relacionados com a presença de poros hidrofílicos, e domínios apolares, onde se concentram segmentos das cadeias de polimetileno do polímero de cutina. Incluídas na estrutura polimérica, será possível encontrar, também, as ceras intracuticulares mas só a sua distribuição não uniforme, formando aglomerados dispersos pela matriz, permite a percolação do polímero de cutina que é compatível com a independência do transporte de íões e pequenos solutos relativamente à composição de ceras da membrana, tal como verificado neste estudo. As dimensões destes aglomerados de ceras deverão ser tais que tornem o comportamento de fases das ceras cuticulares aí encontradas largamente independente da presença do polímero de cutina, em conformidade com os resultados de alguns estudos da dinâmica molecular das ceras impregnadas na cutícula (Reynhardt e Riederer, 1991; Merk *et al.*, 1998). Cada um dos referidos domínios de composição serão também domínios funcionais, com características químicas e físicas próprias e com propriedades de percolação também distintas.

No contexto da matriz cuticular anfífilica, as ceras intracuticulares serão aí integradas como barreiras à difusão, aumentando a tortuosidade do percurso de difusão na membrana. Ao mesmo tempo, constituirão o meio de difusão preferencial para permeantes lipossolúveis demasiado volumosos para serem incluídos na malha de poros de polimetileno da matriz de cutina. O transporte através de um composto de ceras impregnadas numa matriz polimérica anfífilica será necessariamente um sistema complexo, de múltiplos factores de regulação. O comportamento de fases das ceras, as intracuticulares e também as epicuticulares, influenciará o transporte por dissolução no meio ceroso, mas não afectará significativamente o transporte por difusão em poros polares ou por difusão no próprio meio apolar da matriz de cutina. Nesse âmbito, foi já demonstrado que o transporte de electrólitos é pouco influenciado por alterações da fluidez do meio ceroso dependentes da temperatura ou da utilização de compostos orgânicos que fluidizam as ceras da membrana (Schönherr, 2000, 2001, 2002).



**Figura 1.** Representação esquemática do modelo proposto para a cutícula vegetal, congregando regiões de ceras intracuticulares envolvidas pela matriz polimérica de cutina (A), uma distribuição não uniforme dos componentes da matriz cuticular em domínios polares e apolares (B) e a região onde se concentram as ceras epicuticulares em fases cristalinas e fases não-cristalinas coexistentes (C). A cutícula própria corresponde a uma região de estrutura variável entre cutículas, a qual se interpreta como domínios de cutina e ceras cuticulares sobrepostos em camadas diferenciadas. Os diversos domínios e regiões apresentarão uma barreira difusional distinta em características e grau de percolação.

No modelo apresentado, a barreira representada pela cutícula própria e pelas ceras epicuticulares poderá ser transposta por um mecanismo diferente, consoante o permeante em consideração. Na cutícula própria são encontradas regiões de cutina e de ceras cuticulares, sendo a difusão em cada uma delas dependente das características de permeante e também do respectivo grau de percolação das regiões de ceras e de cutina. Este é provavelmente reduzido, a julgar pelas evidências de que essa é a região limitante à difusão na cutícula, pelo menos do que permitem concluir os estudos de mobilidade de compostos orgânicos (Baur, *et al.*, 1999a) com volumes molares bastante superiores aos dos álcoois testados no presente estudo. Na região das ceras epicuticulares, será necessário encontrar um modelo para a permeação de pequenos electrólitos e moléculas que permeiem através da matriz polimérica, uma vez que este componente está ausente desta região. Uma hipótese a considerar serão as possíveis descontinuidades entre diferentes fases de ceras cristalinas. Dependendo das suas dimensões, estas poderão mesmo constituir uma continuidade de meio aquoso entre os domínios polares da matriz cuticular e a superfície externa da cutícula. Se esta hipótese se verificar, então o comportamento de fases das ceras epicuticulares deverá influenciar marcadamente o transporte de iões nesta região da cutícula e, nos estudos de avaliação da permeância a iões sódio das membranas reconstituídas com diferentes composições de ceras, isso deveria ter sido notado. Parece, pois, que esta é mais uma evidência de que a reconstituição da camada de ceras epicuticulares nas membranas modelo não foi alcançada com o processo de reconstituição testado. Mesmo tendo detectado a presença de ceras na face externa das membranas reconstituídas, é possível que a distribuição de ceras não tenha sido uniforme. A verificar-se, isso contrariaria a noção de que a distribuição de ceras na cutícula ocorre por difusão uniforme das ceras através da matriz cuticular.

Não é necessário esforço para interpretar, com o modelo de cutícula proposto, a influência de factores como a temperatura e agentes químicos plastificadores nas propriedades de transporte da cutícula vegetal relativamente a compostos orgânicos e água, ou da humidade relativa ou utilização de surfactantes para o transporte de electrólitos e também de água (Capítulo 1). A estrutura da cutícula proposta apresenta domínios de ceras cuja fluidez e percolação será influenciada pela temperatura ou agentes químicos plastificadores de ceras. Por sua vez, o transporte nos domínios polares hidrofílicos da matriz cuticular será influenciado pela humidade relativa à qual se sujeita a cutícula e pelo uso de surfactantes, tal como observado nos trabalhos de Schönherr (2000, 2001, 2002), relativos ao transporte de electrólitos, ou de Schreiber *et al.*, (2001), relativamente ao transporte de água.

## Perspectivas de Investigação Futura

Este ponto poderia iniciar-se exactamente do mesmo modo que as conclusões gerais: muito há a investigar relativamente às propriedades de barreira da cutícula vegetal. Restringindo o assunto às implicações imediatas dos resultados obtidos, seria importante continuar a investigação de alguns aspectos, todos eles relacionados com a consequência do polimorfismo das ceras cuticulares para a barreira cuticular.

O primeiro prende-se com a possibilidade de o nosso modelo de cutícula não reproduzir as características da barreira difusional desempenhada pelas ceras epicuticulares. Nesse ponto, seria necessário comparar o método de reconstituição do conteúdo de ceras nas membranas modelo utilizado neste trabalho com outros métodos alternativos, nomeadamente um que permitisse o reforço da concentração de ceras na superfície externa da membrana, à semelhança do que acontece na cutícula, sem que fosse necessário promover a difusão das ceras aplicadas através da matriz cuticular. Só o facto de se forçar a percolação uniforme de uma solução de ceras pela matriz, como efectuado no processo utilizado, pode acarretar consequências para a estrutura da matriz cuticular que podem não ser compatíveis com a manutenção das suas funções normais. Não se pode ignorar, também, que não se conhece o modo como as plantas fazem a distribuição de ceras pela cutícula e as evidências de que a distribuição é uniforme podem ser somente consequência da segregação de ceras em aglomerados de reduzidas dimensões.

Com a conclusão de que as ceras cuticulares constituem uma barreira à difusão, principalmente por desempenharem um papel de factor de tortuosidade na membrana, não se exclui a sua importância para as características apolares da mesma. Considerando o modelo apresentado na Figura 1, a difusão de alguns tipos de permeantes através da matriz cuticular acarretará elevados custos energéticos, nomeadamente no caso dos que não possuem características electrolíticas ou dimensões moleculares que lhes permitam transpor esta barreira por difusão. Estes serão mais facilmente transportados por difusão no meio hidrofóbico constituído pelas ceras cuticulares não cristalinas. Neste ponto, é necessário testar o modelo de cutícula agora proposto relativamente a permeantes orgânicos de elevado volume molar. Só deste modo se poderia avaliar quais as consequências do polimorfismo das ceras cuticulares para o transporte deste tipo de permeantes. Compostos a testar seriam, por exemplo, os já utilizados em estudos anteriores de mobilidade de permeantes orgânicos por Baur *et al.* (1999a) ou por Buchholz *et al.* (1998). À semelhança, também, do que foi realizado

por Schönherr *et al.* (2001), seria interessante determinar o efeito da temperatura e de compostos que fluidizam as ceras na permeância de cutículas naturais e de cutículas modelo a este tipo de compostos. Esse seria um bom indicador do sucesso ou insucesso da reconstituição da barreira cerosa nas cutículas modelo, permitindo também comparar a prestação de várias composições de ceras nelas incluídas.

É necessário, também, avaliar o desempenho das membranas modelo relativamente ao transporte do permeante com maior impacto fisiológico nas plantas, a água. Para o efeito, seria fácil conceber um ensaio de medições de fluxo de água através da cutícula natural e das cutículas modelo, em função da composição em ceras da membrana e em função de factores como a temperatura ou humidade relativa, distinguindo também o efeito de compostos que plastificam a barreira cerosa do de compostos surfactantes, por exemplo.

Além do mais, seria interessante, ainda, substituir a matriz cuticular natural por uma matriz polimérica de composição mais definida e controlável. Neste sentido, seria possível testar polímeros de natureza apolar, como polietileno, com características de membrana de dissolução, ou polimetacrilato, com características de membrana porosa (Figura 2.3, Capítulo 1). Deste modo, seria separado o carácter polar e apolar na matriz polimérica, avaliando-se da sua importância para o mecanismo de transporte de uma diversidade de permeantes. Em qualquer um dos polímeros base, seria também testada a influência da inclusão de ceras sintéticas, numa diversidade de composições que fornecesse informação quanto às características básicas necessárias para reunir na cutícula vegetal todas as suas propriedades de barreira difusional.

Finalmente, chamando a atenção para o tanto que há a investigar sobre este tema, acresce-se que a cutícula vegetal é, de facto, além de complexa, uma excelente barreira à difusão, pelo que os estudos de permeabilidade cuticular são acrescidos de uma dificuldade adicional relacionada com a duração necessária para qualquer ensaio experimental com esta membrana. Neste contexto, não se dirá que a complexidade do objecto de estudo seja o limite, mas sim o tempo, para atingir o objectivo da completa compreensão desta fascinante estrutura natural.



# Anexo A

## Mobilidade Electroforética de Alguns Iões

### A.1 Tabela de Mobilidade Electroforética e Raio Iónico Hidrodinâmico

Na Tabela A.1 apresenta-se a mobilidade electroforética dos catiões e aniões estudados como permeantes das membranas cuticulares, em água, a 25 °C, bem como o respectivo raio iónico hidrodinâmico calculado a partir da mobilidade electroforética.

**Tabela A.1.** Mobilidade electroforética,  $u$ , e raio hidrodinâmico,  $r_{hid}$  para alguns iões.

Ião	$u^a$ ( $\times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ )	$r_{hid}^b$ ( $\times 10^{-10} \text{ m}$ )
H <sup>+</sup>	36,23	0,23
Li <sup>+</sup>	4,01	2,12
Na <sup>+</sup>	5,19	1,64
K <sup>+</sup>	7,62	1,11
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	7,63	1,11
F <sup>-</sup>	5,70	1,49
Cl <sup>-</sup>	7,91	1,07
Br <sup>-</sup>	8,09	1,05

<sup>a</sup>Valores de mobilidade electroforética em água, a 25 °C, obtidos de Atkins (2000); <sup>b</sup>Valores calculados a partir da mobilidade electroforética recorrendo à equação  $u = z e / 6 \pi \eta r_{hid}$ , onde  $u$  é a mobilidade do ião,  $z$ , a sua valência,  $e$ , a sua carga ( $1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$ ),  $\eta$ , a viscosidade da água a 25 °C ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e  $r_{hid}$ , o raio iónico hidrodinâmico.



# Anexo B

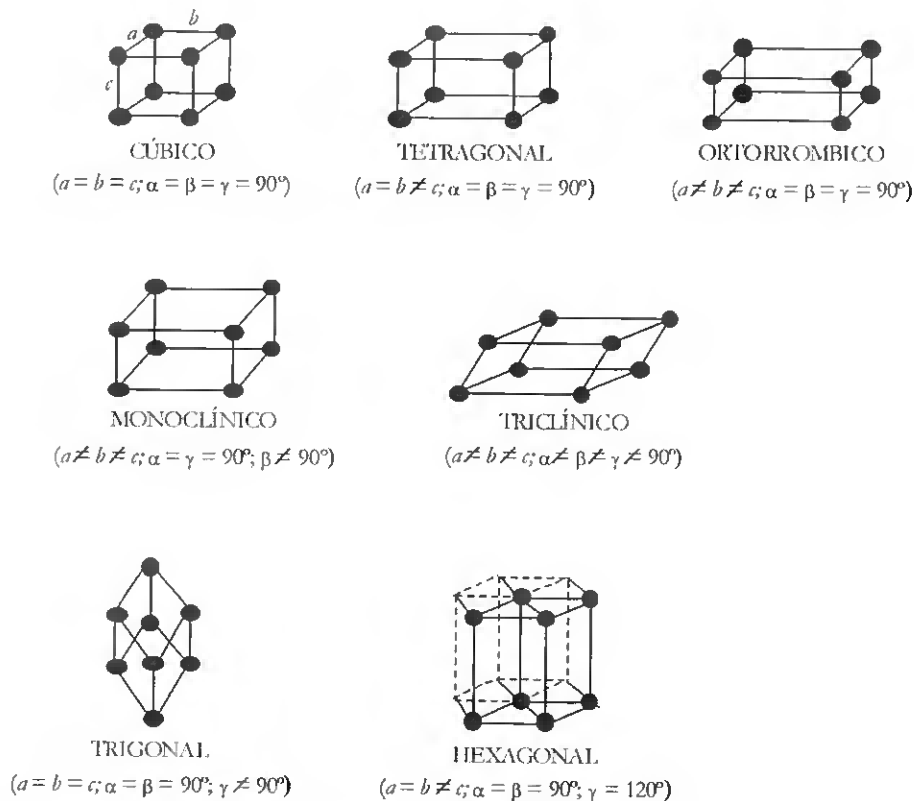
## Polimorfismo e Metaestabilidade

Muitos compostos podem apresentar mais do que um tipo de organização cristalina no seu estado sólido, sendo este fenômeno conhecido por polimorfismo. Consideram-se polimorfos, duas fases sólidas distintas em organização estrutural que estejam em equilíbrio com o mesmo estado líquido ou gasoso (Dunitz, 1991). Os diferentes sólidos, ou polimorfos, resultam de diferentes rearranjos espaciais do mesmo conformero molecular ou são originados pela cristalização de conformeros diferentes, dependendo das condições em que ocorre a cristalização.

A distribuição ordenada dos elementos de um cristal faz-se de forma a que se atinja um mínimo de energia potencial. Cada polimorfo possui a sua organização cristalina e é caracterizado por um mínimo de energia potencial distinto. No entanto, a diferença de energia potencial entre os vários polimorfos é geralmente pequena. Em consequência das características da sua organização cristalina, os polimorfos diferem entre si no que diz respeito a propriedades mecânicas, termodinâmicas e espectroscópicas, sendo o polimorfo mais estável o que possui menor energia livre de Gibbs. Este é também o que possui menor pressão de vapor e menor solubilidade em qualquer solvente (Grant, 1999).

A organização espacial dos elementos que formam um cristal pode ser descrita representando os elementos como pontos num espaço tridimensional, unidos por eixos, constituindo a rede cristalina. Esta é descrita pela translação infinita de uma unidade estrutural cuja forma geométrica dá o nome às diferentes classes de empacotamento cristalino. A célula cristalina unitária é caracterizada pelos eixos  $a$ ,  $b$  e  $c$ , definidos por três das arestas do paralelepípedo com a mesma origem, e pelos ângulos,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  por eles estabelecidos. Como ilustração de algumas classes de empacotamento cristalino, encontram-se esquematizadas, na Figura B.1, as células unitárias de algumas classes de redes cristalinas, acompanhadas de algumas das características que as permitem distinguir (Brittain e Byrn, 1999).

Em determinadas condições de pressão e temperatura, só um dos polimorfos é estável. No entanto, a transformação de uma determinada fase instável numa outra mais estável pode decorrer ao longo de um período de tempo suficientemente longo, de modo que esta aparente ser estável. Neste caso, a fase instável é por vezes denominada de metaestável (Grant, 1999).



**Figura B.1.** Célula unitária de algumas classes de empacotamento cristalino, indicando-se a relação entre os eixos  $a$ ,  $b$  e  $c$  e os ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que as distinguem (adaptada de Brittain e Byrn, 1999).

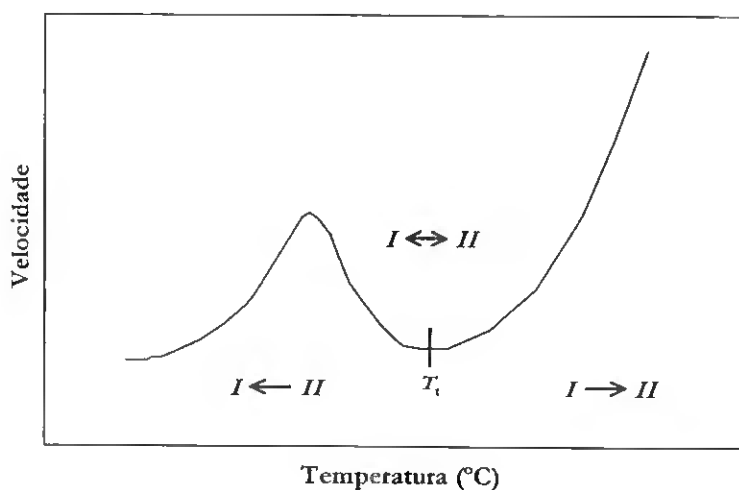
A transição entre dois polimorfos pode ser classificada como enantiotrópica ou como monotrópica (Threlfall, 1995; Grant, 1999). Classifica-se como enantiotrópica uma transição entre dois sólidos que são estáveis em gamas de temperatura diferentes. Neste caso, a temperatura de transição entre os dois estados sólidos, dada pela temperatura em que a energia livre de Gibbs dos dois sólidos é igual, localiza-se a uma temperatura inferior à do ponto de fusão. Numa transição monotrópica, embora teoricamente exista uma temperatura para a qual a energia livre de Gibbs dos dois sólidos se iguale, esta localiza-se acima da temperatura de fusão e é, por isso, inatingível. Neste caso, um dos sólidos é sempre mais estável do que o outro para qualquer temperatura inferior à do ponto de fusão.

Na cristalização de um sistema enantiotrópico, é vulgar a ocorrência de sobre-arrefecimento do sólido que é mais estável a temperaturas elevadas, formando-se uma fase metaestável a baixas temperaturas. Também é possível observar a formação de fases metaestáveis a baixas temperaturas nos sistemas monotrópicos. Este fenómeno está relacionado com a cinética de formação da fase mais estável durante o arrefecimento de sistemas onde se verifica polimorfismo do estado sólido e é explicado termodinamicamente numa regra enunciada por Ostwald (Grant, 1999), observando que em processos de transformação de estado, não é o estado de menor energia livre (mais estável) que se forma mas sim o estado com uma energia livre mais próxima da energia livre do estado de origem.

A cristalização envolve várias etapas que são determinantes na cinética do processo (Grant, 1999). Num primeiro passo, é necessário que se reúnam condições para a formação de núcleos de fase cristalina, isto é, nucleação do cristal. O processo de nucleação consiste na formação de agregados ou núcleos cristalinos de dimensão reduzida, em condições de supersaturação da fase de origem. Estes núcleos cristalinos aumentam de tamanho à medida que mais moléculas passam à fase cristalina e se associam aos núcleos já formados. O processo de nucleação de um cristal é governado essencialmente por dois termos que relacionam a variação de energia livre e o aumento do núcleo cristalino, os quais são algebricamente opostos. Por um lado, o aumento do volume da fase cristalina resulta numa diminuição da energia livre, favorecendo a agregação de moléculas no estado cristalino; por outro, as interações de superfície entre o núcleo cristalino em crescimento e a fase supersaturada resultam num aumento de energia livre do sistema e favorecem a dissolução dos agregados moleculares. Para determinada dimensão de agregado, atinge-se uma relação entre área de superfície e volume do agregado que é correspondente a um máximo de energia livre do processo de nucleação, o qual determina o raio crítico do agregado nuclear e a energia de activação de formação do cristal. Os núcleos cristalinos com raio inferior ao raio crítico tendem a dissolver-se, enquanto que os que possuem um raio superior tendem a aumentar de tamanho e levam à formação do estado sólido macroscópico.

Em sistemas polimórficos, o estado cristalino que primeiro se forma é aquele a que corresponde uma menor energia livre de activação para a formação de núcleos de dimensão crítica. Em consequência do mecanismo de nucleação, o tipo de cristal que se forma e a sua estabilidade é bastante dependente do solvente e de factores como estado de supersaturação, temperatura ou existência de impurezas.

A velocidade de formação de um polimorfo pode ser bastante lenta se este for derivado de outra fase sólida. Neste caso, o mecanismo de transformação de um polimorfo noutra mais estável deve envolver várias etapas, incluindo a desestabilização e quebra de interacções intermoleculares no polimorfo menos estável, seguida da formação de novas interacções intermoleculares características do novo polimorfo que se forma. Em sistemas onde se observa polimorfismo enantiotrópico, a velocidade de conversão entre polimorfos é mínima à temperatura de transição,  $T_t$  (Figura B.2).



**Figura B.2.** Variação da velocidade em função da temperatura para uma típica transição entre o polimorfo estável a baixas temperaturas (*I*) e o polimorfo estável a temperaturas mais elevadas (*II*) num sistema enantiotrópico, com uma temperatura de transição  $T_t$  (adaptada de Grant, 1999).

A temperaturas superiores a  $T_t$ , a transformação do polimorfo estável a temperaturas mais baixas (*I*) no polimorfo que é mais estável próximo do ponto de fusão (*II*) aumenta com a temperatura. Por outro lado, para temperaturas inferiores a  $T_t$ , a velocidade de transformação entre polimorfos aumenta à medida que a temperatura decresce relativamente a  $T_t$  até que se atinge uma temperatura óptima para o processo para a qual a velocidade de conversão é máxima. Abaixo dessa temperatura óptima, a velocidade de transformação decresce à medida que a temperatura diminui, como em qualquer reacção química. A temperaturas suficientemente baixas, a velocidade da transição pode ser bastante reduzida, o que explica a possibilidade de observação de um dos polimorfos como um sólido metaestável (Grant, 1999).

# Referências Bibliográficas

- Alvin, K. L. e Boulter, M. C. 1974.** A controlled method of comparative study for Taxodiaceous leaf cuticles. *Bot. J. Linn. Soc.* **69**: 277-286.
- Anton, L. H., Ewers, F. W., Hammerschmidt, R. e Klomparens, K. L. 1994.** Mechanisms of deposition of epicuticular wax in leaves of broccoli, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. *New Phytol.* **126**: 505-510.
- Atkins, P. W. 2000.** *Physical Chemistry*, 6ª Edição. Oxford University Press, Oxford.
- Baker, E. A. 1982.** Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: *The plant cuticle* (D. F. Cutler, K. L. Alvin, C. E. Price, eds). Academic Press, Londres, pp. 139-166.
- Baker, E. A., Bukovac, M. J. e Hunt, G. M. 1982.** Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: *The plant cuticle* (D. F. Cutler, K. L. Alvin, C. E. Price, eds). Academic Press, Londres, pp. 33-44.
- Barnes, J. D. e Cardoso-Vilhena, J. 1996.** Interactions between electromagnetic radiation and the plant cuticle. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 157-174.
- Barrie, J. A. 1968.** Water in polymers. In: *Diffusion in polymers* (J. Crank, G. S. Park, eds). Academic Press, Londres, pp. 259-313.
- Basson, I. e Reynhardt, E. C. 1988.** An Investigation on the structures and molecular dynamics of natural waxes: II. Carnauba wax. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **21**: 1429-1433.
- Bauer, H. e Schönherr, J. 1992.** Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes. *Pestic. Sci.* **35**: 1-11.
- Baur, P. 1997.** Lognormal distribution of water permeability and organic solute mobility in plant cuticles. *Plant Cell and Environ.* **20**: 167-177.
- Baur, P., Buchholz, A. e Schönherr, J. 1997a.** Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: similarity and diversity among species. *Plant Cell and Environ.* **20**: 982-994.
- Baur, P., Grayson, B. T., e Schönherr, J. 1997b.** Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. Effects of ethoxy chain lengths and size of penetrants. *Pest. Sci.* **51**: 131-152.
- Baur, P., Marzouk, H. e Schönherr, J. 1999a.** Estimation of path lengths for diffusion of organic compounds through leaf cuticles. *Plant, Cell and Environ.* **22**: 291-299.

## REFERÊNCIAS

- Baur, P., Marzouk, H., Schönherr, J e Bauer, H. 1996. Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species. *Planta* **199**: 404-412.
- Baur, P., Schönherr, J. e Grayson, B. T. 1999b. Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. 2: separation of effects on driving force and mobility and reversibility of surfactant action. *Pest. Sci.* **55**: 831-842.
- Becker, M., Kerstiens, G. e Schönherr, J. 1986. Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients. *Trees* **1**: 54-60.
- Boerio-Goates, J. e Callanan, J. E. 1992. Differential thermal methods. In: *Physical methods of chemistry* Vol. 6, 2ª Edição (B. W. Rossiter e R. C. Baetzold, eds), John Wiley and Sons, Inc., Londres, pp. 621-717.
- Bohs, L. e Olmstead, R. 1997. Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on ndhF sequences. *Syst. Bot.* **22**: 5-17.
- Brittain, H. G. e Byrn, S. R. 1999. *Structural aspects of polymorphism*. In: *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Vol. 95 (H. G. Brittain, ed.), Marcel Dekker, Inc., Nova York, pp. 73-124.
- Buchholz, A. e Schönherr, J. 2000. Thermodynamic analysis of diffusion of non-electrolytes across plant cuticles in the presence and absence of the plasticiser tributyl phosphate. *Planta* **212**: 103-111.
- Buchholz, A., Baur, P. e Schönherr, J. 1998. Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities. *Planta* **206**: 322-328.
- Cahn, R. W. 1992. Missing atoms and melting. *Nature*. **356**: 108-109.
- Casado, C. G. e Heredia, A. 1999. Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *J. Exp. Bot.* **50**: 175-182.
- Casal, H. L. e Mantsch, H. H. 1984. Polymorphic phase behavior of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **779**: 381-401.
- Casal, H. L., Cameron, D. G e Mantsch, H. H. 1983. Infrared spectra of crystalline *n*-alkanes. Changes observed during the phase I → phase II transition. *Can. J. Chem.* **61**: 1736-1742.
- Casal, H. L., Mantsch, H. H., Cameron, D. G. e Snyder, R. G. 1982. Interchain vibrational coupling in phase II (hexagonal) *n*-alkanes. *J. Chem. Phys.* **77**: 2825-2830.
- Chang, R. 1994. *Química*, 5ª Edição. Editora McGraw-Hill de Portugal, Lda., Mem Martins.
- Crank, J. e Park, G. S. 1968. Methods of measurement. In: *Diffusion in polymers* (J. Crank e G. S. Park, eds.). Academic Press, Londres, pp. 1-39.
- Domanska, U. e Gonzalez, J. A. 1997. Solid-liquid equilibria for systems containing long-chain 1-alkanols. III: Experimental data for 1-tetradecanol, 1-hexadecanol, 1-octadecanol or 1-icosanol + 1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol or 1-decanol mixtures. Characterization in terms of DISQUAC. *Fluid Phase Equilibria* **129**: 139-163.
- Dunitz, J. D. 1991. Phase transitions in molecular crystals from a chemical viewpoint. *Pure and Appl. Chem.* **63**: 177-185.
- Eckl, K. e Gruler, H. 1980. Phase transitions in plant cuticles. *Planta* **150**: 102-113.

- Edward, J. T. 1970. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *J. Chem. Edu.* **47**: 261-270.
- Edwards, D., Abbott, G. D. e Raven, J. A. 1996. Cuticles of early land plants: a paleoecophysiological evaluation. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 1-31.
- Eigenbrode, S. D. 1996. Plant surface waxes and insect behavior. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 201-221.
- Federle, W., Maschwitz, U., Fiala, B., Riederer, M. e Hölldobler, B. 1997. Slippery ant-plants and skilful climbers: selection and protection of specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga*. *Oecologia* **112**: 217-224.
- Fritz, F. 1937. Untersuchungen über die kutinisierung der zellmembranen und denrhythmischen verlauf dieses vorganges. *Planta* **26**: 693-704.
- Geyer, L. e Schönherr, J. 1990. The effect of the environment on the permeability and composition of *citrus* leaf cuticles, I: Water permeability of isolated cuticular membranes. *Planta* **180**: 147-153.
- Gillaspy, G. Ben-David, H. e Gruissem, W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451.
- Giron, D. 1990. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. *Acta Pharm. Jugosl.* **40**: 95-157.
- Grant, D. J. W. 1999. Theory and origin of polymorphism. In: *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Vol. 95 (H. G. Brittain, ed.), Marcel Dekker, Inc., Nova York, pp. 1-33.
- Gregor, H. P., Hamilton, M. J., Osa, R. J. e Bernstein, F. 1956. Studies on ion exchange resins. XV. Selectivity coefficients of methacrylic acid resins toward alkali metal cations. *J. Phys. Chem.* **60**: 263-267.
- Haas, K. e Schönherr, J. 1979. Composition of soluble cuticular lipids and water permeability of cuticular membranes from *Citrus* leaves. *Planta* **146**: 399-403.
- Hall, D. M. 1962. Secretion from pores of surface wax on plant leaves. *Nature* **194**: 1196.
- Hall, D. M. e Donaldson L. A. 1967. Wax microchannels in the epidermis of white clover. *Science* **158**: 505-506.
- Hammami, A. e Mehrotra, A. K. 1995. Liquid-solid-solid thermal behavior of  $n\text{-C}_{44}\text{H}_{90}$  +  $n\text{-C}_{50}\text{H}_{102}$  and  $n\text{-C}_{25}\text{H}_{52}$  +  $n\text{-C}_{28}\text{H}_{58}$  paraffinic binary mixtures. *Fluid Phase Equilibria* **111**: 253-272.
- Hauke, V. e Schreiber, L. 1998. Ontogenic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* **207**: 67-75.
- Hauser, H. D., Walters, K. D. e Berg, V. S. 1993. Patterns of effective permeability of leaf cuticles to acids. *Plant Physiol.* **101**: 251-257.
- Hoad, S. P., Grace, J. e Jeffree, C. E. 1997. Humidity response of cuticular conductance of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaf discs maintained at high relative water content. *J. Exp. Bot.* **316**: 1969-1975.
- Holloway, P. J. 1982. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: *The plant cuticle* (D. F. Cutler, K. L. Alvin, C. E. Price, eds). Academic Press, Londres, pp. 1-32.
- Holloway, P. J. 1994. Plant cuticles: Physicochemical characteristics and biosynthesis. In: *Air Pollutants and the Leaf Cuticle* (K. E. Percy, J. N. Cape, R. Jagels, C. J. Simpson, eds). NATO ASI Series. Springer-Verlag, Londres, pp 1-14.

## REFERÊNCIAS

- Honig, B. H., Hubbell, W. L. e Flewelling, R. F. 1986. Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**: 163-193.
- Jeffree, C. E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 33-82.
- Jetter, R. e Riederer, M. 1995. *In vitro* reconstitution of epicuticular wax crystals: formation of tubular aggregates by long-chain secondary alkanediols. *Bot. Acta* **108**: 111-120.
- Jetter, R., Schäffer, S. e Riederer, M. 2000. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environ.* **23**: 619-628.
- Juniper, B. E. 1995. Waxes on plant surfaces and their interactions with insects In: *Waxes: chemistry, molecular biology and functions* (R. J. Hamilton, ed.). The Oily Press, Dundee, pp. 157-174.
- Kellner, R., Mermet, J.-M., Otto, M. e Widmer, H. M. 1998. *Analytical chemistry* (eds). Wiley-VCH, Nova York.
- Kerler, F. e Schönherr, J. 1988. Accumulation of lipophilic chemicals in plant cuticles: Prediction from octanol/water partition coefficients. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**: 1-6.
- Kerstiens G 1996a. Diffusion of water vapour and gases across cuticles and through stomatal pores presumed closed. In: *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 121-134
- Kerstiens, G. 1996b. Cuticular water permeability and its physiological significance. *J. Exp. Bot.* **47**: 1813-1832.
- Kirkwood, R. C. 1999. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pestic. Sci.* **55**: 69-77.
- Kirsch, T., Kaffarnik, F., Riederer, M. e Schreiber, L. 1997. Cuticular permeability of the three tree species *Prunus laurocerasus* L., *Ginkgo biloba* L. and *Juglans regia* L.: comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *J. Exp. Bot.* **48**: 1035-1045.
- Klute, C. H. 1959. Diffusion of small molecules in semicrystalline polymers: water in polyethylene. *J. Appl. Polymer Sci.* **3**: 340-350.
- Knoche, M. e Bukovac, M. J. 2001. Finite dose diffusion studies: III. Effects of temperature, humidity and deposit manipulation on NAA penetration through isolated tomato fruit cuticles. *Pest Manag. Sci.* **57**: 737-742.
- Kolattukudy P. E. 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 83-108.
- Kolattukudy, P. E. 2001. Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 1-49.
- Kolosova, N., Sherman, D., Karlson, D. e Dudareva, N. 2001. Cellular and subcellular localization of S-adenosyl-L-methionine: Benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers. *Plant Physiol.* **126**: 956-964.
- Kuchhal, Y. K., Shukla, R. N. e Biswas, A. B. 1979. Differential thermal analysis of *n*-long chain alcohols and corresponding alkoxy ethanols. *Thermochim. Acta* **31**: 61-70.

- Kuraishi, S. e Nito, N. 1980. The maximum leaf surface temperatures of the higher plants observed in the Inland Sea area. *Botanical Magazine Tokyo* **93**: 209-220.
- Lee, A.G. 1977. Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **472**: 285-344.
- Lunden, B. M., Lofgren, H. e Pascher, I. 1977. *In vitro* reconstitution of epicuticular wax crystals: formation of tubular aggregates by long-chain secondary alkanediols. *Bot. Acta* **108**: 111-120.
- Luque, P. e Heredia, A. 1997. The glassy state in isolated cuticles: differential scanning calorimetry of tomato fruit cuticular membranes. *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 251-256.
- Luque, P., Bruque, S e Heredia, A. 1995. Water permeability of isolated cuticular membranes: A structural analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**: 417-422.
- Marcus, Y. 1991. Thermodynamics of solvation of ions. Part 5—Gibbs' Free Energy of hydration at 298.15 K. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **87**: 2995-2999.
- Maréchal, Y. e Chamel, A. 1996. Water in a biomembrane by infrared spectrometry. *J. Phys. Chem.* **100**: 8551-8555.
- Maroncelli, M, Strauss, H.L. e Snyder, R.G. 1985. On the CD<sub>2</sub> probe infrared method for determining polymethylene chain conformation. *J. Phys. Chem.* **89**: 4390-4395.
- Martins, C.M.C., Mesquita, S.M.M. e Vaz, W.L.C. 1999. Cuticular waxes of the Holm (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (desf.) samp.) and Cork (*Q. suber* L.) oaks. *Phytochem. Anal.* **10**: 1-5.
- McClure, D.W. 1968. Nature of the rotational phase transition in paraffin crystals. *J. Chem. Phys.* **49**: 1830-1839.
- McFarlane, J. C. e Berry, W. L. 1974. Cation penetration through isolated leaf cuticles. *Plant Physiol.* **53**: 723-727.
- Meares, P. 1968. Transport in ion-exchange polymers. In: *Diffusion in polymers* (J. Crank, G. S. Park, eds). Academic Press, Londres, pp. 259-313.
- Mendgen, K. 1996. Fungal attachment and penetration. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 175-188.
- Merk, S. e Riederer, M. 1997. Sorption of volatile C1 to C6 alkanols in plant cuticles. *J. Exp. Bot.* **48**: 1095-1104.
- Merk, S., Blume, A. e Riederer, M. 1998. Phase behavior and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* **204**: 44-53.
- Miller, R. H. 1982. Apple fruit and the occurrence of pores and transcuticular canals. *Ann. Bot.* **50**: 355-371.
- Miller, R. H. 1985. The prevalence of pores and canals in leaf cuticular membranes. *Ann. Bot.* **55**: 459-471.
- Mosselman, C., Mourik, J. e Dekker, H. 1974. Enthalpies of phase change and heat capacities of some long-chain alcohols: Adiabatic semi-microcalorimeter for studies of polymorphism. *J. Chem. Thermodynamics* **6**: 477-487.
- Neinhuis, C., Koch, K. e Barthlott, W. 2001. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* **213**: 427-434.

## REFERÊNCIAS

- Niederl, S., Kirsch, T., Riederer, M. e Schreiber, L. 1998. Co-permeability of  $^3\text{H}$ -labeled water and  $^{14}\text{C}$ -labeled organic acids across isolated plant cuticles. *Plant Physiol.* **116**: 117-123.
- Nito, N., Kuraishi, S., e Sumino, T. 1979. Daily changes in the highest leaf surface temperature of plants growing at Heiwa Avenue, Hiroshima. *Environ. Control Biol.* **17**: 59-66.
- Olmstead, R. e Palmer, J. 1997. Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Syst. Bot.* **22**: 19-29.
- Oonk, H. A. J., Mondieig, D., Haget, Y., e Cuevas-Diarte, M. A. 1998. Perfect families of mixed crystals: The rotator I *n*-alkane case. *J. Chem. Phys.* **108**: 715-722.
- Ott, W. R. 1995. Lognormal processes. In: *Environmental statistics and data analysis* (W. R. Ott, ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 251-296.
- Petracek, P. D. e Bukovac, M. J. 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiol.* **109**: 675-679.
- Plesnar, Z. e Bylicki, A. 1993. (Solid + liquid) equilibria in (hexadecan-1-ol + hexadecane). *J. Chem. Thermodynamics* **25**: 1301-1309.
- Plesnar, Z., Gierycz, P. e Bylicki, A. 1990. (Solid + liquid) equilibria in (*n*-octan-1-ol + *n*-hexadecane or *n*-dodecane or *n*-undecane). *J. Chem. Thermodynamics* **22**: 393-398.
- Potts, R. O. e Francoeur, M. L. 1990. Lipid biophysics of water loss through the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3871-3873.
- Pradhan, S. D., Katti, S. S. e Kulkarni, B. 1970. Dielectric properties of *n*-long chain alcohols, alkoxyethanols and alkoxypropanols. *Indian J. Chem.* **8**: 632-637.
- Reynhardt, E. C. 1997. The role of hydrogen bonding in the cuticular wax of *Hordeum vulgare* L. *Eur. Biophys. J.* **26**: 195-201.
- Reynhardt, E. C. e Riederer, M. 1991. Structure and molecular dynamics of the cuticular wax from the leaves of *Citrus aurantium* L. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **24**: 478-486.
- Reynhardt, E. C. e Riederer, M. 1994. Structures and molecular dynamics of plant waxes: II. Cuticular waxes from the leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. *Eur. Biophys. J.* **23**: 59-70.
- Riederer, M. e Schneider, G. 1990. The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles, II: Composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport properties. *Planta* **180**: 154-165.
- Riederer, M. e Markstädter, C. 1996. Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. In: *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 83-108.
- Riederer, M. e Schneider, G. 1990. The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta* **180**: 154-165.
- Riederer, M. e Schreiber, L. 1995. Waxes – the transport barriers of plant cuticles. In: *Waxes: chemistry, molecular biology and functions* (R. J. Hamilton, ed.). The Oily Press, Dundee, pp. 131-156.
- Riederer, M. e Schreiber, L. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* **52**: 2023-2032.

- Round, A. N., Yan, B., Dang, S., Estephan, R., Stark, R. E. e Batteas, J. D. 2000. The influence of water on the nanomechanical behavior of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR. *Biophys. J.* **79**: 2761-2767.
- Rourke, B. C. e Gibbs, A. G. 1999. Effects of lipid phase transitions on cuticular permeability: model membrane and *in situ* studies. *J. Exp. Biol.* **202**: 3255-3262.
- Schiestle, F. P., Ayasse, M., Paulus, H. F., Löfstedt, C., Hansson, B. S., Ibarra, F. e Francke, W. 2000. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. A* **186**: 567-574.
- Schlotter, N. E. e Furlan, P. Y. 1992. A review of small molecule diffusion in polyolefins. *Polymers* **33**: 3323-3342.
- Schönherr, J. 1976a. Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta (Berl.)* **131**: 159-164.
- Schönherr, J. 1976b. Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. *Planta (Berl.)* **128**: 113-126.
- Schönherr, J. 1982. Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In: *Encyclopedia of plant physiology*, New Series, Vol. 12B (O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond e H. Ziegler, eds). Springer Verlag, Berlim, pp. 153-179.
- Schönherr, J. 2000. Calcium chloride ions penetrate plant cuticles via aqueous pores. *Planta* **202**: 112-118.
- Schönherr, J. 2001. Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions and adjuvants. *J. Plant Nut. Soil Sci.* **164**: 225-231.
- Schönherr, J. 2002. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. *Pest. Manag. Sci.* **58**: 343-351.
- Schönherr, J. e Baur, P. 1994. Modeling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rates of penetration. *Pestic. Sci.* **42**: 185-208.
- Schönherr, J. e Baur, P. 1996. Effects of temperature, surfactants and other adjuvants on rates of uptake of organic compounds. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 135-155.
- Schönherr, J. e Bukovac, M. J. 1973. Ion exchange properties of isolated tomato fruit cuticular membrane: exchange capacity, nature of fixed charges and cation selectivity. *Planta (Berl.)* **109**: 73-93.
- Schönherr, J. e Huber, R. 1977. Plant cuticles are polyelectrolytes with isoelectric points around three. *Plant Physiol.* **59**: 145-150.
- Schönherr, J. e Luber, M. 2001. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant Soil* **236**: 117-122.
- Schönherr, J. e Riederer, M. 1986. Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell Environ.* **9**: 459-466.
- Schönherr, J. e Riederer, M. 1988. Desorption of chemicals from plant cuticles: evidence for asymmetry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**: 13-19.

## REFERÊNCIAS

- Schönherr, J. e Schmidt, H. W. 1979. Water permeability of plant cuticles: dependence of permeability coefficients of cuticular transpiration on vapor pressure saturation deficit. *Planta* **144**: 391-400.
- Schönherr, J. e Ziegler, H. 1980. Water permeability of *Betula* periderm. *Planta* **147**: 345-354.
- Schönherr, J., Eckl, K. e Gruler, H. 1979. Water permeability of plant cuticles: the effect of temperature in the diffusion of water. *Planta* **147**: 21-26.
- Schönherr, J., Schreiber, L. e Buchholz, A. 2001. Effects of temperature and concentration of the accelerators ethoxylated alcohols, diethyl sebacate and tributyl phosphate on the mobility of [<sup>14</sup>C]2,4-dichlorophenoxy butyric acid in plant cuticles. *Pest Manag. Sci.* **57**: 17-24.
- Schreiber, L. 2001. Effect of temperature on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. *J. Exp. Bot.* **52**: 1893-1900.
- Schreiber, L. e Riederer, M. 1996a. Determination of diffusion coefficients of octadecanoic acid in isolated cuticular waxes and their relationship to cuticular water permeabilities. *Plant, Cell and Environ.* **19**: 1075-1082.
- Schreiber, L. e Riederer, M. 1996b. Ecophysiology of cuticular transpiration: comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia* **107**: 426-432.
- Schreiber, L. e Schönherr, J. 1990. Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles: the effects of temperature on structure and function. *Planta* **182**: 186-193.
- Schreiber, L. e Schönherr, J. 1992. Uptake of organic chemicals in conifer needles: surface adsorption and permeability of cuticles. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 153-159.
- Schreiber, L. e Schönherr, J. 1993. Mobilities of organic compounds in recrystallized cuticular waxes of barley leaves: determination of diffusion coefficients. *Pestic. Sci.* **38**: 353-361.
- Schreiber, L., Kirsch, T. e Riederer, M. 1996a. Diffusion through cuticles: principles and models. In: *Plant cuticles: an integrated functional approach* (G. Kerstiens, ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 109-119.
- Schreiber, L., Kirsch, T. e Riederer, M. 1996b. Transport properties of cuticular waxes of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst.: estimation of size selectivity and tortuosity from diffusion coefficients of aliphatic molecules. *Planta* **198**: 104-109.
- Schreiber, L., Riederer, M. e Schorn, K. 1996c. Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of Barley leaves: effects of monodisperse alcohol ethoxylates on diffusion of pentachlorophenol and tetracosanoic acid. *Pest. Sci.* **48**: 117-124.
- Schreiber, L., Schorn, K. e Heimburg, T. 1997. <sup>2</sup>H-NMR studies of cuticular wax isolated from *Hordeum vulgare* L. leaves: Identification of amorphous and crystalline wax phases. *Eur. Biophys. J.* **26**: 371-380.
- Schreiber, L., Skrabs, M., Hartmann, K. D., Diamantopoulos, P., Simanova, E., Santrucek, J. 2001. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf discs. *Planta* **214**: 274-282.
- Simons, W. W. 1978. The Sadtler handbook of infrared spectra. Heyden and Son, Ltd., Londres.
- Sitte, P. e Rennie, R. 1963. Untersuchungen an cuticularen Zellwandschichten. *Planta* **60**: 19-40.

- Skoog, D. A., Holler, F. J. e Nieman, T. A. 1998. *Principles of instrumental analysis*, 5ª edição. Saunders College Publishing, Londres.
- Smalley, S. J., Hauser, H. D. e Berg, V. S. 1993. Effect of cations on effective permeability of leaf cuticles to sulfuric acid. *Plant Physiol.* **103**: 251-256.
- Smalley, S. J., Hauser, H. D. e Berg, V. S. 1993. Effect of cations on effective permeability of leaf cuticles to sulfuric acid. *Plant Physiol.* **103**: 251-256.
- Solomon, A. K. 1968. Characterization of biological membranes by equivalent pores. *J. Gen. Physiol.* **51**: 335-346.
- Stark, R. E., Yan, B., Ray, A. K., Chen, Z., Fang, X. e Garbow, J. R. 2000. NMR studies of structure and dynamics in fruit cuticle polyesters. *Solid State Nuc. Mag. Res.* **16**: 37-45.
- Straughan, B. P. e Walker, S. 1976. *Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc., Nova York.
- Taiz, L. e Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*, 2ª Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
- Threlfall, T. L. 1995. Analysis of organic polymorphs: a review. *Analyst* **120**: 2435-2460.
- Ticknor, L. B. 1958. On the permeation of cellulose membranes by diffusion. *J. Phys. Chem.* **62**: 1483-1485.
- Tukey, H. B. 1970. The leaching of substances from plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**: 305-324.
- Turunen, M., Huttunen, S., Percy, K. E., McLaughlin, C. K. e Lamppu, J. 1997. Epicuticular wax of subarctic scots pine needles: response to sulphur and heavy metal deposition. *New Phytol.* **135**: 501-515.
- Tyree, M., Scherbatsky, T. D. e Tabor, C. A. 1990a. Leaf cuticles behave as asymmetric membranes. Evidence from the measurement of diffusion potentials. *Plant Physiol.* **92**: 103-109.
- Tyree, M., Tabor, C. A. e Wescott, C. R. 1990b. Movement of cations through cuticles of *Citrus aurantium* and *Acer saccharum*. *Plant Physiol.* **94**: 120-126.
- Tyree, M., Wescott, C. R. e Tabor, C. A. 1991. Diffusion and electric mobility of ions within isolated cuticles of *Citrus aurantium*. *Plant Physiol.* **97**: 273-279.
- Tyree, M., Wescott, C. R., Tabor, C. A. e Morse, A. D. 1992. Diffusion and electric mobility of KCl within isolated cuticles of *Citrus aurantium*. *Plant Physiol.* **99**: 1057- 1061.
- Walter, A. e Gutknecht, J. 1984. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *J. Membrane Biol.* **77**: 255-264.
- Watanabe, A. 1961. Synthesis and physical properties of normal higher primary alcohols. IV. Thermal and X-ray studies on the polymorphism of the alcohols of even carbon numbers from dodecanol to tetratriacontanol. *Bull. Chem. Soc. Japan* **34**: 1728-1734.
- Wilson, L. A. e Sterling, C. 1976. Studies on the cuticle of tomato fruit I. Fine structure of the cuticle. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **77**: 359-371.
- Woodward, F. I. 1998. Do plants really need stomata? *J. Exp. Bot.* **49**: 471-480.
- Wunderlich, A. P., Gaub, H., Marsch, D. e Sackmann, E. 1990. Local motion and conformational changes in the cuticle of *Clivia miniata* Reg. *Planta* **181**: 475-486.
- Yasuda, H. e Stannett, V. 1962. Permeation, solution and diffusion of water in some high polymers. *J. Polym. Sci.* **57**: 907-923.

