

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

"Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por Roldão Roosevelt Urzedo de Queiroz e Aprovado pela Comissão Julgadora".

Campinas, 6 de março de 1989

Oswaldo E. S. Godinho

Prof. Dr. Oswaldo E.S. Godinho
Orientador

INVESTIGAÇÕES ENVOLVENDO
TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA
CATALÍTICA.

Roldão Roosevelt Urzedo de Queiroz
Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo do Espírito Santo Godinho

Q32i

10458/BC

CAMPINAS - 1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha esposa, Maria Elena, pelo carinho
e dedicação, e aos meus filhos, Stephanie
Luccilla e Stewerson Nicolay, por existirem.

AGRADECIMENTOS

-Ao Prof. Dr. Oswaldo do Espirito Santo Godinho, pela sugestão do tema, dedicada orientação, e amizade.

-Ao Prof. Dr. Antônio Fortes, pelo incentivo.

-À Universidade Federal de Ouro Preto, pela oportunidade.

-À CAPES/PICD, pela bolsa oferecida.

-Aos companheiros do Instituto de Química, pela amizade.

-A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Título: Investigações envolvendo titulação termométrica catalítica

Autor: Roldão Roosevelt Urzedo de Queiroz

Orientador: Prof.Dr. Oswaldo E.S. Godinho

Estudou-se a influência da composição do titulante, do titulado sobre a forma da curva de titulação, na titulação alcalimétrica em meio água-dimetilsulfóxido-acrilonitrila, por meio da titulação termométrica catalítica. Com isto, foi possível sugerir quais as reações responsáveis pela determinação do ponto final da titulação e a melhor composição do titulante e do titulado para a titulação de ácidos por esta técnica. A seguir, a mesma técnica foi aplicada na determinação de grupos ácidos dos aminoácidos histidina e arginina e das proteínas tripsina e mioglobina. Verificou-se, utilizando os cloridratos de histidina e arginina, que grupos amino, imidazol e guanidino são titulados neste meio. Isto diferencia estas titulações das de em meio aquoso, onde os grupos guanidino não são tituláveis. Nas titulações das proteínas, estudou-se a influência do sistema solvente na solubilidade e na forma da curva de titulação. Finalmente investigou-se a possibilidade de se utilizar substâncias termocrômicas inorgânicas e orgânicas como indicadoras do ponto final da titulação termométrica catalítica em substituição a aparelhagem convencional. Utilizou-se a solução sólida de $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$ e $\text{Ag}_2[\text{HgI}_4]$ e o termômetro de cristal líquido para este fim. O primeiro foi utilizado como indicador de ponto final da titulação alcalimétrica de ácido benzóico e ácido acetil salicílico puro e em preparados farmacêuticos. O segundo foi utilizado para determinação de ácido acetil salicílico e cafeína pura em preparados farmacêuticos e em refrigerantes.

ABSTRACT

Title: Investigação envolvendo titulação termométrica catalítica

Author: Roldão Roosevelt Urzedo de Queiroz

Supervisor: Prof.Dr. Oswaldo E.S. Godinho

The influence of the composition of titrand and titrant on the shape of titration graph involved in the alkalimetric titration of acids in water-dimethylsulfoxide-acrylonitrile medium by catalytic thermometric titrimetry has been investigated. In this study it was possible to suggest the reaction responsible for the rise in temperature for different compositions of titrant and titrand and to make the choice of the more suitable combination of titrand and titrant for these titrations. Next, this technique was employed for the determination of acidic groups of the amino acids histidine and arginine and of the proteins trypsin and myoglobin. It was observed that besides amino groups the groups imidazol and guanidine are titrated in the amino acids histidine and arginine, respectively. In the case of proteins the influence of solvent system on the solubility and on the shape of titration graph was investigated. Finally the use of thermochromic substances, such as solid solution of $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$ and $\text{Ag}_2[\text{HgI}_4]$ and cholesteric liquid crystals, as end point indicator in catalytic thermometric titrimetry was studied. Solid solution of $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$ and $\text{Ag}_2[\text{HgI}_4]$ was employed as visual end point indicator in the alkalimetric titration of benzoic acid and acetylsalicylic acid both pure and in pharmaceutical preparations. Cholesteric liquids crystals were used as end point indicator in the alkalimetric titration of acetylsalicylic acid, both pure and in pharmaceutical preparations, and acidimetric titration of caffeine in pharmaceutical preparations and in soft drinks.

	pag.
IV.B.3. Reagentes Utilizados	40
IV.B.4. Procedimento	43
IV.B.4.a. Escolha do Meio de Reação	
Ótimo	43
IV.B.4.b. Determinação do Volume	
Ótimo de DMSO	44
IV.B.4.c. Determinação do Volume	
Ótimo de Água	44
IV.B.4.d. Determinação do Volume	
Ótimo de Acrilonitrila	46
IV.B.4.e. Titulação Termométrica	
Catalítica	47
IV.C. Resultados e Discussões	49
IV.D. Conclusão	62
V. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA DE PROTEÍNAS E	
AMINOÁCIDOS	69
V.A. Considerações Gerais	69
V.B. Parte Experimental	77
V.B.1. Aparelhagem	77
V.B.2. Reagentes Utilizados	78
V.B.3. Procedimento	79
V.C. Resultados e Discussões	80
V.C.1. Titulação Termométrica Catalítica e	
Potenciométrica da Arginina e Histidina .	80
V.C.2. Titulação Termométrica Catalítica e	
Potenciométrica da Tripsina	84
V.C.3. Titulação Termométrica Catalítica e	
Potenciométrica da Mioglobina	94
V.D. Conclusão	100

VI. INTRODUÇÃO AO USO DE SUBSTÂNCIAS TERMOCRÔMICAS COMO INDICADOR DE PONTO FINAL DE TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS CATALÍTICAS	102
VI.A. Titulação Termométrica Catalítica Utilizando Indicador Termocrômico Inorgânico	105
VI.A.1. Considerações Gerais	105
VI.A.2. Parte Experimental	108
VI.A.2.a. Aparelhagem	108
VI.A.2.b. Reagentes Utilizados	108
VI.A.2.c. Procedimento	110
VI.A.3. Resultados e Discussões	115
VI.A.4. Conclusão	122
VI.B. Titulação Termométrica Catalítica Utilizando Indicador Termocrômico Orgânico	124
VI.B.1. Considerações Gerais	124
VI.B.2. Parte Experimental	132
VI.B.2.a. Aparelhagem	132
VI.B.2.b. Reagentes Utilizados	135
VI.B.2.c. Procedimento	138
VI.B.3. Resultados e Discussões	139
VI.B:4. Conclusão	147
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS	150
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

Um dos objetivos deste trabalho era estudar o uso da titulação termométrica catalítica na análise de grupos ácidos de materiais simples, como aminoácidos, e materiais complexos, como proteínas, em meio dimetilssulfóxido-água. Entretanto, dados preliminares mostraram que, tanto a estequiometria como a forma da curva, e portanto a exatidão da análise, dependem de fatores tais como a proporção dimetilssulfóxido-água no titulado e, mais especificamente, do álcool presente no titulante ou adicionado ao titulado.

Por esta razão, na parte inicial do trabalho, estudamos a reação responsável pela determinação do ponto final da titulação para diferentes composições de titulado e do titulante.

Na segunda parte, aplicamos o método a alguns aminoácidos e a algumas proteínas e comparamos os resultados obtidos com dados de titulação potenciométrica e com os dados da literatura.

Na terceira parte, introduzimos o uso de substâncias termocrômicas para indicar o ponto final da titulação termométrica catalítica. Estudamos o procedimento em que o titulante é adicionado a fluxo constante e aquele em que o titulante é adicionado gota à gota. A finalidade, neste último caso, foi a de verificar a possibilidade de realizarmos a titulação com uma bureta comum e sem a necessidade de aparelhagem para monitorar a variação de temperatura. Aqui preparamos e testamos o uso de substâncias termocrômicas inorgânicas e, a seguir, testamos termômetros à base de cristal líquido como indicadores do ponto final da titulação.

Estudamos, também, a influência da temperatura inicial da solução titulante e do titulado na performance do método. Finalmente, estudamos a exatidão e precisão de algumas aplicações deste indicadores para poder avaliar a sua aplicabilidade.

CAPÍTULO II

MÉTODOS VOLUMÉTRICOS

Titulação consiste em um procedimento analítico, no qual o reagente de concentração conhecida, neste caso denominado titulante, é adicionado sobre a amostra, chamada titulado, até que a reação entre esses dois componentes se complete. O ponto final da reação pode ser verificado visualmente ou instrumentalmente e a concentração da amostra é calculada a partir da quantidade de reagente consumido.

Formas de se evidenciar o ponto final:

a) Por uma alteração de uma propriedade característica da combinação titulante-titulado, quando o primeiro aparece estequiometricamente em excesso. Exemplo: alteração na condutividade elétrica (titulação condutométrica), mudança de potencial entre dois eletrodos imersos na solução do titulado (titulação potenciométrica), ou o calor absorvido ou liberado (titulação termométrica).

b) Pela resposta de um indicador adicionado ao titulado. É desejável que esta resposta, a qual constitui o resultado de uma reação entre o indicador e o titulante, seja detectada imediatamente após o término da reação determinativa.

A titulação termométrica constitui uma das técnicas que utiliza o efeito térmico que acompanha as reações químicas, com o fim de determinar a concentração das substâncias. O seu fundamento consiste em colocar em um gráfico a variação de temperatura do sistema, em função do volume de titulante adicionado durante o curso da titulação. O ponto final é dado por uma variação na inclinação do gráfico de titulação. Vários autores usaram termos di-

ferentes para designar a técnica, sendo que um número razoável usou o termo titulação termométrica. Em vista disso, Hume e Jordan⁽¹⁾, recomendaram a sua adoção. É comum utilizar também o termo titulação entalpimétrica, a qual, porém, é distinta. A titulação entalpimétrica constitui também em uma técnica analítica, desde que a sua finalidade é determinar as concentrações de substâncias. Nessa técnica, um excesso de volume da solução titulante é adicionado ao titulado e a variação de temperatura é medida. Conhecendo-se a variação de temperatura é possível calcular a concentração desconhecida, desde que se tenha em mãos uma curva de calibração ΔT versus concentração. Dessa forma, podemos dizer que a titulação entalpimétrica não constitui por certo uma titulação mas uma medida direta.

Na titulação potenciométrica medimos $[H^+]$, etc., que são variáveis de estado, propriedades do sistema em equilíbrio e que independem da sua história. Na titulação termométrica medimos um efeito térmico dependente de $q(\frac{dq}{dt})$, o qual é função de ΔH e ΔG . A grandeza observada depende então do tempo, da história recente do sistema (velocidade de adição de reagente, etc.). q não é uma variável de estado, mas uma variável de processo⁽²⁾.

II.A. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA

II.A.1. Considerações Gerais

A primeira e a mais simples forma de titulação termométrica, para fins preparativos, foi desenvolvida por Bell e Cowell⁽³⁾. Eles adicionavam o titulante descontinuamente através

de uma bureta em um frasco de "Dewar" contendo o titulando, o agitador e um termômetro de mercúrio. Após cada adição, o aumento de temperatura era medido e a alteração de temperatura por unidade de volume era graficado em função do volume total de titulante adicionado. Uma alteração de inclinação da curva servia para indicar o ponto de equivalência. Muito embora a primeira publicação referente à titulação termométrica tenha sido a de Bell e Cowell⁽³⁾ por volta de 1913, já em 1910 Howard⁽⁴⁾ havia sugerido a utilização do efeito térmico, que acompanha as reações químicas, como um método analítico, apesar dele estar referindo muito mais à calorimetria convencional do que a uma titulação.

Richmond e Merreywether⁽⁵⁾ tentaram utilizar o método de Howard, mas foram Dutoit e Grobet⁽⁶⁾, em 1922, que pela primeira vez utilizaram a titulação termométrica em vários sistemas, como nas titulações ácido-base, de precipitação e de complexação. Foram eles que introduziram a bureta refrigerada a água para controlar a temperatura do titulante, e um termômetro Beckmann para aumentar a sensibilidade. Os autores conseguiram mostrar a aplicabilidade da nova técnica, embora seu desenvolvimento seja paralelo ao desenvolvimento da tecnologia. Após esta melhoria, devida a Dutoit e Grobet, vários trabalhos se sucederam com aplicação nos mais variados sistemas.

Em 1941, Müller⁽⁷⁾, substituiu o termômetro de mercúrio por um termopar e utilizou um método termométrico diferencial. Muitas aplicações analíticas importantes de titulação termométrica datam deste período, porém, a introdução por Linde et alii⁽⁸⁾, em 1953, da técnica de adição do titulante em forma contínua, pelo uso de uma bureta de fluxo constante, bem como a utilização de um

termistor como sensor de temperatura ligado a um circuito ponte, revolucionou a técnica.

Zenchelsky⁽⁹⁾, em 1960, procedeu a uma exaustiva revisão bibliográfica sobre titulação termométrica, a partir dos trabalhos pioneiros existentes na literatura. Nesta revisão encontramos considerações sobre o desenvolvimento histórico, nomenclatura, aparelhagem utilizada e aplicações da técnica.

Outras exaustivas revisões bibliográficas foram publicadas por Harmelin⁽¹⁰⁾ em 1962, Snelders⁽¹¹⁾ em 1963, Bark⁽¹²⁾ e Jordan⁽¹³⁾ em 1963, Murphy⁽¹⁴⁾ em 1966.

Devemos levar em consideração que, apesar do grande número de revisões que apareceram nos últimos anos, as mesmas ou não são atualizadas ou apenas cobrem uma parte restrita do assunto. É conveniente citar ainda uma revisão recente devida a Carr⁽¹⁵⁾, que, apesar de seu enfoque diferente, deve ser consultada por pessoas interessadas no assunto. Esta revisão trata das expressões matemáticas relacionadas com o fundamento da titulação termométrica, efeitos térmicos estranhos, instrumentação e cálculos termodinâmicos. Entretanto, não se discute as muitas aplicações devidas à técnica. Heistand⁽¹⁶⁾ apresentou uma excelente revisão bibliográfica, em 1975, sobre a titulação termométrica e sua aplicação analítica, onde ele descreveu seu desenvolvimento, aplicações e as tendências futuras da técnica.

Apesar da titulação termométrica ser uma técnica pouco usada em relação a outras técnicas, ela é bem discutida em vários livros-texto de análise instrumental, como nos livros de Ewing⁽¹⁷⁾, de Willard, Merrit e Dean⁽¹⁸⁾, Wendlant⁽¹⁹⁾ e Robinson⁽²⁰⁾. Encontramos ainda livros tratando só desta técnica, com o título de

"Thermometric Titrimetry" escritos por Tyrrel e Beezer⁽²¹⁾ e a por Bark e Bark⁽²²⁾. No primeiro, a metade é dedicada à teoria e a instrumentação e o restante a aplicações analíticas. No segundo, encontramos capítulos pertinentes a reações ácido-base, precipitação, óxido-redução e complexação. Temos, também o livro de Vaughan⁽²³⁾ que trata de titulação termométrica e entalpimétrica, no qual temos descrição da técnica e aplicações. Convém aqui ressaltar, o livro editado por Grime⁽²⁴⁾, que trata dos desenvolvimentos mais recentes dos métodos térmicos de análise.

II.A.2. Técnica

A titulação termométrica constitui em uma técnica analítica baseada no uso de um reagente específico. O seu uso adequado e, como consequência, o registro do efeito térmico correspondente, nos conduzirá a curvas de titulações termométricas.

O termograma constitui num gráfico obtido colocando-se T em função do volume de titulante adicionado, conforme é mostrado na figura 1.

Na figura 1 vemos duas curvas de titulação termométrica, onde as reações ocorridas foram exotérmicas e endotérmicas. A parte inicial do termograma, \overline{AB} , representa a temperatura do sistema antes da adição de titulante, e é conhecida como linha base. Nesta fase as fontes de calor são: calor de agitação e transferência de calor com o meio ambiente. A segunda fase do termograma, \overline{BC} , é a que nos interessa e as fontes adicionais de calor são: calor de reação, calor de mistura e calor de diluição. Supõe-se que o titulante é

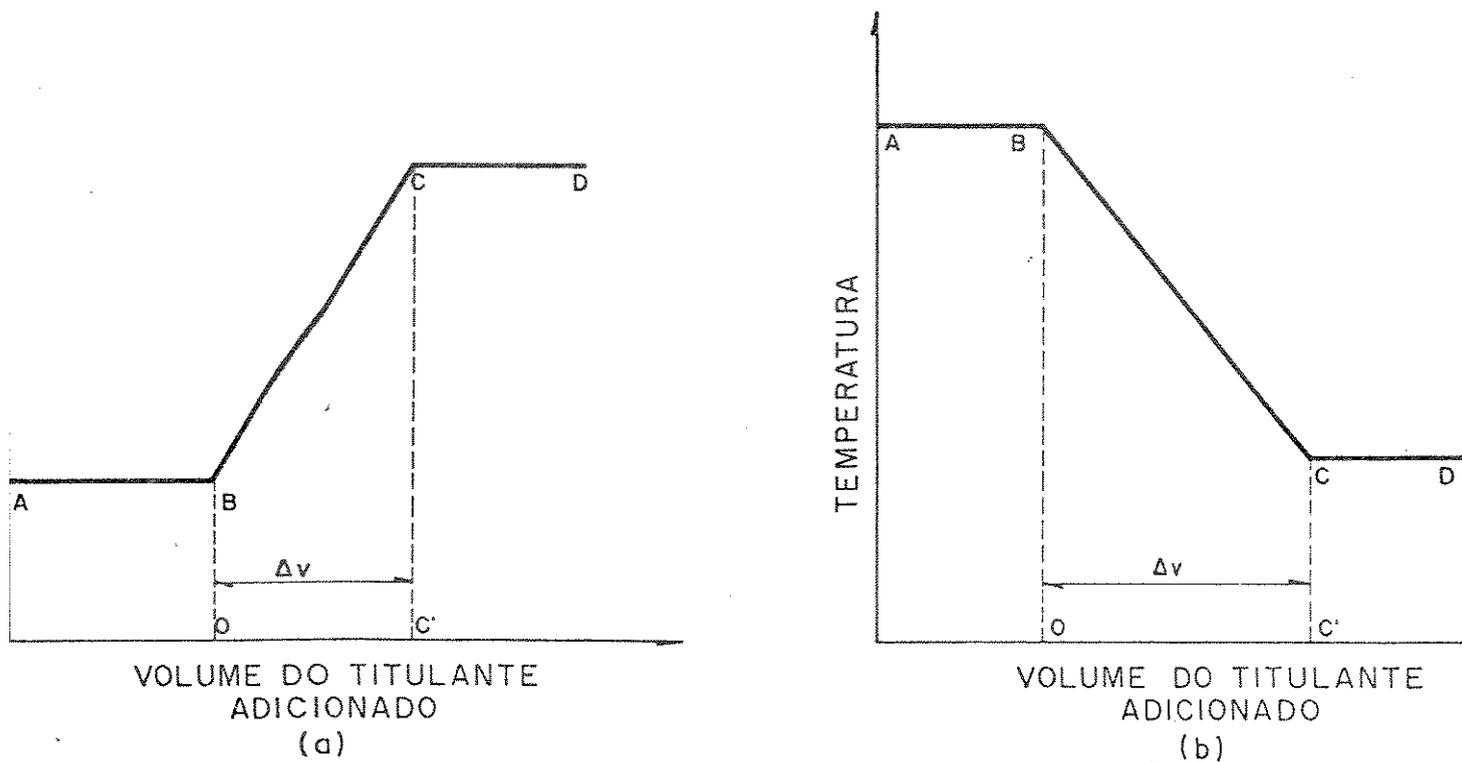


Figura 1. Termogramas ideais: a - reação exotérmica; b - reação endotérmica

adicionado a uma vazão constante e a transferência de calor entre a solução e o meio ambiente se dá de acordo com a lei de Newton, ou seja:

$$\frac{dq}{dt} = ck (T_2 - T_1) \quad (1)$$

É também necessário que a agitação seja eficiente o bastante para manter a temperatura e a concentração uniformes através da solução.

A etapa final, \overline{CD} , da curva termométrica, representa a parte final da experiência. Nesta parte a reação já foi completada,

mas o titulante continua sendo adicionado a uma vazão constante. Esta secção raramente é paralela à abcissa do gráfico, porque o efeito térmico deve-se, nesta fase, a uma série de fatores tais como: calor de diluição do titulante, o qual normalmente é adicionado em concentrações 10^1 a 10^2 vezes maiores que a concentração do titulado, o efeito Joule do termistor e do agitador, diferenças de temperatura entre o titulante e titulado e a variação na capacidade térmica do sistema.

Neste método, ou seja, na titulação termométrica, não há a necessidade de se conhecer a temperatura exata do sistema, já que o que se deseja é a variação de temperatura do sistema em função do volume de titulante adicionado.

O ponto final da reação C, é obtido pelo prolongamento das retas obtidas no termograma, durante a titulação propriamente dita e durante o período de adição do excesso de titulante. Como o propósito é quantitativo, a eficiência da técnica dependerá da precisão e exatidão da determinação do ponto final da titulação. Considerando todos os outros fatores como sendo favoráveis, a inflexão da curva (ponto C), será determinada pela magnitude da variação de entalpia da reação. Quanto maior essa variação, mais aguda será a inflexão da curva no ponto desejado. Na figura 2 vemos a obtenção do ponto final da reação em um termograma.

Os fatores que afetam a forma da curva são:

1) Variação na capacidade térmica do sistema. Esta variação é devida ao aumento do volume da solução em função da adição do titulante e constitui em fator responsável pelo desvio da linearidade observado em termogramas experimentais⁽²²⁾. Consegui-

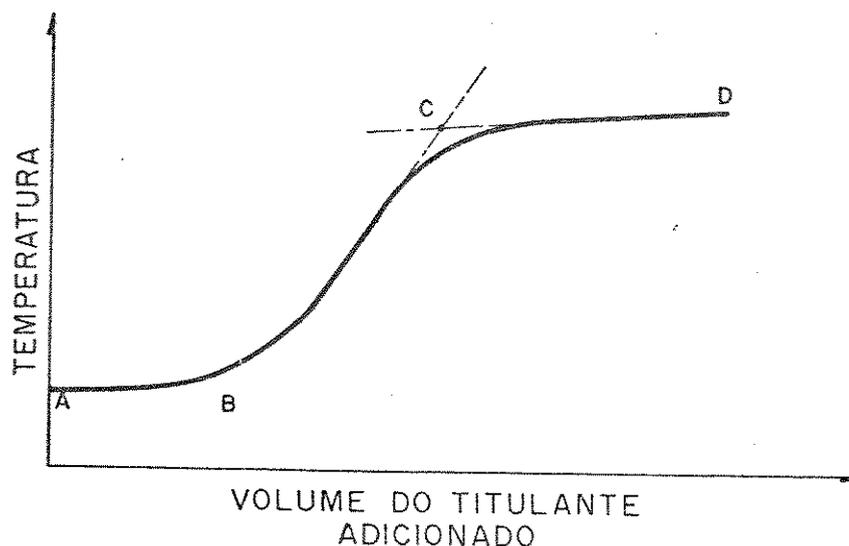


Figura 2. Determinação do ponto final de uma titulação termométrica

mos minimizá-la utilizando titulantes em concentrações maiores do que as do titulado.

2) Calor de agitação. Interfere na determinação do ponto final.

3) Efeito Joule do termistor. É insignificante, durante a medida da variação de temperatura, há uma pequena corrente passando através da alta resistência do material semi-condutor. A energia aí produzida é dissipada como energia térmica.

4) Diferenças de temperatura entre o titulante e o titulado. Essa diferença pode ser controlada experimentalmente e podemos utilizá-la, quando possível, para melhorar a determinação do ponto final.

5) Calor de diluição. Neste ponto, temos uma combinação de calores de diluição, que constituem calor de diluição do titu-

lante e do titulado.

6) Calor de solução. Verificado apenas quando titulante e titulado encontram-se em solventes diferentes.

7) Outros calores de reação, que não seja o da reação seletiva. Quando houver a possibilidade de um dos componentes do sistema reagir com o titulante, além da reação com o composto a ser determinado, poderá ocorrer distorção na curva.

Estes efeitos térmicos estranhos podem ser descontados, quando usamos titulação termométrica normal, mas desde que não mascarem o ponto final. Podemos lançar mão também da titulação termométrica diferencial, com a finalidade de eliminar esses efeitos térmicos estranhos, mas podemos alcançar resultados anômalos, se os efeitos térmicos da amostra em branco e da amostra a ser determinada se diferirem de maneira significativa.

A utilização de titulação termométrica para determinação do ponto final de uma reação com propósito quantitativo, tem interesse se a reação seletiva seja tal que:

1) A variação de temperatura envolvida no sistema seja capaz de provocar inflexão na curva termométrica.

2) A reação seja cineticamente favorável de modo a permitir que a mesma se complete durante o período da titulação.

3) A variação de energia livre não seja desfavorável, de maneira a produzir uma grande curvatura na região do ponto de inflexão da curva, impedindo desta forma a extrapolação precisa das duas retas que nos leva ao ponto final da reação.

A obediência a esses três requisitos nos leva à obtenção de um termograma que se aproxima do ideal, aumentando-se assim a exatidão e a precisão do método.

A titulação termométrica é processada em um sistema adiabático, sendo que a variação de temperatura ocorrida durante o curso da reação é registrada em um gráfico, em função do volume do titulante adicionado.

A substituição do termômetro Beckmann por termopares foi feita por Müller⁽⁷⁾, mas se deve a Linde et alii⁽⁸⁾ o uso de termistor como sensor de temperatura em titulação termométrica. A eles também é atribuído o uso de uma ponte de Wheatstone e um registrador, sugerindo ainda o uso de bureta com vazão constante do tipo apresentado por Lingane⁽²⁵⁾. Tal sugestão foi utilizada em trabalho subsequente publicado por Jordan⁽²⁶⁾.

A introdução do termistor como sensor de temperatura constitui toda a base sobre a qual se desenvolveu a moderna técnica da titulação termométrica. O termistor é um resistor sensível à temperatura, apresentando um coeficiente resistência/temperatura grande e negativo. Seu valor está em torno de 1 a 5% de variação da resistência por grau Celsius. A variação da resistência com a temperatura é geralmente exponencial e a condutância no termistor é "puramente eletrônica". Não havendo variação no potencial aplicado, o fluxo de corrente no termistor é proporcional a sua temperatura.

A parte sensível do termistor é feita de material semicondutor, que constitui uma mistura de óxidos metálicos e tem o formato de uma pequena gota. O comportamento dos semicondutores que apresentam coeficiente resistência/temperatura negativo, difere dos condutores normais como os metais nobres. Estes geralmente apresentam um coeficiente positivo e pequeno.

Coeficiente resistência/temperatura
(ohm °C⁻¹)

termistor	-0,04
cobre	+0,0043
prata	+0,0040
platina	+0,0038

Esta diferença de comportamento se deve à diferente distribuição eletrônica nos dois tipos de condutores. Os semicondutores possuem banda de condução separada da banda de valência por uma energia dada por kT , onde k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura termodinâmica. Quando ocorre um aumento de temperatura, os elétrons são prontamente transferidos para a banda de condução, o que leva a um decréscimo da resistência do sistema.

Nos metais, a temperatura afeta menos a efetiva concentração de elétrons possíveis de condução e a mobilidade eletrônica decrescerá com o aumento da agitação térmica do núcleo dos átomos. Em função disso a resistência dos metais crescerá em pequena extensão, com o aumento da temperatura. A diferença entre um condutor e um semicondutor pode ser vista na figura 3.

Os termistores para serem utilizados como sensores de temperatura em titulação termométrica, necessitam ser protegidos contra ataques químicos, figura 4. Para tal, os termistores, que consistem em pequena esfera de material semicondutor com cerca de 0,5 mm de diâmetro, ligados a dois fios de platina, que por sua vez estão ligados a outros dois fios condutores de liga de cobre, este conjunto encontra-se dentro de um tubo de vidro, sendo que um filme de vidro protege a gota de material semicondutor.

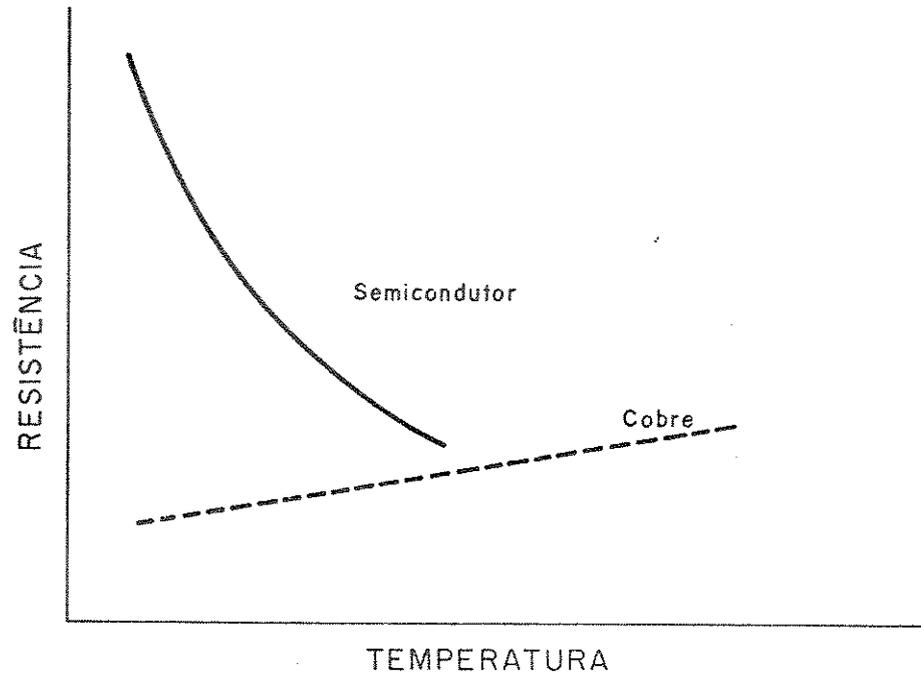


Figura 3. Diferença no coeficiente resistência/temperatura dos semicondutores e condutores

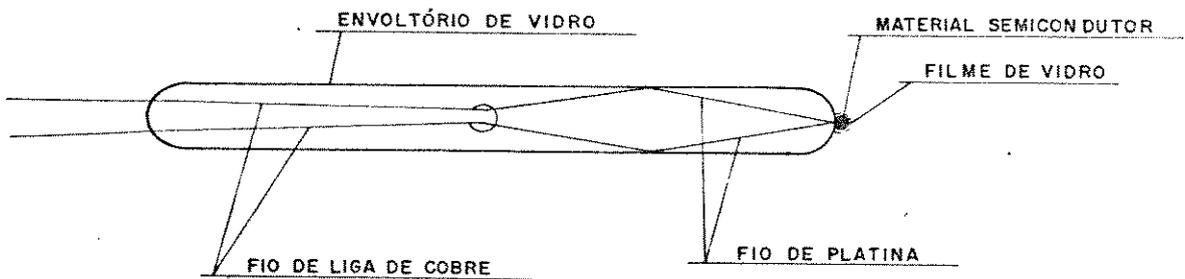


Figura 4. Termistor

Constituem ainda características de um bom termistor: capacidade calorífica e poder de dissipação negligenciáveis.

II.A.3. Aplicações

A titulação termométrica pode ser aplicada a titulações de substâncias inorgânicas ou orgânicas em meio aquoso e não aquoso, utilizando reações de neutralização, precipitação, complexação e óxido-redução, quer seja sob a forma molecular ou iônica. Uma outra aplicação da titulação termométrica é a sua utilização no estudo de materiais biológicos usando os seus equilíbrios ácido-base. Trabalho importante nesta área foi desenvolvido por Christensen e Izatt⁽²⁷⁾.

Quanto a aplicações da titulação termométrica em meio não aquoso, temos o trabalho pioneiro de Cristchfield e Johnson⁽²⁸⁾, os quais titularam bases fracas de Brönsted em solvente aprótico.

No livro⁽²¹⁾ "Thermometric Titrimetry", encontramos uma série de aplicações da titulação termométrica, das quais selecionamos algumas, que se encontram nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1. Titulação termométrica de cátions em meio aquoso

Cátions	Titulante	Referência
Ca ²⁺	C ₂ O ₄ ²⁻	29
Sr ²⁺	"	"
Ba ²⁺	"	"
Hg ₂ ²⁺	"	"
Pb ²⁺	EDTA	26
Cd ²⁺	"	"
Ni ²⁺	"	"
Co ²⁺	"	"

Tabela 2. Titulação termométrica de ânions em meio aquoso

Ânions	Titulante	Referência
Cr ₂ O ₄ ²⁻	Ag ⁺	30
Cl ⁻	"	31, 32
PO ₄ ³⁻	(NH ₄) ₂ MoO ₄	33
SO ₄ ²⁻	Ba ²⁺	34
BO ₃ ³⁻	HF	31
S ²⁻	MnO ₄ ⁻	35

Tabela 3. Titulação termométrica de compostos orgânicos em meio aquoso

Composto	Titulante	Referência
Hidroquinona	Ce (IV) M/600	36
Fenidona	Ce (IV) M/600	"
Resorcinol	Ce (IV) M/480	"
Mentol	Ce (IV) M/240	"
Benzeno sulfonamida	NaCl M/2	37
O-Tolueno sulfonamida	NaCl M/2	"

Tabela 4. Titulação termométrica de bases nitrogenadas em meio ácido acético

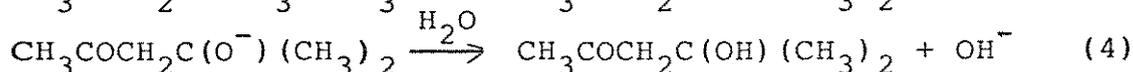
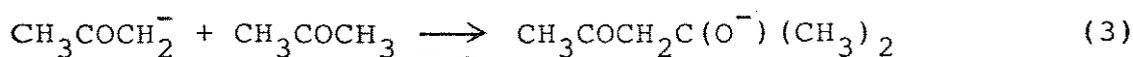
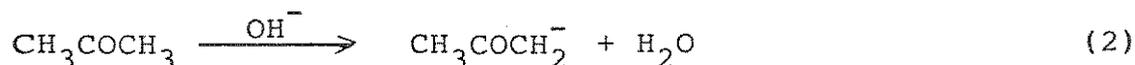
Base	Titulante	Referência
Anilina	HClO ₄ 0,05 M ^a	38
n-Butilamina	"	"
Uréia	"	"
Acetanilida	"	"
Piridina	"	"
Acetamida	"	"

^a HClO₄ em ácido acético glacial

II.B. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA (TTC)

II.B.1. Considerações Gerais

A primeira nota que se tem do uso de reações catalíticas em titulação termométrica data de 1965, através do trabalho de Vaughan e Swithenbank⁽³⁹⁾. Neste trabalho, os autores mostram que quando a acetona é usada como solvente da amostra (titulado), na titulação de ácidos fracos com hidróxidos de potássio em iso-propanol, um aumento de temperatura é observado no ponto final da titulação. Este aumento de temperatura é devido a uma reação exotérmica de dimerização da acetona catalisada pelo íon hidróxi-do, como mostrado a seguir:



O aumento de temperatura verificado no ponto final é da ordem de 5°C, quando o titulante é solução 1 M de hidróxido de potássio em iso-propanol.

O nome "titulação termométrica catalítica" deve-se a Vajgand e Gaál⁽⁴⁰⁾ que o utilizou para descrever a titulação termométrica, cujo ponto final estava baseado na ocorrência de uma reação secundária entre o titulante e uma outra substância que não fosse o titulado, após o ponto de equivalência, reação esta exotérmica.

Logo depois, Vajgand e Gaál⁽⁴⁰⁾, utilizaram o calor da reação de hidratação do anidrido acético, catalisado por ácido

perclórico, para indicar o ponto final na titulação de aminas terciárias e sais de ácidos orgânicos com ácido perclórico.

A aplicação da polimerização vinílica catalisada por ácidos e bases como forma de indicação do ponto final na titulação de ácidos e bases orgânicas, respectivamente, foi descrita por Greenhow em 1972^(41,42). Weiz et alii⁽⁴³⁾ investigaram a possibilidade de uso da titulação termométrica catalítica na determinação de substâncias inorgânicas, pois desde a introdução desta técnica, ela só havia sido utilizada na determinação de substâncias orgânicas. Assim, em 1969, esse autores constataram que o calor liberado na oxidação de arsênio(III) por césio(IV), catalisada por íons iodeto, reação esta descrita por Willard e Young⁽⁴⁴⁾, podia ser utilizada para indicar o ponto final na titulação de prata(I), mercúrio(II) e paládio(II) com iodeto de potássio. A determinação de agentes complexantes e cátions inorgânicos por procedimentos titulométricos, nos quais a reação indicadora baseia-se na decomposição do peróxido de hidrogênio ou na oxidação de resorcinol por peróxido de hidrogênio, ambas catalisadas por manganês(II), deve-se a Weiz e Kiss⁽⁴⁵⁾.

II.B.2. Técnica

A titulação termométrica catalítica⁽⁴⁶⁾ compreende dois processos sequenciais:

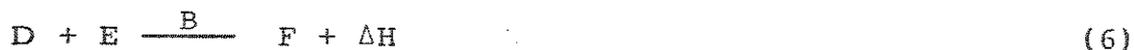
a) Reação determinativa



- A = amostra (titulado)
 B = titulante (reagente)
 C = produto

Nesta reação, titulante e titulado reagem em quantidades estequiométricas.

b) Reação indicativa



- D e E = indicador térmico
 B = catalisador (titulante)
 F = produtos

Nesta reação, um pequeno excesso do titulante catalisa uma reação envolvendo os constituintes indicadores.

Em função das reações determinativa e indicativa podemos deparar com várias formas de curvas de titulação, como pode ser visto na figura 5.

a) Curva ideal. Após, todo o titulado ter sido consumido pelo titulante (reação determinativa), inicia-se a reação de indicação.

b) Esta curva, vem a ilustrar a natureza competitiva dos dois passos na TTC, por isto é que há a necessidade de selecionar os reagentes indicadores e titulantes com apropriadas características catalíticas e cinéticas.

c) A reação indicativa inicia-se antes de ter completado a reação determinativa. Um dos fatores pode ser um produto da reação determinativa iniciar a reação indicativa, com uma posterior inibição limitada da mesma.

d) A reação de indicação inicia-se prematuramente, mas com o aumento da temperatura o titulante consome mais rapidamente o titulado, inibindo a reação de indicação a qual recomeça após a reação determinativa estar virtualmente completa.

Na prática as curvas a e b se sobrepõem e a curva mais típica é a b, a sobreposição corresponde à parte mais arredondada da curva. O ponto final neste caso é obtido através da tangente traçada através da curva. A sobreposição deve ser devida a propriedades catalíticas dos produtos formados durante a reação determinativa e ou a concentração do titulante.

As reações que são normalmente usadas como indicativas do ponto final em titulação termométrica catalítica podem ser

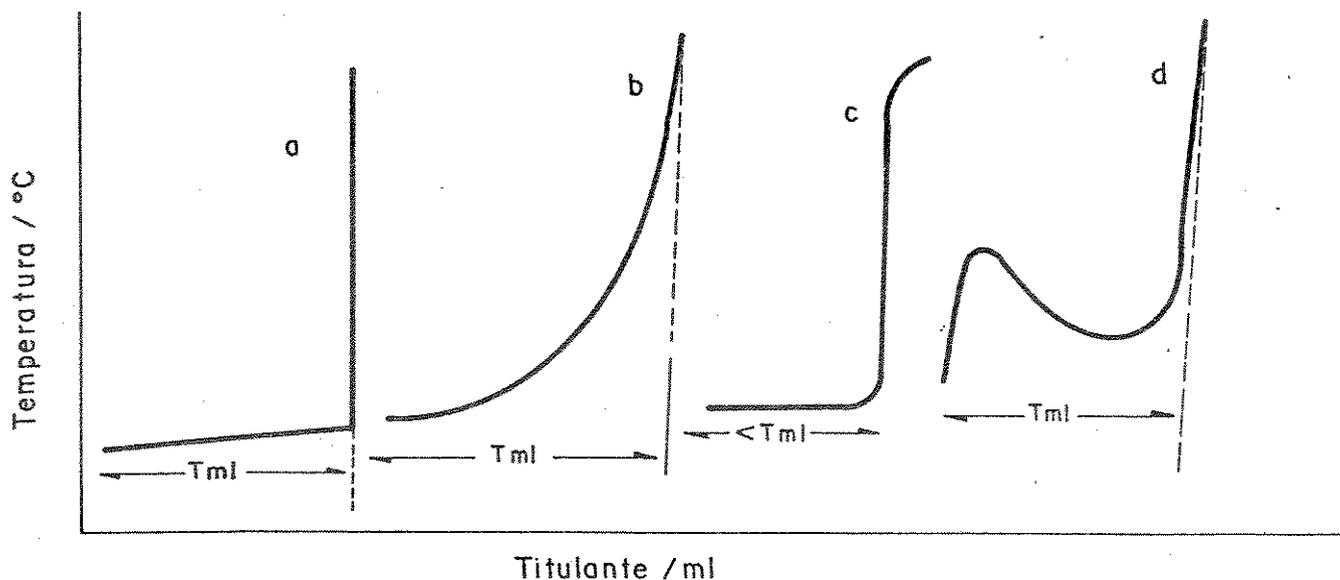
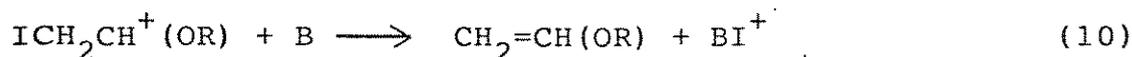
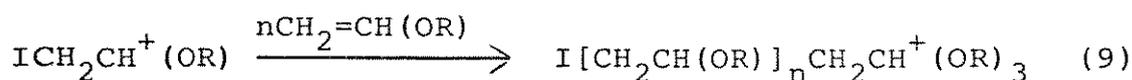
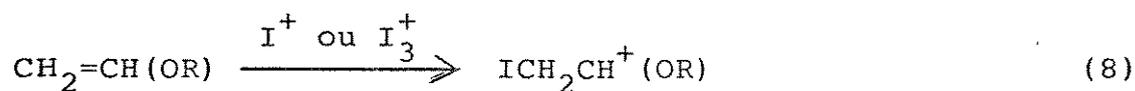
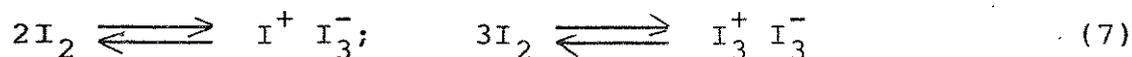


Figura 5. Curvas possíveis de se obter em T.T.C.

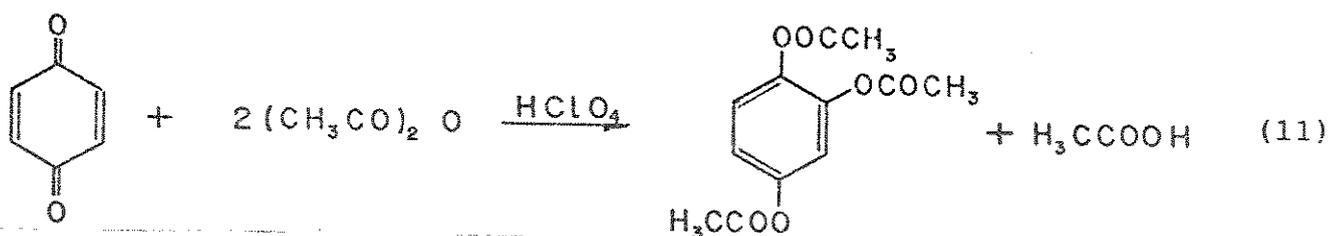
agrupadas em três grupos como mostrado a seguir:

1) Polimerização catalisada por ácidos fortes, bases fortes e iodo (incluindo condensação cetólica e aldólica, polimerização aniônica e catiônica). Exemplo: polimerização vinílica, catalisada por iodo em meio aquoso.

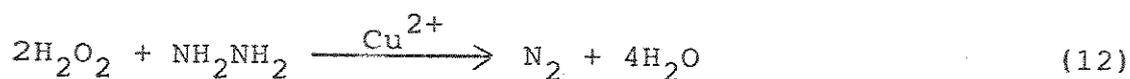


2) Esterificação e hidrólise catalisada por ácido forte. Exemplo: esterificação da quinona, catalisada por ácido

perclórico.



3) Processos de óxido-redução, catalisados por iodeto e ou íons de metais de transição. Exemplo: oxidação da hidrazina com peróxido de hidrogênio, oxidação essa catalisada por íons de cobre(II).



Para que uma substância possa ser utilizada como indicador termométrico catalítico ideal, deve preencher os seguintes requisitos:

- a) Miscível com a mistura em solução.
- b) Não reagir com a mistura.
- c) Experimentar uma reação exotérmica catalisada por uma pequena quantidade de titulante, após o ponto final.
- d) A reação de indicação deve ter um pequeno tempo de indução.
- e) A reação de indicação deve ocorrer à temperatura ambiente.

A priori podemos dizer que a aparelhagem utilizada em titulação termométrica catalítica é praticamente a mesma que a utilizada em titulação termométrica convencional. O sensor de tem-

peratura é o termistor, o qual se encontra ligado a um circuito ponte de Wheatstone e este a um registrador. A reação é processada em um frasco de "Dewar". Entretanto, o aumento de temperatura observado em titulação termométrica catalítica é, normalmente, algumas ordens de grandeza maior que a observada em titulação termométrica convencional. Posto isto, as precauções que se fazem necessárias na última técnica não são normalmente requeridas na primeira e com isto a aparelhagem pode sofrer modificações, que na realidade constituem antes de tudo uma adequação da aparelhagem para uma dada determinação, sem todavia alterar a sua essência.

A aparelhagem utilizada por Vaughan e Swithenbank⁽³⁹⁾, a originária da técnica, consiste de um termistor que se encontra conectado por meio de um simples circuito de ponte a um registrador. O titulante é adicionado continuamente por uma seringa de fluxo constante. O frasco de titulação constitui de um béguer de 20 ml provido de uma tampa, pela qual passa o fluxo do titulante, o termistor, o tubo de gás inerte e o agitador. Um aparelho similar mas com um amplificador operacional, com a finalidade de amplificar o sinal do termistor, e provido de um frasco de reação mais efetivo, foi usado por Weiz et alii⁽⁴³⁾ para a titulação de íons inorgânicos. Essa aparelhagem é pertinente, tendo em vista que, nessa titulação, o aumento de temperatura é menor que o obtido com indicadores térmicos orgânicos.

É de bom alvitre lembrar que em titulação termométrica catalítica a agitação tem que ser eficiente, a fim de evitar concentrações locais de titulante, evitando a prematura iniciação da reação de indicação. Vajgand et alii⁽⁴⁷⁾ desenvolveram um aparelho coulométrico para titulação termométrica catalítica. Com esta apa-

relhagem eles determinaram aminas terciárias e carboxilatos metálicos, por titulação com ácidos gerados em um ânodo de platina ou mercúrio e ácidos fracos por titulação com álcali gerado no cátodo.

II.B.3. Aplicações

Embora dependente da combinação titulante e sistema indicador, o universo da titulação termométrica catalítica é vasto.

Entretanto, de modo geral, podemos dizer que encontramos aplicações desta técnica em reações ácido-base, precipitação, complexação e iodimétricas em meio não aquoso.

Cada um destes quatro grupos de reações é adequado para a determinação de um grupo particular de compostos e é conveniente considerar as aplicações de acordo com a reação envolvida. Nas tabelas 5, 6 e 7 encontramos alguns exemplos de aplicações da titulação termométrica catalítica⁽⁴⁶⁾.

Em conclusão, podemos dizer que a extensão da aplicação da titulação termométrica catalítica está limitada pela disponibilidade de combinações adequadas de reações determinativas e indicadores, e a intrínseca seletividade do método da indicação do ponto final. A titulação termométrica catalítica difere fundamentalmente da convencional. A última é um procedimento no qual o calor da reação entre o titulante e o titulado é monitorizado e a troca de calor depende da quantidade da amostra. Ao passo que, na primeira, o ponto final é detectado por uma reação entre o indicador termométrico e o titulante, sendo que a alteração de temperatura irá depender da concentração do indicador.

Tabela 5. Titulação de ácidos e substâncias ácidas

Ácidos e substâncias ácidas	Reagente indicador (ml)	Titulante molaridade (moles/l)	Solvente da amostra (ml)	Referência
Ácido bórico; ácido fosfórico; ácidos carboxílicos; amino-ácidos; ceto-enóis	Acetaldeído (3)	KOH ^a (0,5)	Água (2)	48
Soluções aquosas de: ácido benzóico; fosfórico; bórico. Fenol; resorcinol; amino-ácidos	Acrilonitrila (2)	KOH ^a (0,5)	DMSO (3) Água (0,2 - 1,0)	49

^a Em iso-propanol ou água

Tabela 6. Titulação de bases

Bases	Reagente indicador (ml)	Titulante molaridade (moles/l)	Solvente da amostra (ml)	Referência
Alquil e aminas terciárias heterocíclicas, incluindo antipirina, cinconina, piridoxina e cafeína, carboxilatos de sódio e de potássio	Anidrido acético (0,5-2) + Água (0,1 - 0,5)	HClO ₄ ^a (0,25)	Ácido acético, anidrido acético, nitrometano (7-25)	50-47 51-52
Alquil primário, secundário e terciário, aminas acicíclicas, aminas heterocíclicas, dimetilssulfóxido e hexametilfosforamida	2-metilpropilvinil éter (2-10)	BF ₃ -Et ₂ O ^b (0,001)	Tolueno, acetona, ácido acético, nitroetano, 1-2-dicloroetano (2-10)	53

^a Em ácido acético e misturas de ácido acético com anidrido acético ou nitrometano

^b Em dioxano e misturas de dioxano com 1-2-dicloroetano, acrilonitrila ou nitroetano

Tabela 7. Diversas titulações

Compostos	Reagente indicador (ml)	Titulante molaridade (moles/l)	Solvente (ml)	Ref.
EDA, EDTA	H ₂ O ₂ ^a + resorcinol ^b ou H ₂ O ₂ ^a	MnCl ₂ (10 ⁻⁴ - 2.10 ⁻²)	Água (5)	45
NaI, KI, ZnI ₂ , NiI ₂ , PbI ₂	Etilvinil éter (2-3)	I ₂ (5.10 ⁻³ - 5.10 ⁻²)	DMF (2-5) AN (2-5) Clorofór- mio (2-5)	54

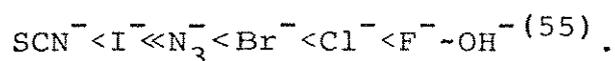
^a H₂O₂ 5% 0,1 ml

^b 5% de resorcinol 0,1 ml

CAPÍTULO III
DIMETILSULFÓXIDO

No presente estudo, trabalhamos com solvente misto, ou seja, DMSO e água. A razão principal da utilização deste solvente misto reside em problemas de solubilidade.

Solventes que apresentam constante dielétrica maior que 15 e que, embora contenham átomos de hidrogênio não são capazes de doá-los para formar fortes pontes de hidrogênio com espécies apropriadas, são classificados como solventes dipolares apróticos. Dentre os solventes dipolares apróticos temos o dimetilsulfóxido (DMSO), o qual apresenta momento dipolar igual a 4,3 D. Consideremos quatro tipos de modelos de interações solventes-soluto a saber: íon-dipolo, dipolo-dipolo, formação de complexos π e ligação de hidrogênio. Em solventes próticos, os quais solvatam ânions por interação íon-dipolo e por forte ponte de hidrogênio, a facilidade de solvatação aumenta com o decréscimo do tamanho e aumenta com a eletronegatividade do ânion. Temos, pois, a seguinte ordem de solvatação:



Ânions são menos solvatados por solvente dipolar aprótico, sendo que ânions largamente polarizáveis são mais facilmente solvatados que os menos polarizáveis. Desta forma, a série de solvatação é de ordem inversa à anterior⁽⁵⁵⁾. Os cátions são geralmente menos solvatados em solventes próticos que os ânions⁽⁵⁶⁾. O inverso é verdadeiro para o solvente dipolar aprótico.

Entretanto, a capacidade de um solvente atuar como doador de próton ou de elétron vem caracterizá-lo melhor que a sua polaridade.

Entre os solventes dipolares apróticos, dimetilssulfóxido tem crescido de importância nos últimos anos. Esta importância é tão somente devida ao seu alto poder solvente, visto que muitos com-

postos orgânicos e inorgânicos nele são solúveis, mas também devido à facilidade de sua produção (57).

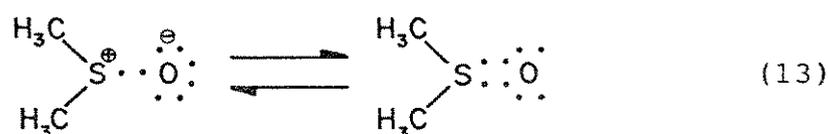
DMSO é um líquido incolor, inodoro e higroscópico. A 20°C apresenta-se sob a forma de uma mistura em equilíbrio contendo 10% de água (58).

Algumas de suas propriedades físicas estão listadas na tabela 8.

Tabela 8. Constantes físicas do DMSO (58)

Ponto de fusão	18,55 ± 0,02°C
Ponto de ebulição	189,0 ± 0,2°C/760 mmHg
Calor específico a 25°C	0,4698 cal/g
Densidade a 20°C	1,1000 g/cm ³
Volume molar a 20°C	71,03 cm ³ /mol
Constante dielétrica a 20°C	48,9
Momento dipolar	4,3 ± 0,1 D
Condutividade específica a 20°C	3,10 ⁻⁸ Ω ⁻¹ cm ⁻¹
pKa	31,3
Viscosidade, c.p. a 25°C	1,99

DMSO é melhor formulado como sendo um híbrido de ressonância de estrutura canônica apresentando uma ligação polarizada S — O, que apresenta uma dupla ligação (p — d) fSO.

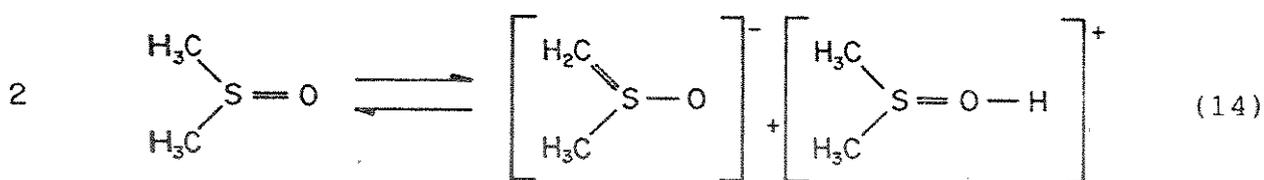


DMSO contém dois átomos doadores: o átomo de oxigênio

que apresenta alta densidade eletrônica e o átomo de enxofre, que a despeito do seu caráter parcialmente positivo, possui propriedades nucleofílicas por causa de seu par de elétrons desemparelhado.

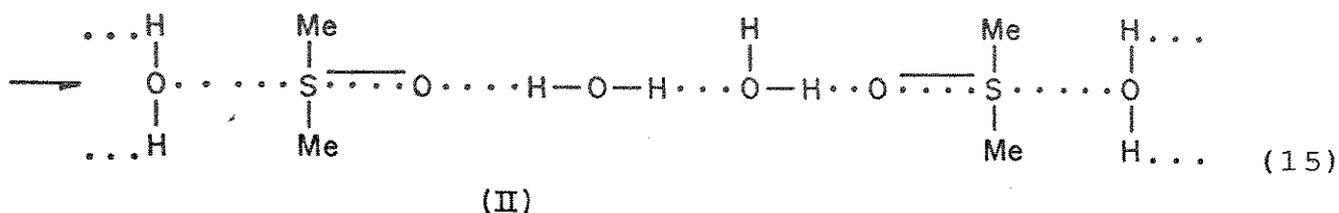
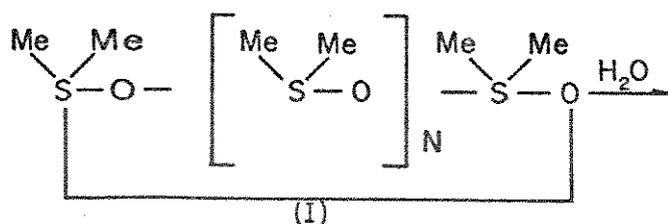
O alto e seletivo poder de solubilização do DMSO é devido a três importantes propriedades: sua relativamente alta polarizabilidade, sua habilidade em formar ligação de hidrogênio e o fato de ser líquido em uma grande faixa de temperatura.

DMSO sofre autoprotólise de acordo com a equação



Devido à grande densidade eletrônica do átomo de oxigênio, DMSO solvata cátions em geral.

A basicidade do DMSO, a qual é resultante da grande densidade eletrônica do átomo de oxigênio, é levemente maior que a da água. O termo aprótico sugere que a acidez do DMSO em água não é suficiente para permitir que ele atue como um doador de prótons para a água. Pelo fato de ser uma base mais forte que a água, o coeficiente de transferência do próton entre a água e o mesmo é da ordem de $10^{3,5}$ (59). Lindenberg (60) estimou que a ligação de hidrogênio entre DMSO e água é 1,3 vezes mais forte que aquelas entre as moléculas de água. Quando água é misturada com forte hidrogênio aceptor, tal como DMSO, muito calor é libertado e, sob certas condições, a mistura torna-se viscosa por um certo tempo. Isto ocorre devido à quebra do anel de enxofre e oxigênio da estrutura (I), que foi sugerida por Schäfer e Schaffernicht (59) e a formação de uma estrutura de ligação de hidrogênio (II) (61).



Stewart e O'Donnell⁽⁶²⁾ mostraram que a atividade dos íons hidrôxidos em soluções aquosas de DMSO aumenta com o aumento da concentração dos mesmos. Isto ocorre devido à competição do DMSO com a molécula de água, que ordinariamente solvata o íon hidrôxido. Esta competição diminui a esfera de solvatação do íon hidrôxido, causando um aumento de sua atividade.

A importância biológica do DMSO reside no fato de poder penetrar na barreira dérmica rapidamente e em altas concentrações⁽⁶³⁾.

DMSO penetra em tecidos vivos, provavelmente devido à sua natureza polar, sua capacidade em formar ponte de hidrogênio e à sua estrutura relativamente pequena e compacta.

Esta combinação de propriedades resulta na habilidade de DMSO associar com água, proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos, substâncias iônicas e outros constituintes do sistema vivo. DMSO é extremamente efetivo na alteração da configuração de proteínas, alteração esta aparentemente reversível. O efeito do DMSO é devido em parte à formação de estruturas hidratadas nas quais a li-

gação hidrogênio entre DMSO e água ou outros grupos próton-doadores, serem mais fortes que a ligação de hidrogênio, entre moléculas de água. DMSO afeta as ligações hidrofílicas e, a altas concentrações, pode afetar as ligações hidrofóbicas das proteínas.

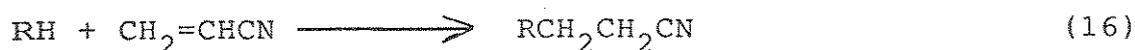
O estudo do sistema solvente DMSO-água é de importância fundamental para o conhecimento das possíveis funções de DMSO em sistemas biológicos que podem estar associadas à substituição de moléculas de água, associadas com os constituintes celulares ou afetando a estrutura da água onipresente. Dados termodinâmicos, dielétricos, de titulação termométrica catalítica⁽⁶⁴⁾ e de relaxação⁽⁶⁵⁾ mostram a existência de uma forte interação entre DMSO e água. Uma molécula de DMSO preferencialmente associa-se com duas moléculas de água. DMSO estabiliza a estrutura, em forma de cacho, da água. Pode, por conseguinte, ser capaz de deslocar o equilíbrio entre a água menos estruturada e a mais estruturada, em favor da última. A hidratação dos constituintes celulares⁽⁶⁶⁾ e a atividade da água em geral, não são necessariamente as mesmas nos diferentes estados de água. Compreende-se que DMSO pode exercer um efeito indireto nos sistemas biológicos pelo seu poder de alterar a estrutura líquida da água. Entre as consequências biológicas mais importantes, deste efeito indireto do DMSO, podemos mencionar as alterações na conformação e associação de proteínas e outras moléculas. Efeitos biológicos mais diretamente causados por DMSO, sem uma profunda alteração na sua identidade química, incluem alterações no equilíbrio par iônico e na específica solvatação de doadores de ligação de hidrogênio.

CAPÍTULO IV

REAÇÃO DE CIANOETILAÇÃO EM MEIO DMSO-ÁGUA

IV.A. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, que possuem átomos de hidrogênio lábeis, adicionam facilmente à acrilonitrila com a formação de moléculas contendo grupos cianoetilados. Esta reação é comumente conhecida como "cianoetilação" e constitui um tipo de reação de Michael⁽⁶⁷⁾.



Compostos que contêm átomos de hidrogênio reativos, os quais podem ser adicionados à acrilonitrila, são:

- a) Compostos que têm um ou mais grupos -NH-, tais como: amônia, aminas primárias e secundárias, hidrazina, hidroxilamina, imidas, lactonas e amidas.
- b) Compostos que têm um ou mais grupos -OH, -SH ou -AsH-, tais como: água, álcoois, fenóis, aminas, sulfeto de hidrogênio, mercaptanas e arsinas.
- c) Certos compostos ácidos, tais como: ácido cianídrico, ácido clorídrico, ácido bromídrico e bissulfeto de sódio.
- d) Compostos que possuem o grupo HCX₃, nos quais X é cloreto ou brometo.
- e) Sulfonas que apresentam um grupo -CH₂- entre o grupo -SO₂ ou um anel aromático.
- f) Nitro compostos que apresentam os seguintes grupos

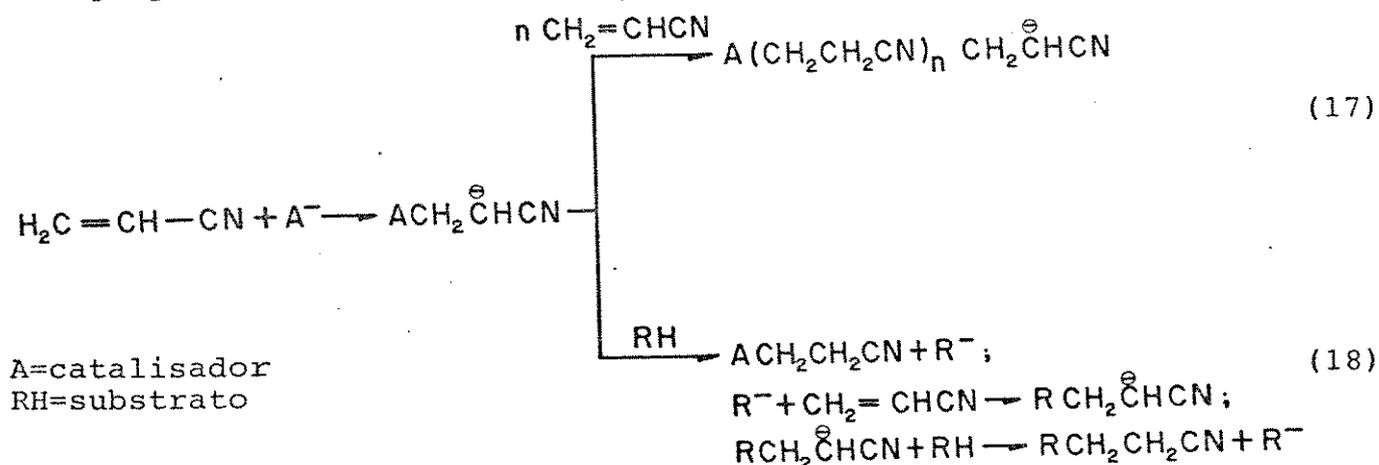
-CH-, -CH₂- ou -CH₃, contíguos para o grupo -NO₂.

g) Compostos tais como: ésteres malônicos, malonamida, cianoacetamida, etc., nos quais um grupo -CH- ou -CH₂- está situado entre os grupos -CO₂R, -CN, -CONH-.

A reação de cianoetilação, exceto com certas aminas, usualmente requer a presença de um catalisador alcalino. Catalisadores típicos, os quais são ótimos para este propósito, são os óxidos, hidróxidos, alcóxidos, hidretos, cianetos e amidas dos metais alcalinos sódio e potássio.

A introdução do uso da acrilonitrila como indicador termométrico em titulações termométricas catalíticas deve-se à Greenhow⁽⁶⁸⁾, que a utilizou para a indicação do ponto final da titulação de ácidos fracos com bases fortes em meio orgânico. O aumento de temperatura que indica o ponto final da titulação é causado por uma reação exotérmica, catalisada por pequeno excesso do titulante básico.

No ponto final, duas reações podem ocorrer: polimerização aniônica da acrilonitrila (reação 17) e cianoetilação, desde que esteja presente um substrato adequado (reação 18).



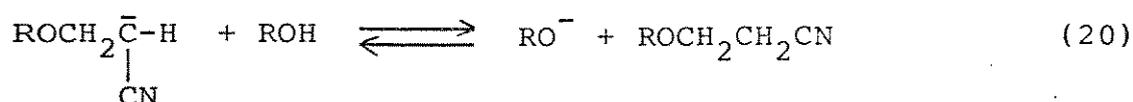
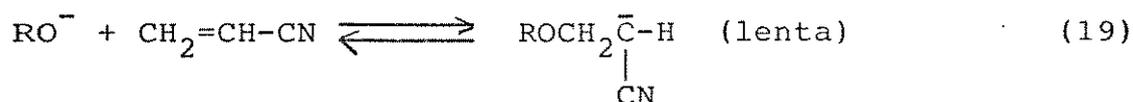
A=catalisador
RH=substrato

Posteriormente, verificou-se que a polimerização aniônica é predominante quando a concentração de compostos capazes de so-

frerem cianoetilação é baixa⁽⁴²⁾.

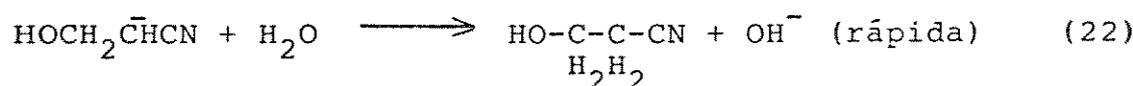
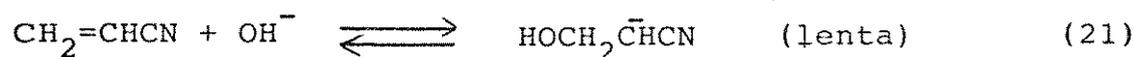
Em certas titulações, devido a problemas de solubilidade do titulado, torna-se necessária a presença de água no sistema solvente. Entretanto, a sua presença apresenta um efeito adverso nas curvas de titulação, devido à sua capacidade de retardar o efeito catalítico dos íons hidróxidos. Mas, devido ao fato de DMSO, ou outro solvente dipolar aprótico, reduzir esse efeito adverso, levou-nos a optar pelo meio água solvente dipolar aprótico. Em meio DMSO-água, pode haver a formação do composto bis(diacianoetil)éter, proveniente da cianoetilação da água. Quando temos álcool presente no titulante ou adicionado ao titulado, pode haver a cianoetilação do mesmo.

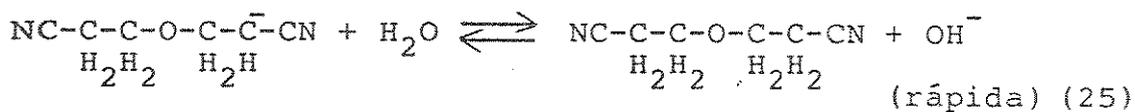
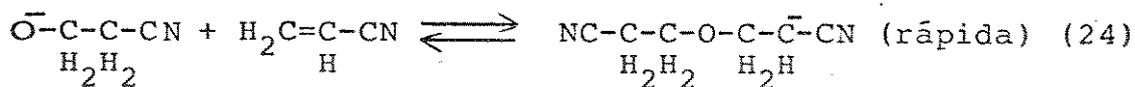
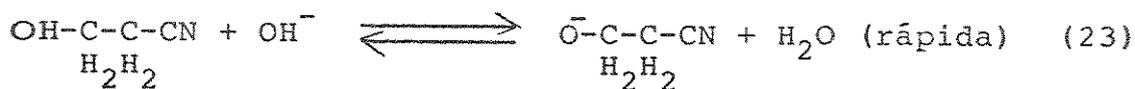
A reação de cianoetilação dos álcoois pode ser assim esquematizada:



No presente trabalho R pode ser um dos seguintes radicais: n-propil, sec-propil, n-butil- sec-butil, ter-butil.

A reação de cianoetilação da água ocorre da seguinte forma⁽⁶⁹⁾:





O propósito deste estudo é procurarmos identificar as reações e os compostos responsáveis pelo aumento de temperatura no ponto final da titulação de ácidos, em meio DMSO-água, e, desta forma, poderemos escolher sistematicamente a mistura de reação e o titulante mais favorável para a titulação, em função da forma da curva. Foram utilizados dois parâmetros, sendo que um deles foi retirado da própria curva de titulação e o outro a partir dos dados obtidos por cromatografia à gás.

IV.B. PARTE EXPERIMENTAL

IV.B.1. Aparelhagem

IV.B.1.a. Aparelhagem utilizada nas titulações termométricas catalíticas

Como foi visto anteriormente, uma das vantagens da titulação termométrica catalítica reside no fato da aparelhagem exigida ser simples e fácil de ser montada. O esquema de tal aparelhagem pode ser visto na figura 6.

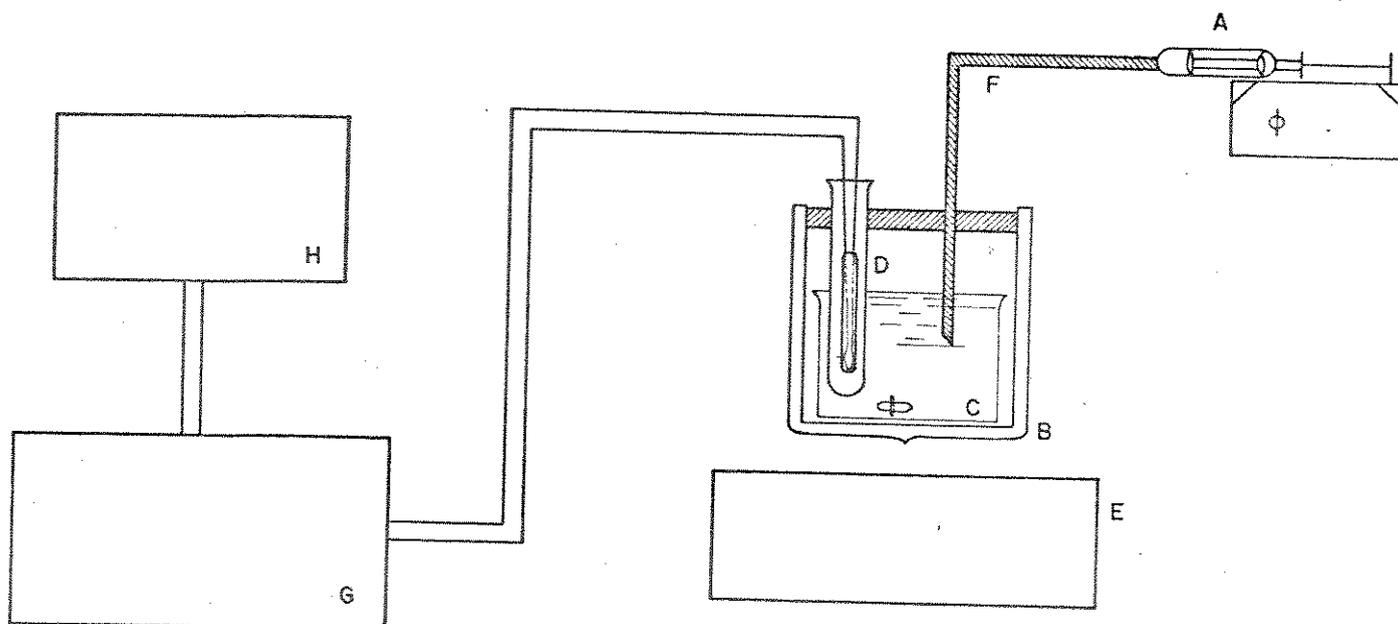
O titulante é adicionado por meio de uma seringa de vidro, marca "Omega", com a capacidade de 20,0 ml, acoplada ao equipa-

Dewar "não espelhado" com a capacidade de 20,0 ml. Utilizamos um termistor com resistência de valor nominal de 2.286Ω a 25°C , com variação de aproximadamente 5% da resistência por $^{\circ}\text{C}$. A agitação da solução é feita através de agitador magnético.

O termistor, por sua vez, encontra-se no interior de um tubo de vidro imerso em mercúrio metálico, para a sua proteção mecânica e proteção do circuito elétrico. O termistor encontra-se ligado ao circuito da ponte de Wheatstone e esta a um registrador potenciométrico, sendo a ponte de marca Leeds e Northrup modelo 4760, cuja tensão de alimentação é fornecida por uma bateria de mercúrio de 1,45 V. O registrador potenciométrico é da marca ECB- Equipamentos Científicos do Brasil, modelo RB 101, cuja sensibilidade varia de 2 V a 1 mV. A impedância de entrada na faixa utilizada é de $1 \text{ M}\Omega$. Usamos uma velocidade nominal do papel de 1 cm/min, sendo que o papel possui uma escala arbitrária de 100 divisões.

Faz parte do sistema o termistor, montado com uma ponte de Wheatstone, e o registrador potenciométrico. Já sabemos que a resistência do termistor não varia linearmente com a temperatura, porém, interessa verificar a resposta de todo o sistema.

Quanto à estabilidade do termistor, Robertson et alii⁽⁷⁰⁾ compararam o mesmo a um termômetro de platina e concluíram que os termistores apresentam alta confiabilidade para medidas de temperaturas absolutas, pelo menos até $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$, por um período de vários meses. Um esquema do circuito termistor montado na ponte de Wheatstone e registrador potenciométrico, bem como a análise do circuito, foi bem discutido por Macedo Costa⁽⁷¹⁾.



LEGENDA

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| A- SERINGA C/ VAZÃO CONSTANTE | E - AGITADOR MAGNÉTICO |
| B- FRASCO DE DEWAR | F - TUBO DE POLIETILENO |
| C- FRASCO DE TITULAÇÃO | G - PONTE DE WHEATSTONE |
| D- TERMISTOR | H- REGISTRADOR POTENCIOMÉTRICO |

Figura 6. Esquema da aparelhagem utilizada na titulação termométrica catalítica

mento "Syringe Pump 351" da Sage Instruments, que permite a sua utilização com vazões constantes. Este equipamento possibilita o uso em dezenove vazões diferentes, cujos valores nominais vão de 0,15 ml/min a 60 ml/min. Ligado à ponta da seringa temos um tubo de polietileno, cujo diâmetro interno é de aproximadamente 1 mm, o qual conduz o titulante até o frasco de titulação.

As titulações termométricas são desenvolvidas no frasco

IV.B.1.b. Aparelhagem utilizada nas determinações cromatográficas

Para procedermos as análises cromatográficas dos compostos de cianoetilação dos álcoois, da água, bem como da acrilonitrila, utilizamos um cromatógrafo à gás, marca Varian, modelo 920, detector de condutividade térmica e as seguintes colunas, por nós preparadas:

a) Para a determinação dos compostos de cianoetilação do n-propanol e iso-propanol, da acrilonitrila e dos álcoois, usamos uma coluna de alumínio de 2 m de comprimento e 1/4" de diâmetro, recheada com FFAP 3% sobre Varaport 30 a 100 mesh.

b) Na determinação dos compostos provenientes da cianoetilação da água e dos álcoois n-butanol e sec-butanol, lançamos mão de uma coluna de alumínio de 2 m de comprimento e 1/8" de diâmetro, recheada com OV-17 3% sobre Chromosorb-G, 100 mesh.

IV.B.2. Calibrações

IV.B.2.a. Calibração do termistor

O termistor foi calibrado nas sensibilidades usadas nos trabalhos ou seja: 10, 50, 100 e 500 mV. Nesta calibração manteve-se os valores das resistências da ponte constantes e mediu-se a deflexão do registrador com a variação de temperatura. Para tanto, o seguinte procedimento foi adotado: o termistor foi colocado em um frasco "Dewar" não espelhado, no qual havia um termômetro comum, de mercúrio, que, com a ajuda da lupa, era possível de se ler até 0,05°C e um termômetro Beckmann, que com uma lupa era possível de se ler até 0,005°C. Medimos a deflexão do registrador ao variarmos a tem-

peratura em $0,200^{\circ}\text{C}$, mantendo-se todos os valores de resistência da ponte constantes. A temperatura inicial foi de $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ e a resistência do termistor de $2\,286 \pm 1\ \Omega$. Obtivemos os dados apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Dados relativos à calibração do termistor em $^{\circ}\text{C}/\text{cm}$

Sensibilidade mV	Número de medidas	Deflexão do registrador $^{\circ}\text{C}/\text{cm}$	s	s _{relativo} %
10	9	0,058	0,002	3,1
50	9	0,285	0,002	0,7
100	9	0,486	0,001	0,3
500	9	2,115	0,002	0,1

Observação: nas medidas de temperatura foi utilizado um termômetro Beckmann. $T_{\text{inicial}} = 25,00^{\circ}\text{C}$

IV.B.2.b. Calibração da seringa com vazão constante

O aparelho "Syringe Pump" modelo 351 da Sage Instruments, no qual foi conectado uma seringa de vidro de 20,0 ml de capacidade, marca "Omega", permite que se trabalhe em dezenove vazões nominais diferentes, de 0,15 ml/min a 60 ml/min.

Foram feitas calibrações das vazões nominais de 0,2 ml/min, 0,3 ml/min, 0,4 ml/min, 1,0 ml/min e 1,5 ml/min.

Os resultados encontram-se listados na tabela 10.

IV.B.2.c. Calibração do material volumétrico

Balões, pipetas e buretas foram calibrados com água des-

Tabela 10. Dados relativos à calibração da seringa Omega de 20,0 ml de capacidade

Vazão nominal ml/min	Tempo de vazão min	Temperatura de calibração °C	N	Vazão real ml/min	s	s _{relativo} %
0,2	5	23	6	0,199	0,002	0,9
0,3	5	24	6	0,298	< 0,001	< 0,1
0,4	5	24	6	0,400	0,001	0,3
1,0	2	25	6	1,004	0,002	0,2
1,5	2	22	6	1,502	0,003	0,2

N = número de medidas

tilada, em equilíbrio térmico com o ambiente. Foram feitas seis medidas em cada caso, os desvios foram iguais ou menores que 0,04%.

IV.B.3. Reagentes Utilizados

Na realização do presente trabalho, utilizou-se as seguintes substâncias:

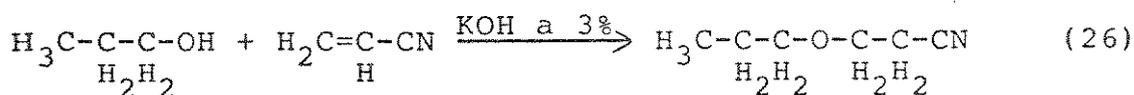
- Hidróxido de potássio R.P.E. "Carlo Erba".
- Ácido benzóico R.P.E. "Carlo Erba"
- 18-Crown-6 "Aldrich"
- Hidróxido de tetraetilamônio a 20% "Aldrich"
- Dimetilssulfóxido P.A. "Merck"
- Acrilonitrila P.A. "Merck"
- n-propanol R.P.E. "Carlo Erba"

- Iso-propanol P.A. "Baker"
- n-butanol P.A. "Merck"
- Sec-butanol P.A. "Merck"
- Sec-butanol R.P.E. "Carlo Erba"
- Potássio metálico comercial

Usamos também os compostos provenientes da cianoetilação dos álcoois e da água. Os mesmos foram por nós sintetizados, como descrito a seguir, conforme indicação obtida através do trabalho de Brunson⁽⁶⁷⁾.

Preparação do β -n-propóxi propionitrila

A reação que ocorre é a seguinte:



A quantidade de base é cerca de 3% do peso do álcool. Fizemos uma solução de base (KOH) no álcool (n-propanol), logo após adicionamos lentamente a acrilonitrila, sob agitação vigorosa e resfriamento (na adição da acrilonitrila a temperatura não deve ultrapassar 45°C). Depois que toda a acrilonitrila foi adicionada, aquecemos a mistura em banho maria a aproximadamente 80°C por uma hora. A seguir acidificamos com ácido acético glacial e destila-se a vácuo.

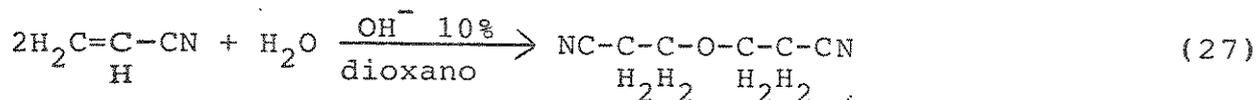
Algumas características do β -n-propóxi propionitrila são ponto de ebulição = 65°C a 20 mmHg, densidade relativa = 0,882. Para verificar a pureza do produto e identificá-lo, utilizamos as técnicas de cromatografia a gás e ressonância magnética nuclear.

Os demais compostos provenientes da cianoetilação dos álcoois foram preparados de forma similar a esta, com exceção do β -ter-butóxi propionitrila. Neste caso, há a necessidade de se efe-

tuar a reação sob aquecimento, em torno de 80°C.

Preparação do bis(dicianoetil)éter

A reação que é a seguinte:



Adiciona-se dioxano sobre uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 10% e sob agitação adiciona-se a acrilonitrila. A seguir aquece-se a refluxo por seis horas a 80°C. Neutraliza-se o hidróxido com ácido clorídrico 3 M e destila-se a vácuo.

Algumas características do bis(dicianoetil)éter são ponto de ebulição = 61-63°C a 5,5 mmHg, densidade relativa = 1,048.

Para verificar a pureza do produto e identificar, utilizamos as técnicas de cromatografia a gás e ressonância magnética nuclear.

Soluções utilizadas e suas padronizações

No estudo das reações de cianoetilação utilizamos como solução titulada a de ácido benzóico 0,1 M em DMSO:H₂O 8:1 (V/V).

Como titulantes utilizamos as seguintes soluções:

a) Solução 0,1 M de hidróxido de potássio em n-propanol e em iso-propanol, preparadas pela dissolução do hidróxido no álcool.

b) Solução 0,1 M de n-butóxido de potássio em n-butanol, sec-butóxido de potássio em sec-butanol e ter-butóxido de potássio em ter-butanol, preparadas a partir da dissolução de potássio metálico nos álcoois correspondentes. Estas dissoluções devem ser feitas sob resfriamento e o álcool deve estar isento de água.

c) Solução 0,1 M de hidróxido de tetraetilamônio, preparada pela diluição da solução a 20% em água, na mistura DMSO:H₂O

8:1 (V/V).

d) Solução 0,1 M de hidróxido de potássio em DMSO:H₂O 8:1 (V/V) com 18-crown-6. Esta solução é preparada da seguinte maneira: usa-se quantidades equimoleculares de hidróxido de potássio e 18-crown-6. Primeiramente dissolve-se o 18-crown-6 na mistura DMSO:H₂O 8:1 (V/V), após sua dissolução adiciona-se o hidróxido de potássio e agita-se até a sua completa dissolução.

A padronização das soluções titulantes é feita da seguinte forma: como padrão primário usa-se o ácido benzóico e procedemos a titulação no meio igual ao da solução a ser padronizada. Como indicador usa-se a fenolftaleína. A titulação deve ser feita sob atmosfera de nitrogênio. Deve-se proceder em qualquer padronização à titulação do branco.

Tratamento dos solventes

Dimetilssulfóxido e acrilonitrila foram redistilados e secos em peneira molecular de 4 Å. Os álcoois foram apenas secos em peneira molecular de 4 Å.

IV.B.4. Procedimento

IV.B.4.a. Escolha do meio de reação ótimo

Com a finalidade de estabelecer qual seria a melhor razão entre DMSO e água, bem como o melhor volume de acrilonitrila, realizamos estudos qualitativos para tal e como parâmetro utilizamos o coeficiente angular (parâmetro α), obtido a partir da curva de titulação, calculado da maneira que é mostrado na figura 7.

Neste estudo usamos como titulado a solução de ácido

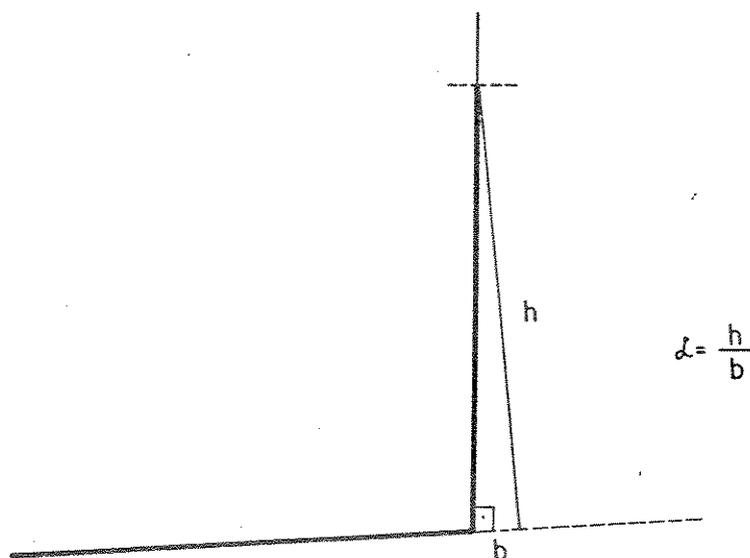


Figura 7. Demonstração da maneira de calcular o parâmetro α . Quanto maior o valor de α , melhor é a curva de titulação

benzôico 0,1 M em DMSO-água 6:1 (V/V) e como titulante a solução de $(C_2H_5)_4NOH$ 0,1 M em DMSO-água 6:1 (V/V), preparada e padronizada conforme descrito em IV.B.3.

IV.B.4.b. Determinação do volume ótimo de DMSO

Neste estudo mantivemos o volume de água constante, ou seja, 1,0 ml e variamos o volume de DMSO (de 3,0 a 12,0 ml). Os resultados obtidos estão na figura 8.

IV.B.4.c. Determinação do volume ótimo de água

Para a realização deste estudo, mantivemos o volume de

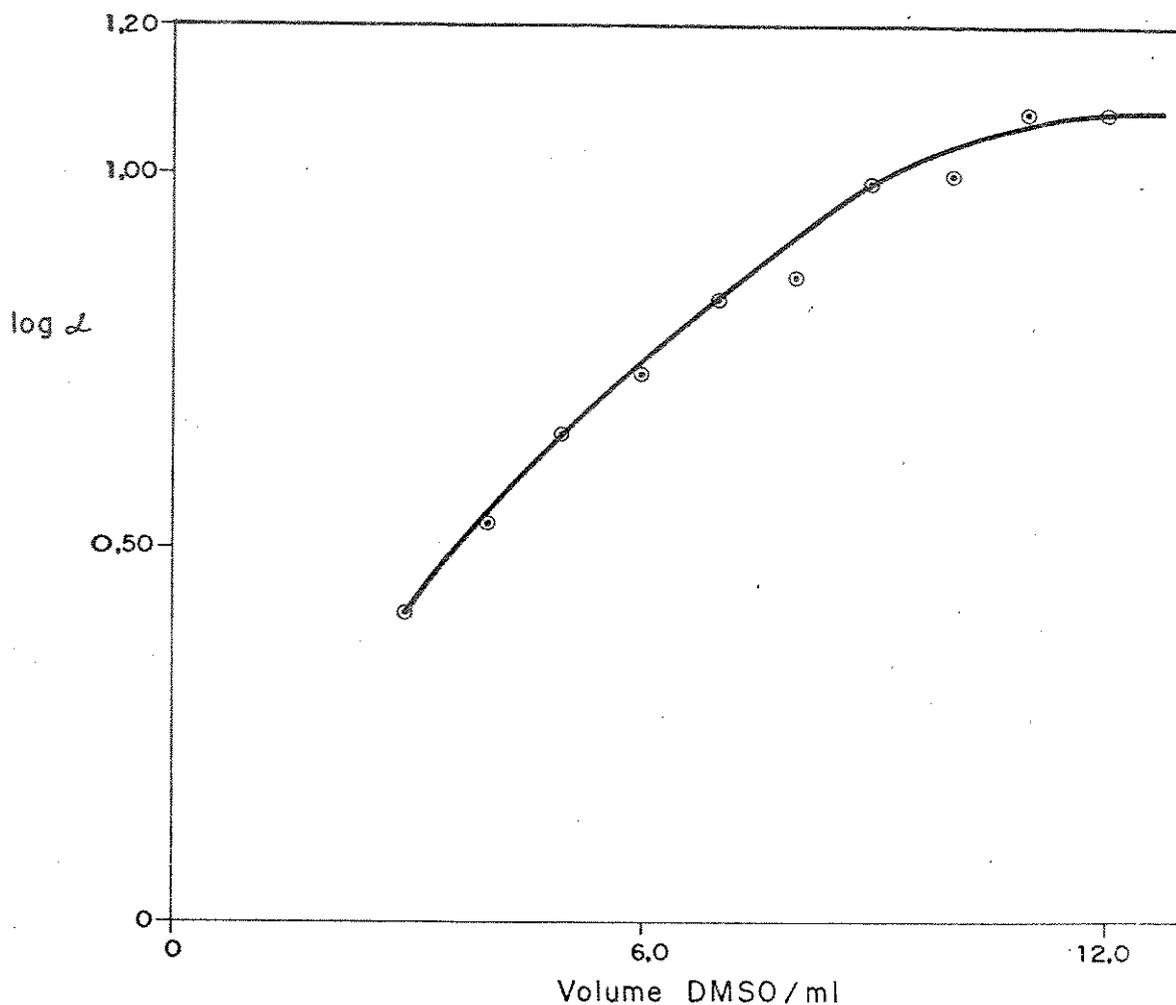


Figura 8. Determinação do volume ótimo de DMSO. Titulado: 2,00 ml de solução de ácido benzóico 0,100 M em DMSO-água 6:1 (V/V); titulante: solução de $(C_2H_5)_4NOH$ 0,092 M em DMSO-água 6:1 (V/V). Sistema solvente: DMSO (variável), H_2O (1,0 ml) e AN (4,0 ml)

DMSO constante, ou seja, em torno de 8,0 ml. Este valor corresponde ao volume ótimo de DMSO, pois nos forneceu o maior valor de α , que pode ser visto na figura 8. O volume de água é variável (de 0,25 a 2,00 ml). Os resultados obtidos estão na figura 9.

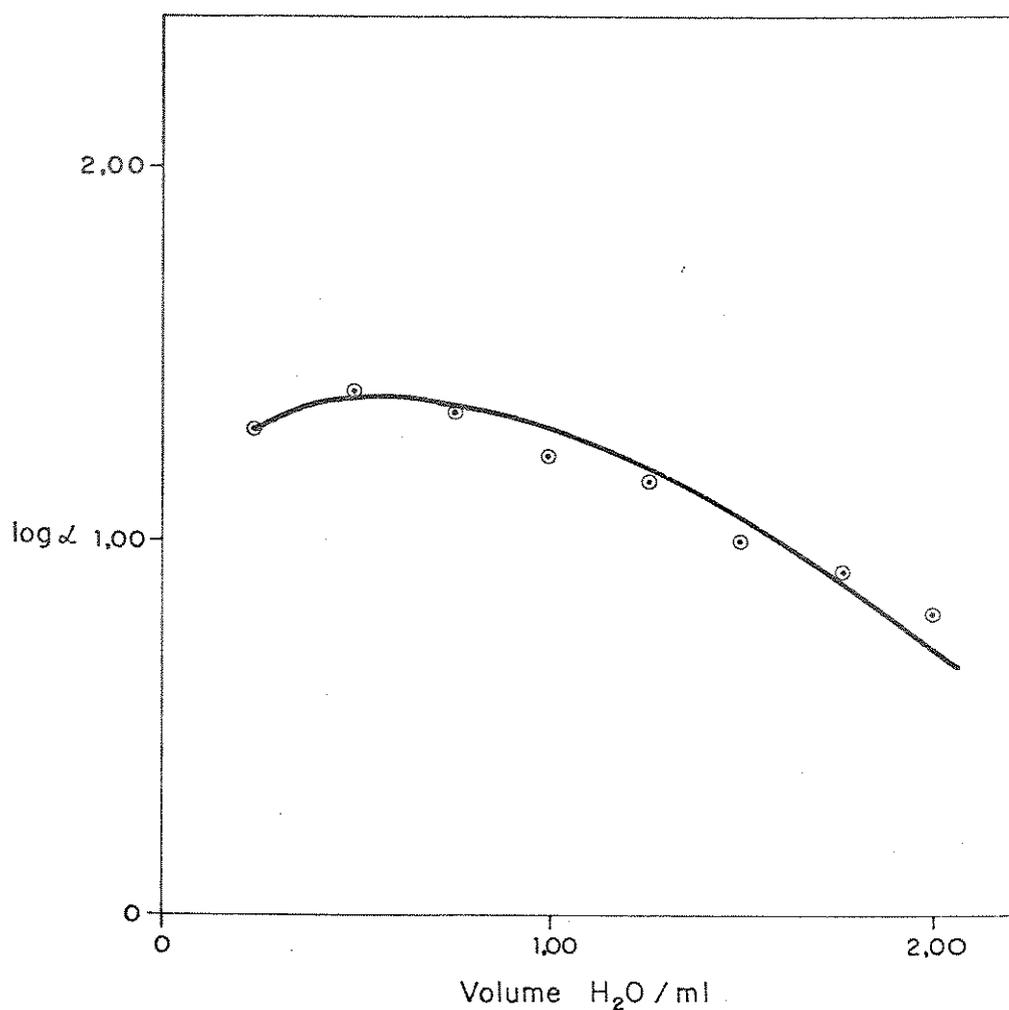


Figura 9. Determinação do volume ótimo de água. Titulado: 2,00 ml de solução ácido benzóico 0,100 M em DMSO-água 6:1 (V/V); titulante solução de $(C_2H_5)_4NOH$ 0,094 M em DMSO-água 6:1 (V/V). Sistema solvente: DMSO (8,0 ml), H_2O (variável), AN (4,0 ml).

IV.B.4.d. Determinação do volume ótimo de acrilonitrila

Greenhow e Dajer de Torrijos⁽⁷²⁾ utilizaram na titulação de ácido benzóico em meio DMSO, com n-butóxido de potássio em n-butanol, o volu-

me de 4,0 ml de acrilonitrila. Este sistema leva à obtenção de uma curva de titulação ideal. Na determinação dos volumes de DMSO e água no nosso sistema, como uma primeira aproximação, consideramos estes volumes como sendo ótimos. Entretanto, após obtermos as proporções ótimas de DMSO e água em 8:1 (V/V), como pode ser verificado pela análise das figuras 8 e 9, procedemos a verificação do volume ótimo de acrilonitrila. Para tanto, fixamos o meio de reação em 8:1 (V/V) de DMSO-água e variamos o volume de acrilonitrila (de 0,5 a 10,0 ml). Os resultados obtidos encontram-se na figura 10.

Os resultados destes estudos nos permitiu concluir que o melhor meio de reação, bem como o volume ótimo do indicador termométrico, é o seguinte: DMSO-água-AN 8:1:4 (V/V).

IV.B.4.e. Titulação termométrica catalítica

Com os titulantes mencionados na secção IV.B.3 e em meio DMSO-H₂O-AN 8:1:4 (V/V), acrescido de quantidades desejáveis de álcool, correspondente ao do meio do titulante, procedemos a titulação termométrica catalítica de amostras de 10 milimoles de ácido benzóico dissolvidas em DMSO:H₂O 8:1 (V/V), utilizando a aparelhagem descrita em IV.B.1.a. Os titulantes foram adicionados a uma velocidade constante de 0,2 ml/min.

Após o término da titulação, os meios foram acidificados com cerca de 0,5 ml de ácido acético glacial para inibir a reação catalítica.

Para a análise cromatográfica, levamos o meio de reação, após acidificado, a 25,0 ml com a mistura DMSO-H₂O 8:1 (V/V). Desta

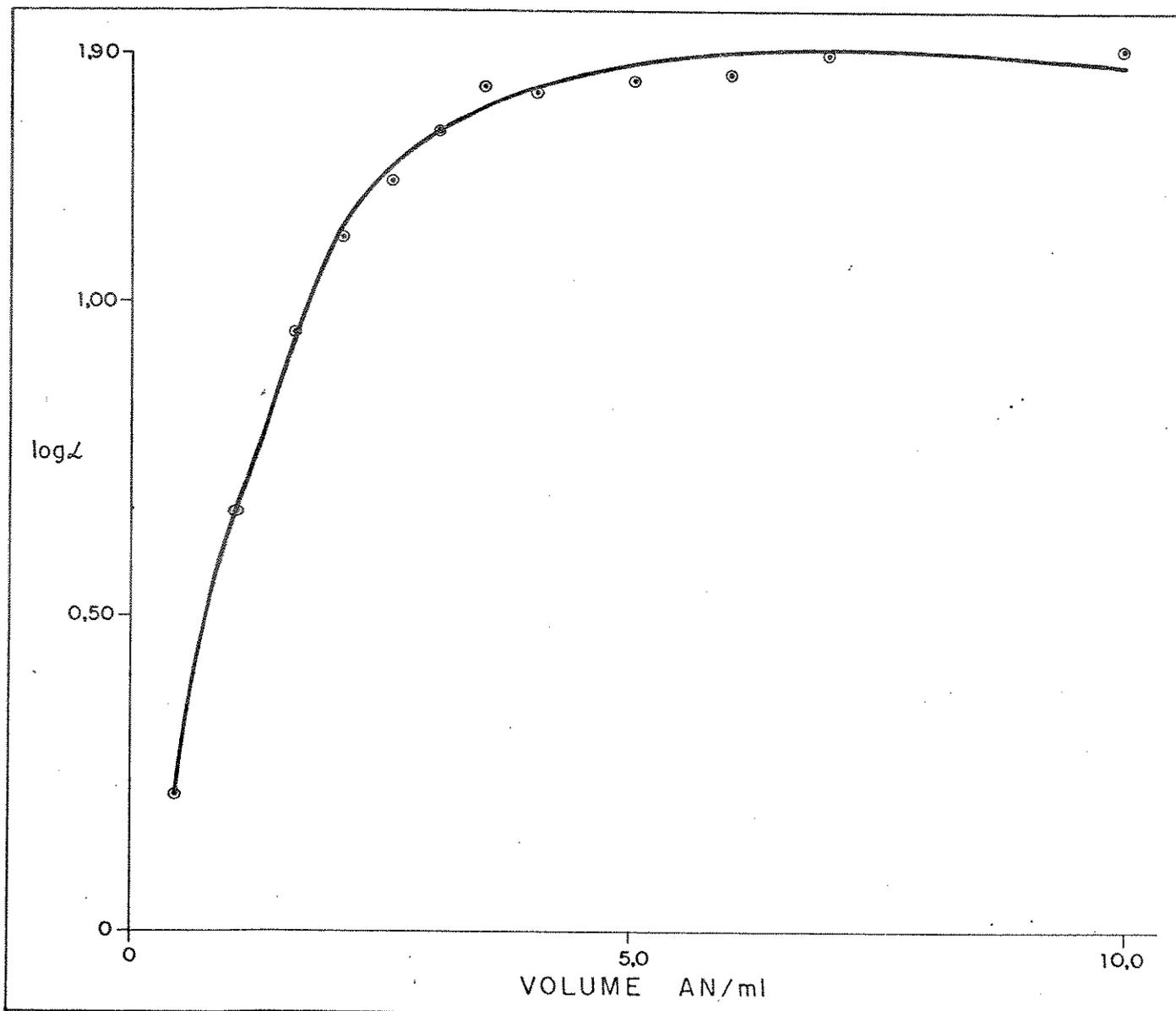


Figura 10. Determinação do volume ótimo de acrilonitrila. Titulado: 2,00 ml de solução de ácido benzóico 0,1000 M em DMSO-água 8:1 (V/V); titulante: solução de $(C_2H_5)_4NOH$ 0,087 M em DMSO-água 8:1 (V/V). Sistema solvente: DMSO (8,0 ml), H_2O (1,0 ml), AN (variável).

mistura tomamos 15,0 μl para a análise. Na identificação dos compostos por cromatografia a gás usamos o parâmetro tempo de reten-

ção (tr), comparando-se o tr de um padrão com o da amostra e o método de adição de padrão. Para determinações quantitativas, utilizamos curvas padrões e o método de adição de padrão. Cumpre-nos ressaltar que as soluções padrões para a elaboração das curvas padrões foram feitas da mesma forma que a solução da amostra.

IV.C. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns gráficos de titulação, relacionados com a titulação de ácido benzóico em meio DMSO-H₂O-AN 8:1:4 (V/V) com alguns dos titulantes utilizados são apresentados na figura 11.

A influência de diferentes quantidades de álcoois na curva de titulação, para diferentes titulantes, são mostradas nas figuras 12 a 18. Elas referem-se à titulação de ácido benzóico em mistura de DMSO-H₂O-AN 8:1:4 (V/V), com variadas quantidades de álcoois. O parâmetro α , obtido a partir dos gráficos de titulação, imediatamente após o ponto final, é graficado em função do volume de álcool adicionado, para cada titulante utilizado. Através destes gráficos, podemos notar que o efeito de adição de álcoois é mais evidente quando os titulantes são: hidróxido de potássio em DMSO-H₂O 8:1 (V/V) e 18-crown-6; hidróxido de tetraetilamônio em DMSO-H₂O 8:1 (V/V); sec-butóxido de potássio em sec-butanol e ter-butóxido de potássio em ter-butanol. Esses efeitos contudo são difíceis de serem observados quando os titulantes são hidróxido de potássio em n-propanol, iso-propanol e n-butanol. Porém, neste ponto é necessário lembrar que cerca de 1,0 ml de álcool ou DMSO-H₂O 8:1 (V/V) oriundo do titulante, está presente na mistura no ponto

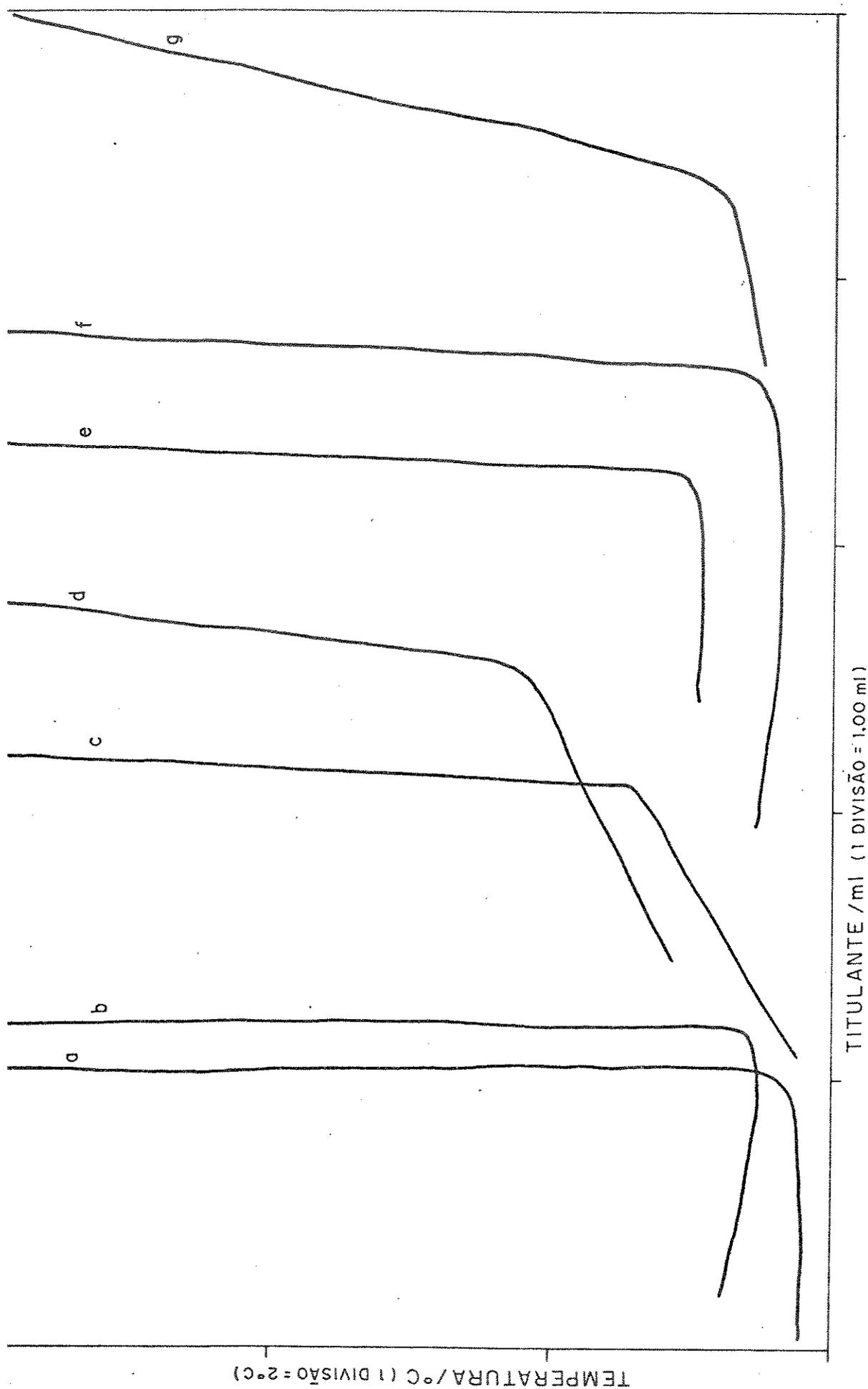


Figura 11. Curvas de T.T.C. de ácido benzóico com a) KOH 0,094 M em n-propanol; b) KOH 0,098 M em iso-propanol; c) $(C_2H_5)_4NOH$ 0,098 M em DMSO:H₂O 8:1 (V/V); d) KOH 0,087 M em DMSO:H₂O 8:1 (V/V) com 18-crown-6; e) n-butóxido de potássio 0,108 M em n-butanol; f) sec-butóxido de potássio em sec-butanol; g) ter-butóxido de potássio 0,116 M em ter-butanol.

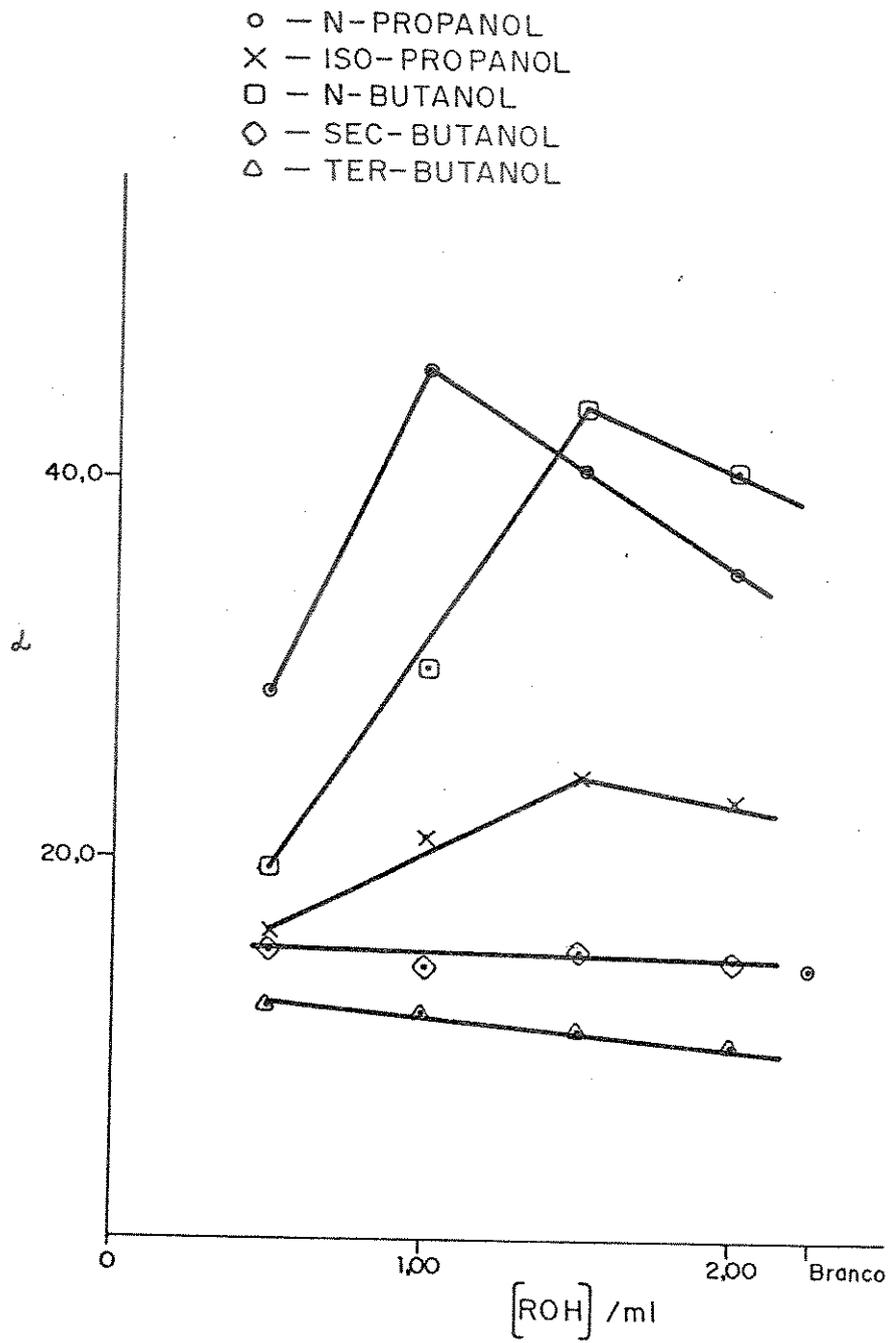


Figura 12. Titulante: solução de KOH 0,087 M solubilizado em DMSO:H₂O 8:1 (V/V) com 18-crown-6.

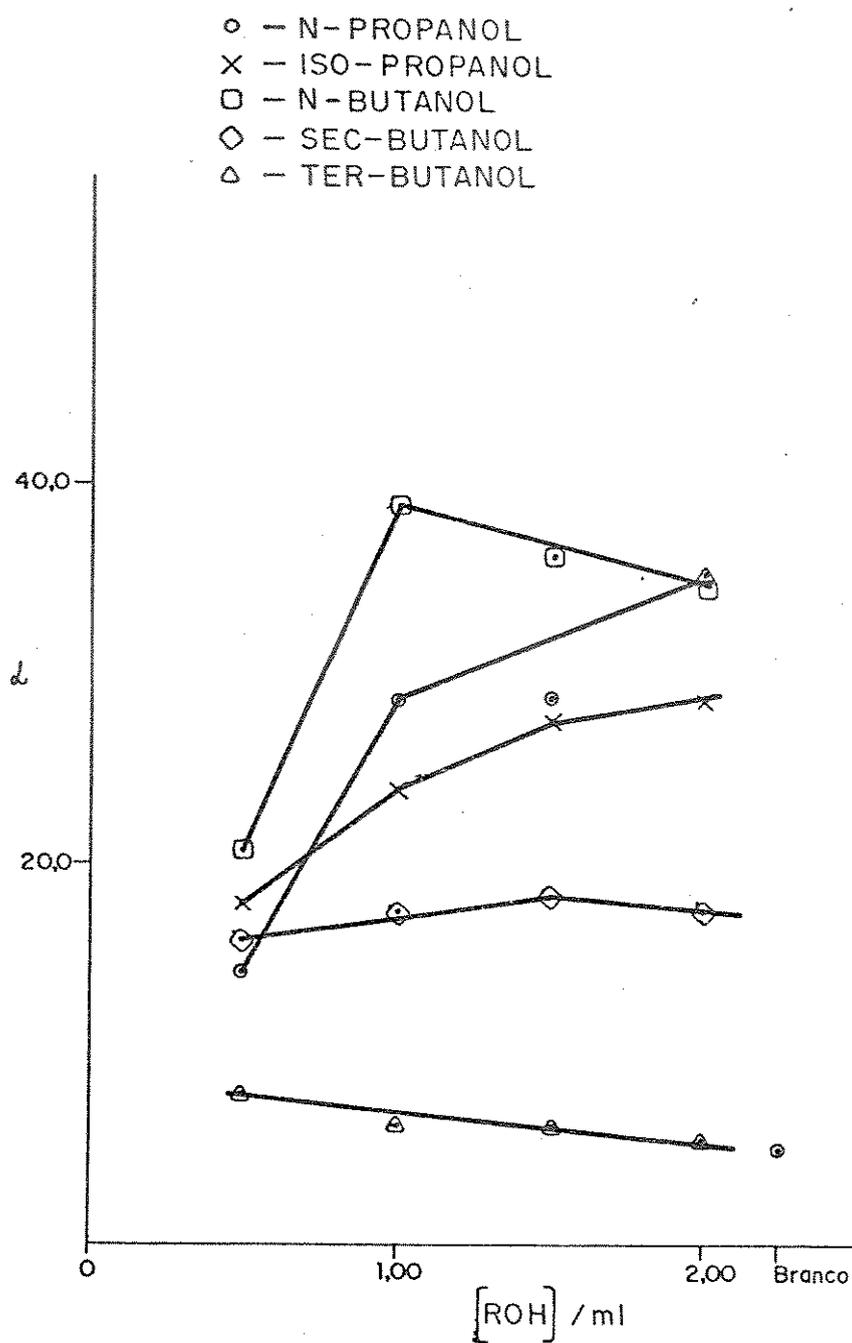


Figura 13. Titulante: solução de $(C_2H_5)_4NOH$ 0,101 M em $DMSO:H_2O$ 8:1 (V/V).

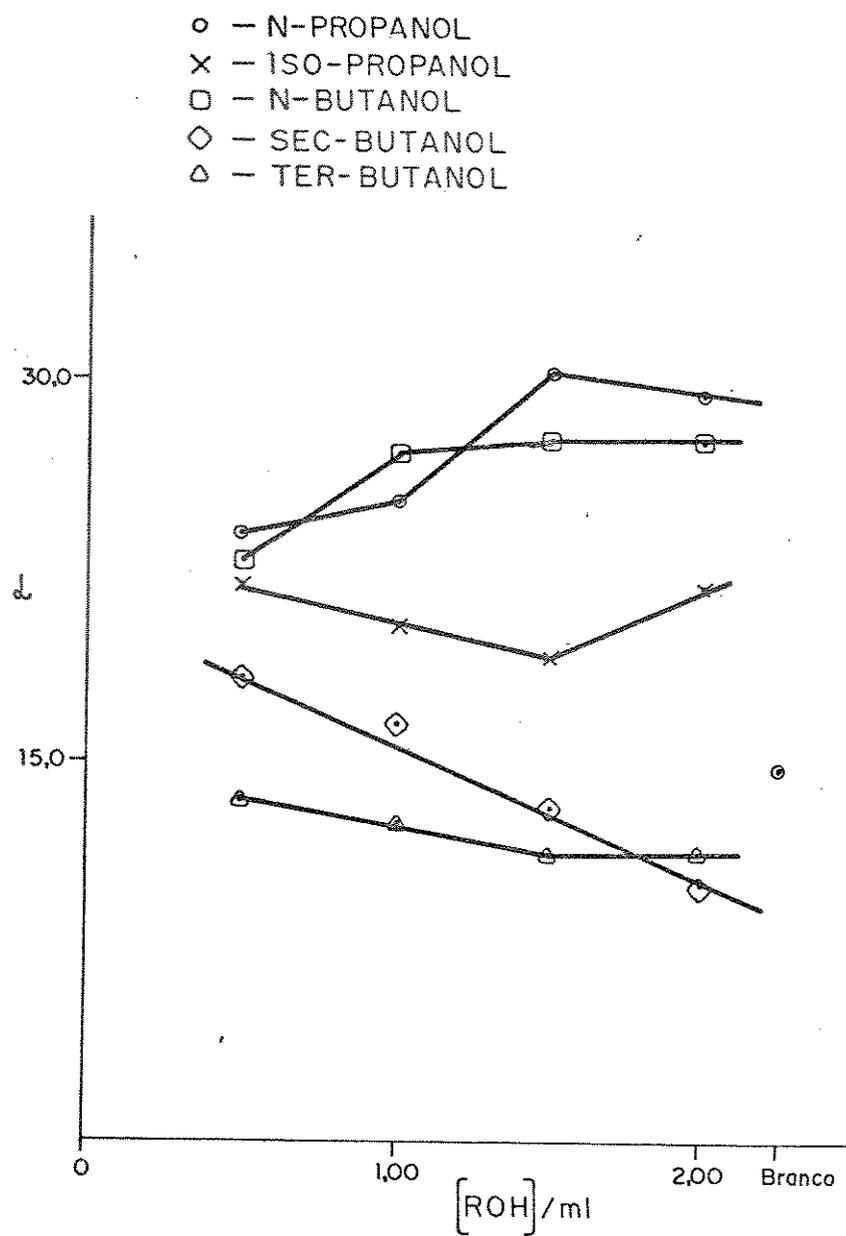


Figura 14. Titulante: solução de sec-butóxido de potássio 0,062 M em sec-butanol.

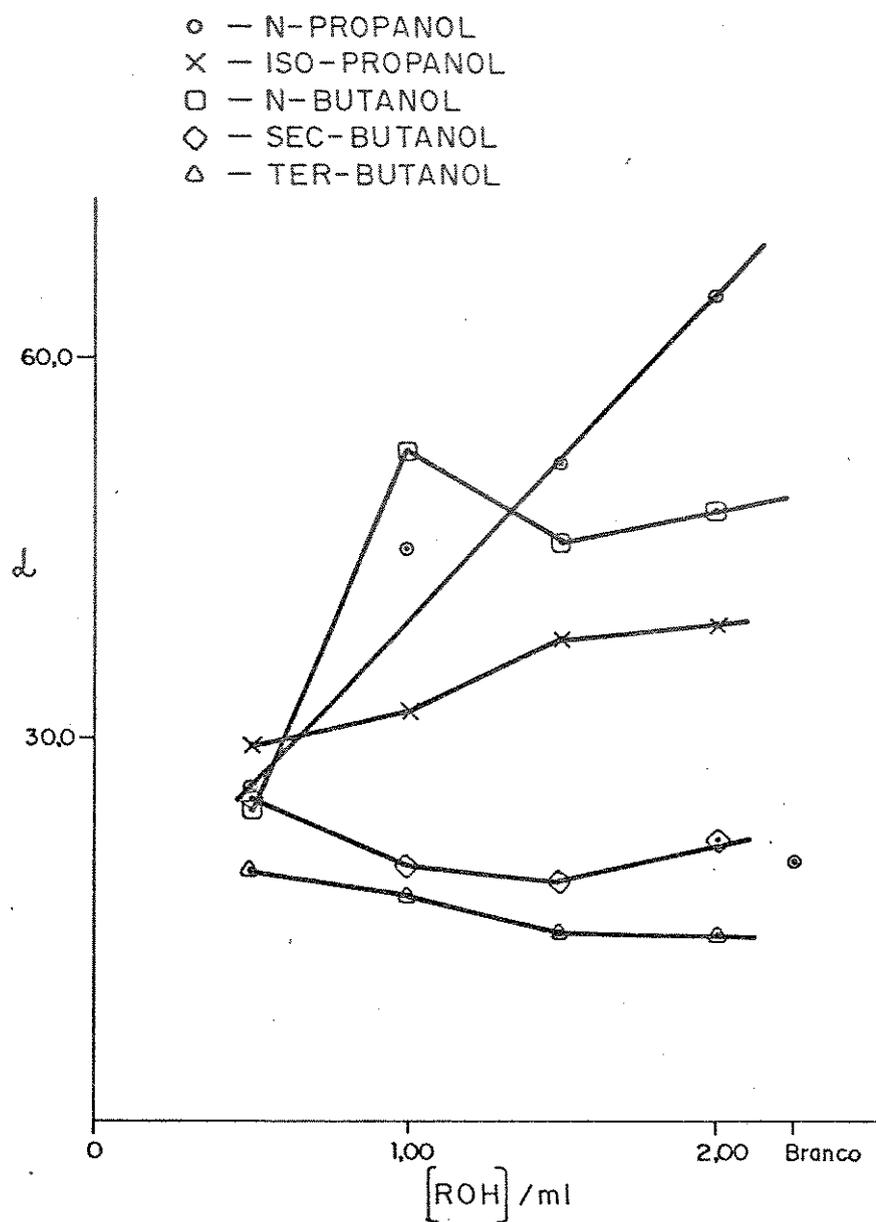


Figura 15. Titulante: solução de ter-butóxido de potássio 0,116 M em ter-butanol.

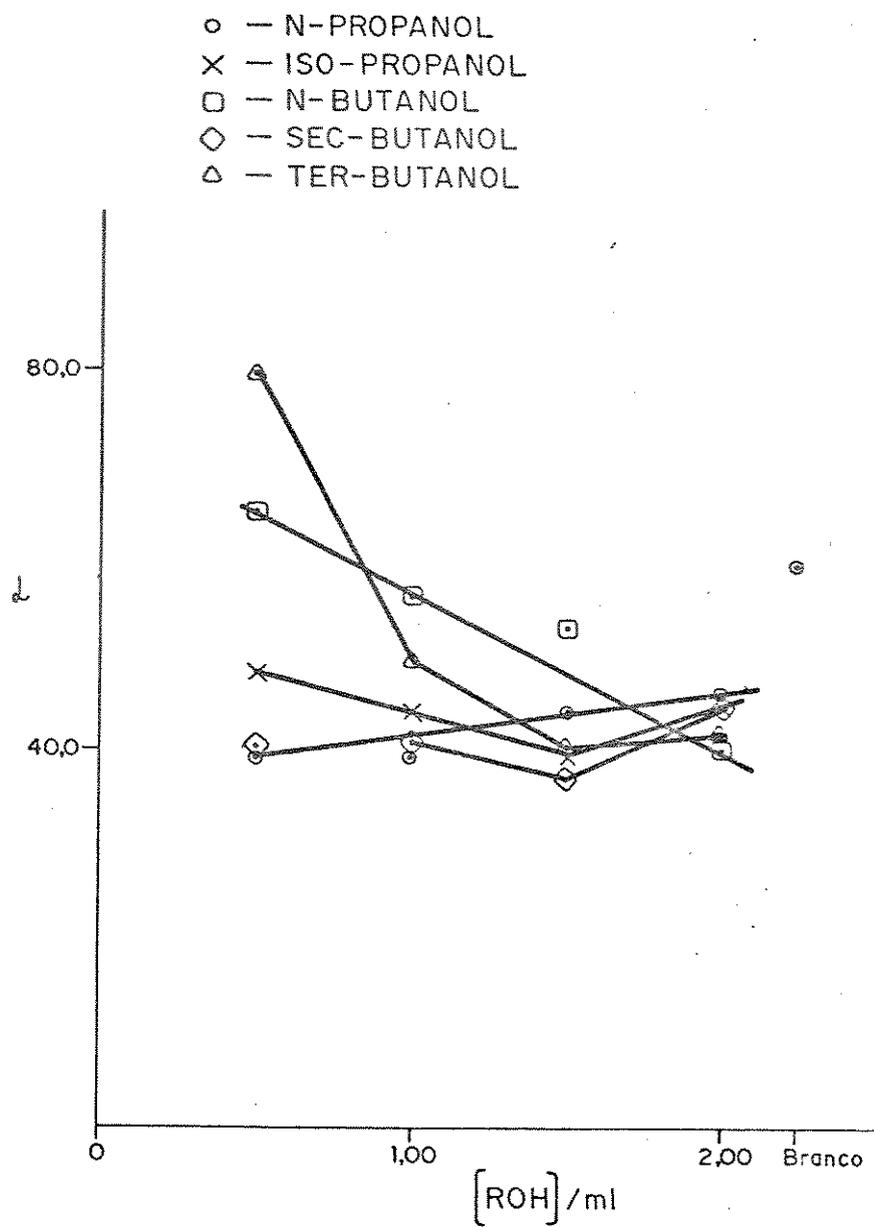


Figura 16. Titulante: solução de KOH 0,094 M em n-propanol.

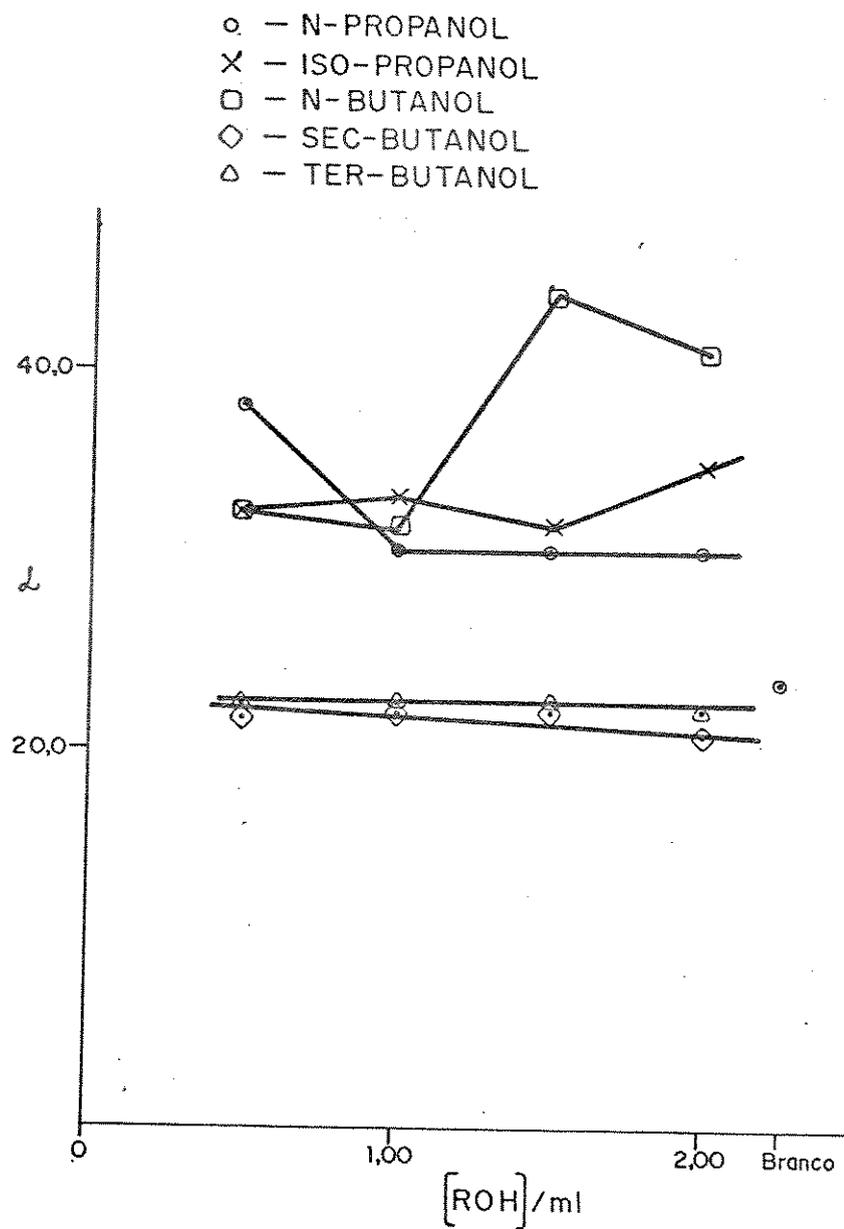


Figura 17. Titulante: solução de KOH 0,098 M em iso-propanol.

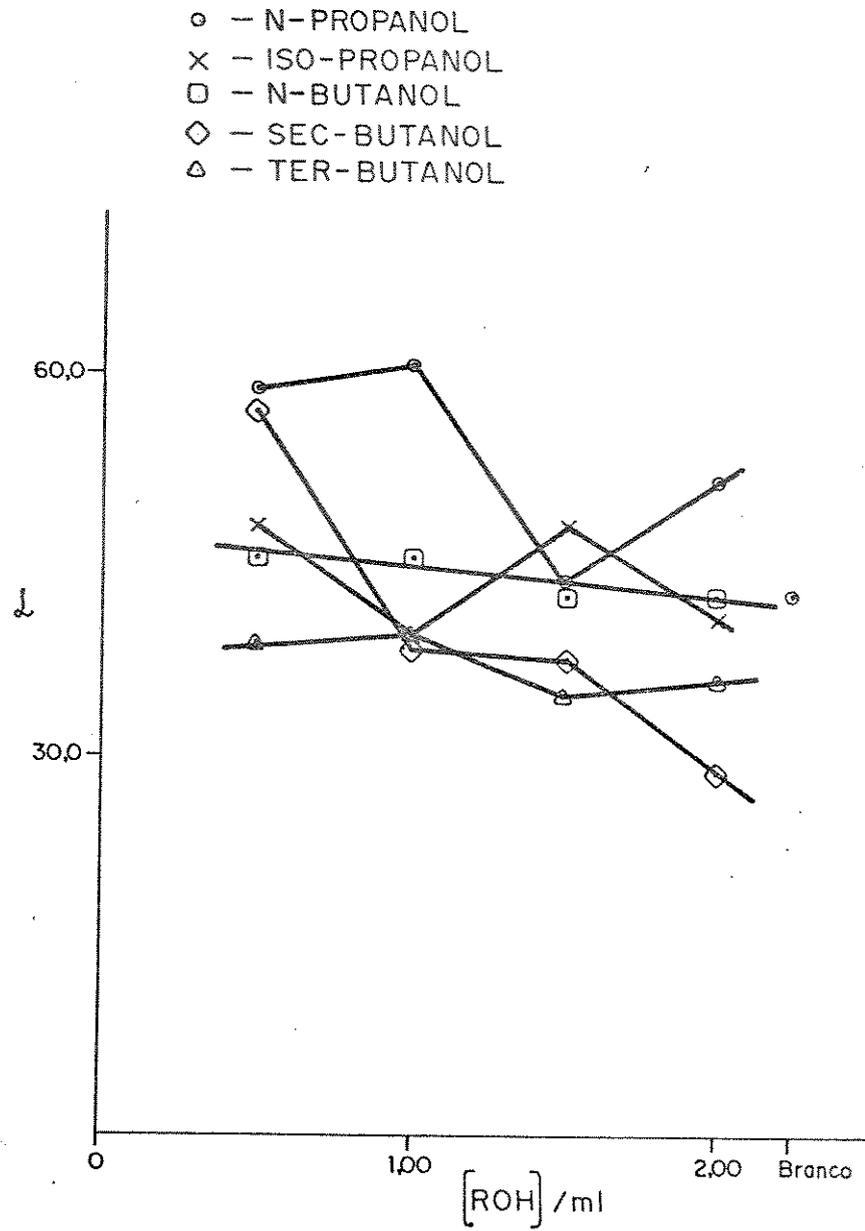


Figura 18. Titulante: solução de KOH 0,108 M em n-butanol.

final da titulação. Sendo assim, o solvente oriundo do titulante apresenta por ele mesmo um efeito importante na reação indicativa do ponto final e, neste caso, a influência do álcool adicionado torna-se menos importante. Isto vem indicar que os álcoois n-propanol, iso-propanol e n-butanol apresentam um efeito mais positivo na forma do gráfico de titulação que os outros álcoois estudados. Estas observações estão em concordância com o que foi concluído por Greenhow e Dajer de Torrijos⁽⁷²⁾, quando estudaram este mesmo tipo de reação em meio puramente orgânico, no qual concluíram que a reação de cianoetilação é mais importante para a indicação do ponto final quando estão presente álcoois primários e secundários. Em nosso caso, onde a água está presente, e também pode sofrer reação de cianoetilação, a reação de cianoetilação dos álcoois é a mais importante para a indicação do ponto final, quando temos n-propanol, iso-propanol e n-butanol presente no meio de reação ou adicionado pelo titulante, o que pode ser confirmado quando comparamos a influência dos diferentes álcoois nas figuras 12, 13, 14 e 15. A ordem sequencial pela qual os álcoois apresentam um efeito positivo no valor de α (coeficiente angular), tende a ser a seguinte: $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH} \approx n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH} > \text{iso-C}_3\text{H}_7\text{OH} > \text{sec-C}_4\text{H}_9\text{OH} > \text{ter-C}_4\text{H}_9\text{OH}$.

Considerando o fato de que em alguns casos temos inversão da ordem acima, ou valores próximos, podemos computar isto às incertezas devidas à determinação do valor α , mas em geral a ordem acima tende a ser observada.

Inicialmente, pensou-se que a velocidade da reação de cianoetilação dos álcoois era em parte devida à diminuição da constante dielétrica (ϵ) dos mesmos. Entretanto, Feit e Zilkha⁽⁷³⁾

demonstraram que o aumento de velocidade de cianoetilação com os diferentes álcoois é muito maior que a requerida pela diminuição da constante dielétrica, fato este que se torna claro ao compararmos a velocidade de cianoetilação de dois álcoois que têm constante dielétrica próxima, (iso-propanol $\epsilon = 18,3$ e n-butanol $\epsilon = 17,1$), cujas velocidades de cianoetilação são completamente diferentes, ou seja, $17,249$ e $5,749 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente. Conclui-se que a basicidade do ânion alcóxido é o fator mais importante na velocidade de cianoetilação.

De acordo com Feit e Zilkha⁽⁷³⁾ e Zilkha et alii⁽⁷⁴⁾ a atividade catalítica do alcóxi na cianoetilação aumenta com o aumento da sua basicidade, visto que a mesma depende da acidez do átomo de hidrogênio, da hidroxila do álcool, ou seja, álcoois mais ácidos dão alcóxidos menos básicos e, portanto, fracos catalisadores. Logo é evidente que a atividade catalítica dos alcóxidos de metais alcalinos na reação de cianoetilação aumenta na seguinte ordem: $\text{CH}_3\text{O}^- > \text{n-C}_3\text{H}_7\text{O}^- \approx \text{n-C}_4\text{H}_9\text{O}^- > \text{iso-C}_3\text{H}_7\text{O}^- > \text{sec-C}_4\text{H}_9\text{O}^- > \text{ter-C}_4\text{H}_9\text{O}^-$.

Por outro lado, a acidez dos álcoois correspondentes aumenta na ordem inversa. Nossos resultados estão de acordo com esta ordem e também com os resultados observados em meio puramente orgânico⁽⁷²⁾.

Os álcoois sec-butanol e ter-butanol tendem a apresentar um pequeno mas adverso efeito nos gráficos da curva de titulação, embora o efeito do ter-butanol tende a ser maior. Isto é coerente com o fato de que ter-butanol não sofre cianoetilação na temperatura do processo. Em contrapartida, o sec-butanol, apesar de ser um álcool relativamente ácido, apresenta uma pequena tendência em so-

frer cianoetilação.

Os resultados obtidos por cromatografia a gás das misturas, após o ponto final das titulações, vem contribuir com as conclusões a que chegamos a partir dos dados obtidos com os gráficos das titulações termométricas. Estes resultados encontram-se listados na tabela 11.

Tabela 11. Resultados das análises cromatográficas

Titulante	C _{AN} in. /g	C _{ROH} in. /g	C _{AN} fin. /g	C _{ROH} fin. /g	Produtos /g
A	3,18	0,80 ^a	2,52	0,15	1,23 ⁽¹⁾
B	3,18	0,75 ^b	2,53	0,16	1,12 ⁽²⁾
C	3,18	0,93 ^c	3,11	0,80	0,18 ⁽³⁾
D	3,18	-	2,18	-	(5)
E	3,18	1,16 ^d	2,73	0,53	1,08 ^{(4) (5)}
F	3,18	0,82 ^e	1,23	0,80	(5)

A - solução de KOH 0,1180 M em n-C₃H₇OH; ^a n-C₃H₇OH; ⁽¹⁾ β-n-propóxi propionitrila; B - solução de KOH 0,1243 M em iso-C₃H₇OH; ^b iso-C₃H₇OH; ⁽²⁾ β-iso-propóxi propionitrila; C - solução de n-C₄H₉OK 0,1470 M em n-C₄H₉OH; ^c n-C₄H₉OH; ⁽³⁾ β-n-butóxi propionitrila; D - solução de KOH 0,1281 M e 18-crown-6 em DMSO:H₂O 8:1 (V/V); ⁽⁵⁾ bis(dicianoetil)éter; E - solução de sec-C₄H₉OK 0,1104 M em sec-C₄H₉OH; ^d sec-C₄H₉OH; ⁽⁴⁾ β-sec-butóxi propionitrila; F - solução de ter-C₄H₉OK 0,1322 M em ter-C₄H₉OH; ^e ter-C₄H₉OH.

Alguns cromatogramas mostrando as separações obtidas são apresentados nas figuras 19, 20, 21 e 22.

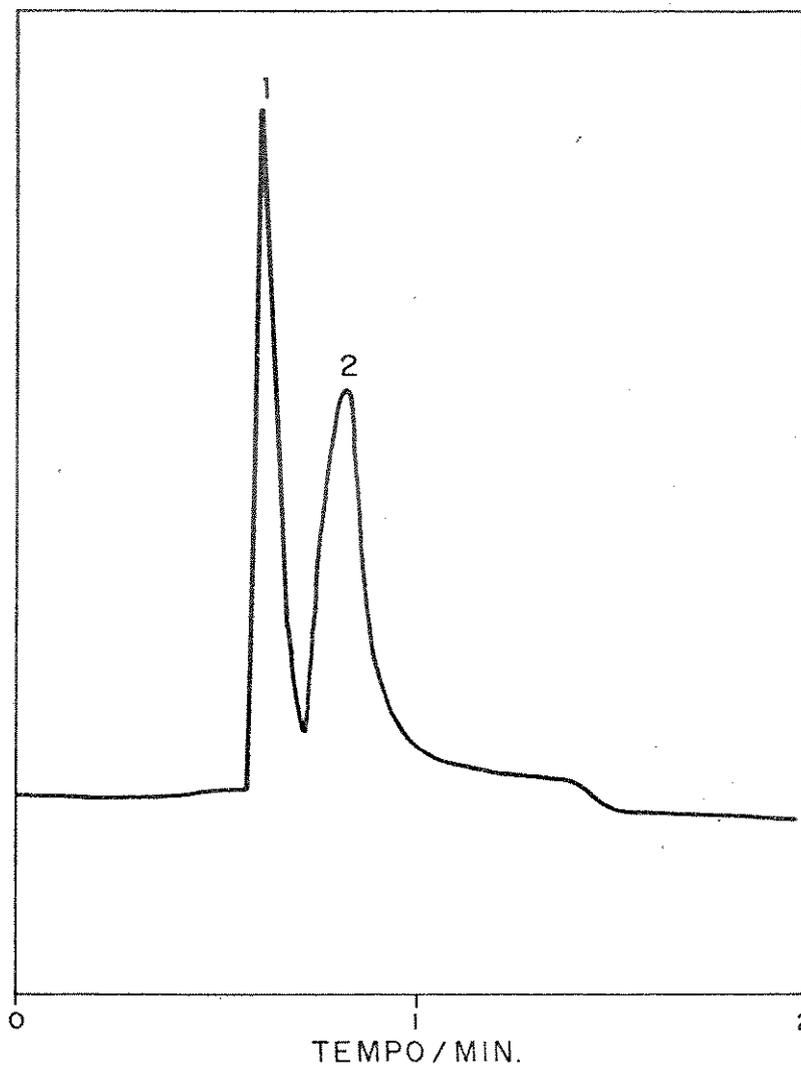


Figura 19. Cromatograma mostrando a separação da acrilonitrila e do sec-butanol. Coluna: FFAP 3% sobre Varaport 30, $t_{\text{coluna}} = 90^{\circ}\text{C}$. Pico 1 = acrilonitrila; pico 2 = sec-butanol. Detector: condutividade térmica. $I_{\text{filamento}} = 150 \text{ mA}$; sensibilidade = 500 mV; $t_{\text{injetor}} = 140^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{detector}} = 210^{\circ}\text{C}$.

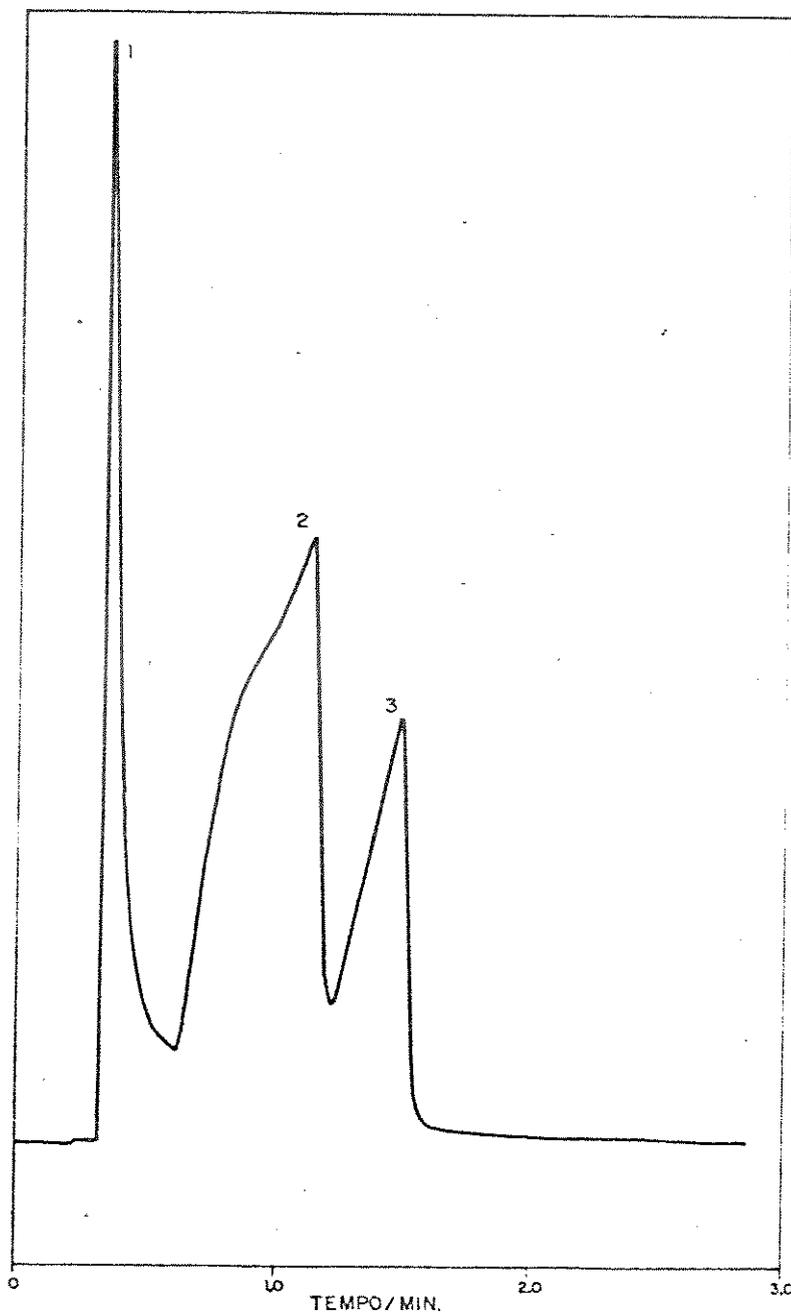


Figura 20. Cromatograma obtido com o meio de titulação quando o titulante é o sec-butóxido de potássio em sec-butanol. Coluna OV-17 3% sobre Chromosorb-G 100 mesh; $t_{\text{coluna}} = 190^{\circ}\text{C}$; pico 1 = acrilonitrila e sec-butanol; pico 2 = dimetilssulfóxido; pico 3 = β -sec-butóxi-propionitrila. Detector: condutividade térmica.

$I_{\text{filamento}} = 150 \text{ mA}$; sensibilidade = 200 mV;

$t_{\text{injetor}} = 240^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{detector}} = 250^{\circ}\text{C}$.

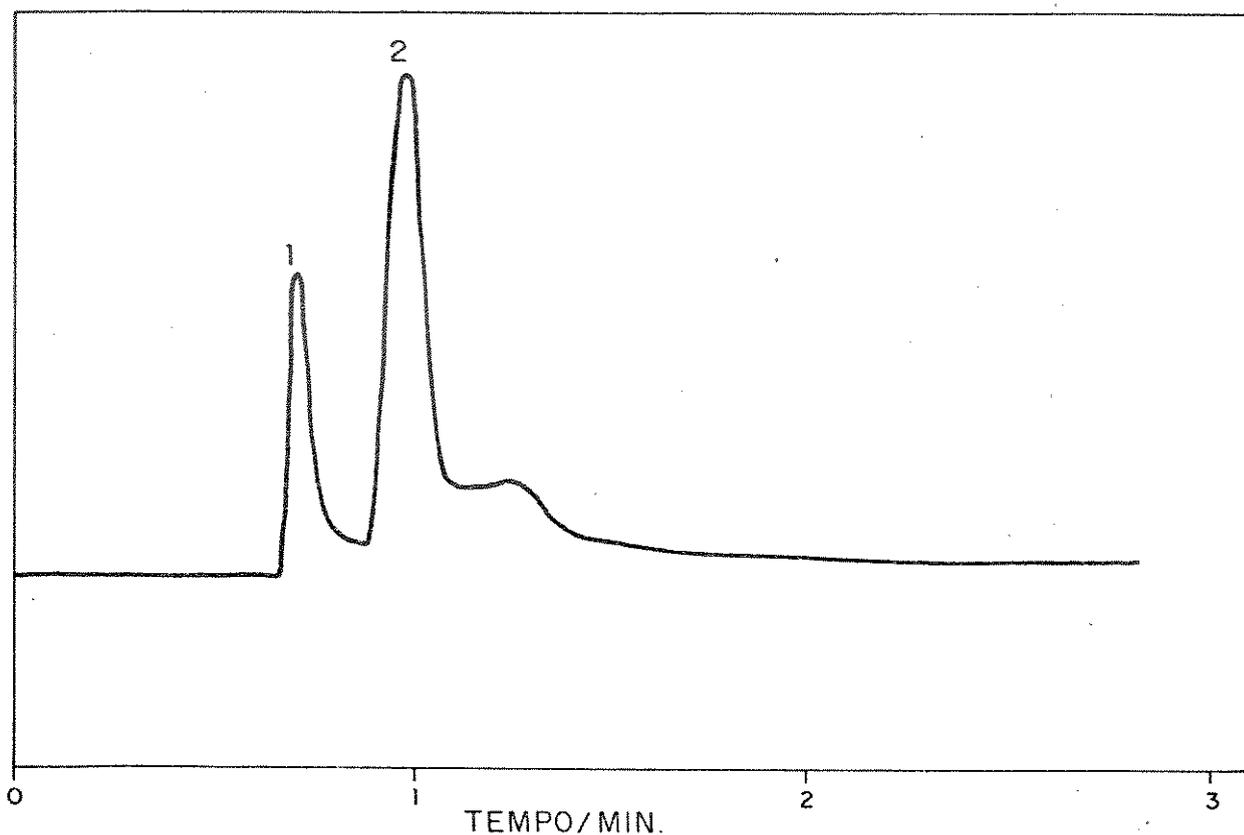


Figura 21. Cromatograma mostrando a separação da acrilonitrila do n-propanol. Coluna: FFAP 3% sobre Varapot 30; $t_{\text{coluna}} = 90^{\circ}\text{C}$; pico 1 = acrilonitrila; pico 2 = n-propanol.

Detector: condutividade térmica.

$I_{\text{filamento}} = 150 \text{ mA}$; sensibilidade = 500 mV;

$t_{\text{detector}} = 250^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{injetor}} = 140^{\circ}\text{C}$

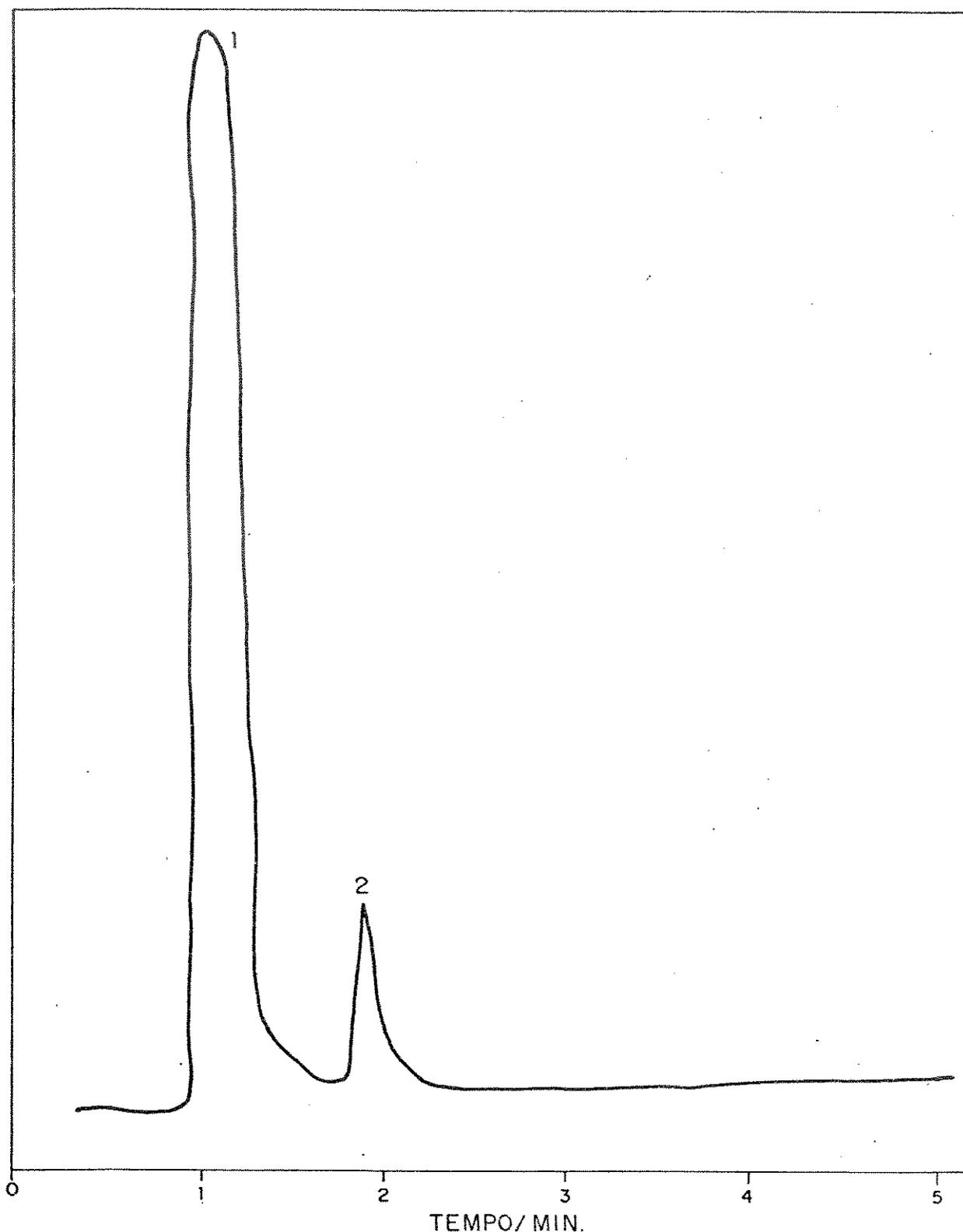
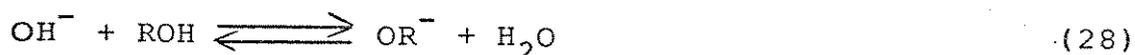


Figura 22. Cromatograma obtido com o meio de titulação quando o titulante é ter-butóxido de potássio em ter-butanol. Coluna: OV-17 3% sobre Chromosorb-G 100 mesh, $t_{\text{coluna}} = 230^{\circ}\text{C}$. Pico 1 = mistura de solventes; pico 2 = bis(di-cianoetil)éter. Detector: condutividade térmica. Ifilamento = 150 mA; $t_{\text{injeto}} = 240^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{detector}} = 250^{\circ}\text{C}$; sensibilidade = 500 mV.

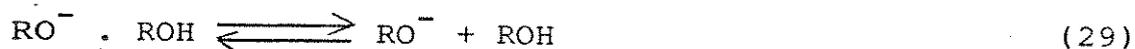
No caso da presença dos álcoois n-propanol, n-butanol e iso-propanol, os seus produtos de cianoetilação foram caracterizados. Em ausência dos outros álcoois ou em presença do ter-butanol, o produto de cianoetilação da água foi caracterizado. Um fato interessante é o do sec-butanol em que os produtos de cianoetilação do álcool e o da água foram caracterizados. Isto vem a confirmar a pequena tendência deste álcool de sofrer cianoetilação, mas também que a tendência da água cianoetilar deve ser da ordem do sec-butanol. Nos meios em que foi possível a quantificação do derivado cianoetilado, sua quantidade é coerente com a de acrilonitrila gasta. Isto nos leva a concluir que a polimerização da acrilonitrila não é importante na determinação do ponto final da titulação neste meio.

Os efeitos dos titulantes e do meio de reação na cianoetilação podem ser explicados em termos de solvatação de:

a) íons alcóxido ou hidróxido do titulante; solução de hidróxido em álcool apresenta o seguinte equilíbrio⁽⁷⁵⁾:



Solução de alcóxido em álcool apresenta o seguinte equilíbrio:



A solvatação por álcool reduz a reatividade dos íons alcóxidos ou hidróxidos, reduzindo com isto a velocidade da reação de cianoetilação. Em presença de solvente dipolar aprótico, temos

um aumento da quantidade de ânions livres (pouco solvatados) e com isso temos um aumento na velocidade da reação, devido também ao fato de que na reação de cianoetilação dos álcoois, temos um ataque nucleofílico na molécula da acrilonitrila, e solventes dipolares apróticos aumentam a nucleofilicidade pelo fato de que os ânions, nesta categoria de solvente, estão pouco solvatados o que leva a um aumento da velocidade de reação.

b) da acrilonitrila

A solvatação da acrilonitrila pelo álcool aumenta a sua eletrofilicidade e consequentemente a reatividade do seu carbono β



aumentando portanto a velocidade de cianoetilação.

Como podemos notar esses dois efeitos são opostos e consequentemente há uma dependência da natureza e da concentração do álcool.

IV.D. CONCLUSÃO

Através do estudo da reação de cianoetilação em meio DMSO-água 8:1 (V/V), podemos concluir que:

a) A reação mais importante para a indicação do ponto final, de titulação efetuada neste meio, é a de cianoetilação dos álcoois.

b) Em meio em que não é possível a cianoetilação do ál-

cool, como ocorre com o ter-butanol, pois este álcool não sofre cianoetilação à temperatura ambiente, e na ausência de outro álcool, a reação de cianoetilação da água é a que predomina para a indicação do ponto final.

c) Quando temos o sec-butanol adicionado ao meio, ou quando este é adicionado juntamente com o titulante, duas reações são importantes para a determinação do ponto final, as quais são: a cianoetilação do sec-butanol e a da água.

d) A eficiência dos alcóxidos como titulante diminui com o aumento da acidez do álcool que o originou.

e) Este método permitiu a escolha de um meio de reação e um titulante adequado, para obtermos gráficos de titulação bem favoráveis, os quais podem ser vistos na figura 23.

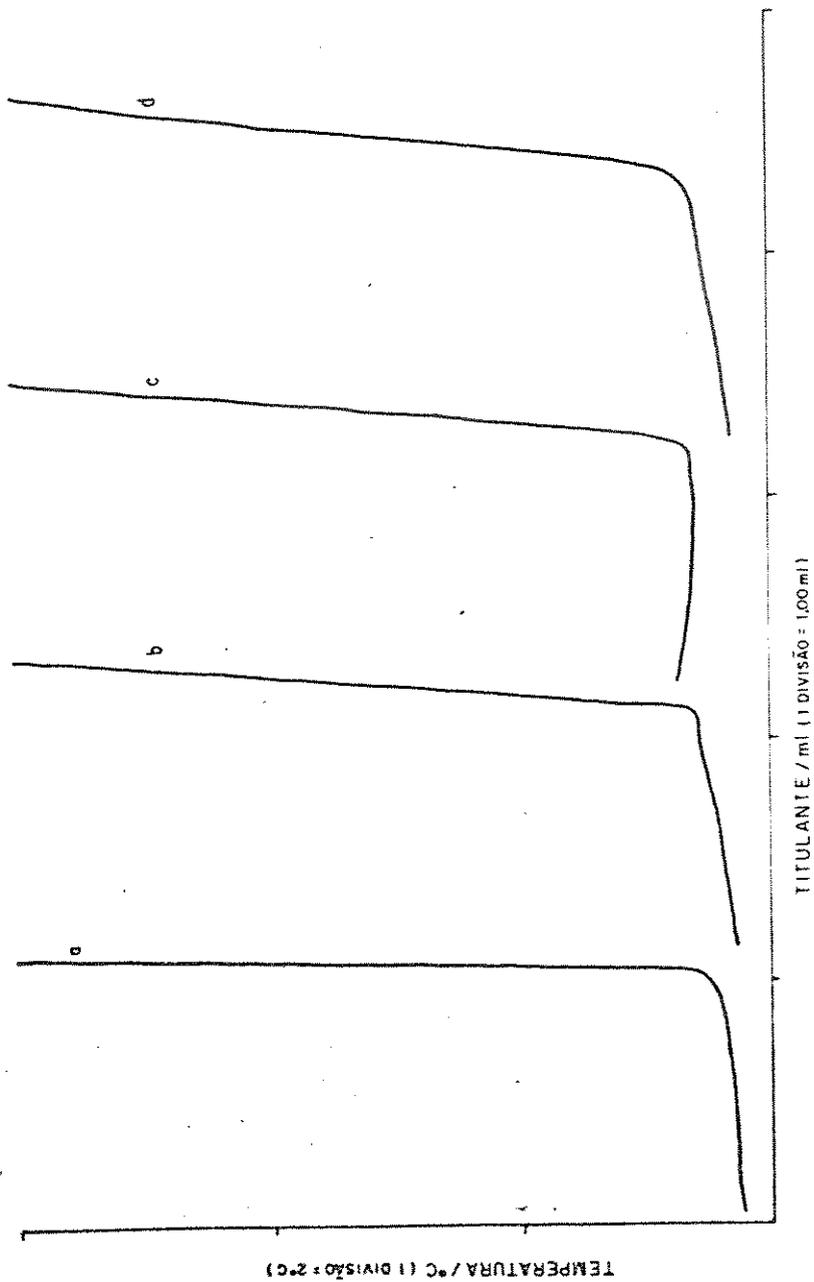


Figura 23. Curvas ideais de titulação. Titulado: 12,4 mg de ácido benzóico. Meio de titulação e titulante: a) I,A; b) II,A; c) I,B; d) III,B. I = 9 ml da mistura de DMSO-H₂O 8:1 (V/V), 4 ml de AN. II = 9 ml da mistura DMSO-H₂O 8:1 (V/V), 4 ml de AN e 0,5 ml de n-butanol; III = 9 ml da mistura DMSO:H₂O 8:1 (V/V), 4 ml de AN e 1,5 ml de n-butanol. A = solução de KOH 0,094 M em n-propanol; B = solução de KOH 0,098 M em iso-propanol.

CAPÍTULO V

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

V.A. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Um procedimento para a titulação termométrica de aminoácidos foi desenvolvido por Chattergi e Ghosh⁽⁷⁶⁾. Nesse trabalho, soluções aquosas de glicina, alanina, ácido glutâmico e aspártico são titulados por titulação termométrica com hidróxido de sódio, individualmente ou em misturas binárias. Eatough et alii⁽⁷⁷⁾ utilizaram a titulação calorimétrica para a titulação de insulina em meio aquoso com hidróxido de sódio e mostraram que a técnica constitui um instrumento eficiente, para dar informações a respeito da química ácido-base de proteínas. Smith e Carr⁽⁷⁸⁾ utilizaram a técnica de titulação termométrica para a determinação das soro proteínas totais e também para a determinação de albumina do soro bovino. Jordan e Jesfersen⁽⁷⁹⁾ utilizaram a técnica de titulação termométrica para a titulação da albumina do ovo, sob a forma protonada, com a solução de hidróxido de sódio.

As citações acima constituem exemplos de aplicação da titulação termométrica convencional na titulação de aminoácidos e proteínas. Tratando-se de titulação termométrica catalítica, aplicado à determinação de aminoácidos e proteínas, poucos trabalhos têm sido publicados. Cumpre-nos ressaltar a pesquisa desenvolvida por Greenhow e Spencer⁽⁸⁰⁾, na qual utilizaram a polimerização catiônica de 2-fenilpropeno catalisada por ácido perclórico, para indicar o ponto final da titulação de aminoácidos em meio 1-2-dicloroetano com ácido perclórico 0,1 M.

Em outro trabalho, Greenhow e Shafi⁽⁸¹⁾ usaram a T.T.C. em meio DMSO:AN 2:1 (V/V), utilizando como titulante a solução de hidróxido de potássio 0,5 M em iso-propanol para a titulação de aminoácidos mais precisamente glicina, cisteína e valina, em um sistema solvente constituído pela solução aquosa do aminoácido (0,1 mmol), 4 ml de DMSO e 2 ml de AN.

No presente trabalho a T.T.C. também será usada na determinação dos aminoácidos, arginina e histidina, ambos na forma de cloridrato, e na titulação de grupos ácidos das proteínas, tripsina e mioglobina, empregamos um solvente misto, do tipo água: DMSO (solvente dipolar aprótico).

Como método comparativo utilizamos a titulação potenciométrica, em meio DMSO:H₂O de acordo com que foi proposto por Georgieva et alii⁽⁸²⁾.

Os aminoácidos são unidades fundamentais das proteínas⁽⁸³⁾ O primeiro descoberto foi a asparagina em 1806 e o último foi a treonina, o qual foi identificado em 1938.

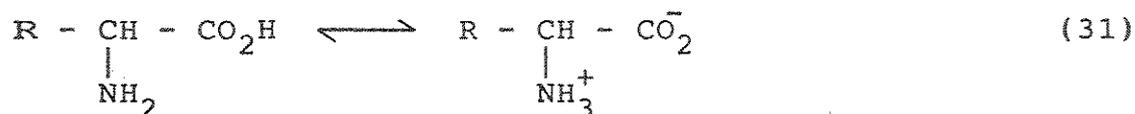
Todos os vinte aminoácidos encontrados em proteínas têm em comum um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono. Eles diferem um do outro por suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água. Os vinte aminoácidos de proteínas são frequentemente referidos como aminoácidos padrões, primários ou normais, para distinguí-los de outros tipos de aminoácidos, presentes em organismos vivos mas não em proteínas.

Em função do grupamento R os aminoácidos podem ser classificados em quatro tipos:

a) Grupos R não polares

- b) Grupos R polares não carregados
- c) Grupos R carregados negativamente
- d) Grupos R carregados positivamente

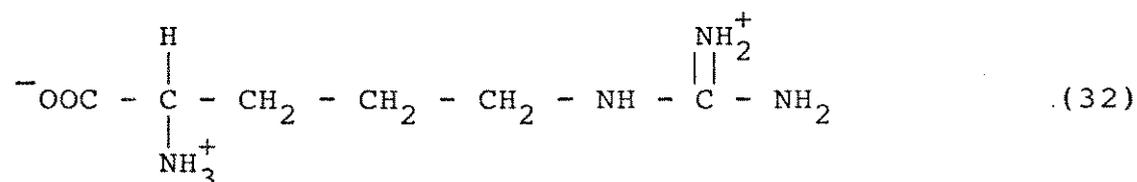
Os aminoácidos são anfólitos e apresentam-se como íons duplos como segue:



São sólidos de alto ponto de fusão, que devido aos dois grupos polares devem ser insolúveis em solventes orgânicos apolares e solúveis em água.

A arginina e a histidina possuem o Grupo R com carga líquida positiva a pH 7.

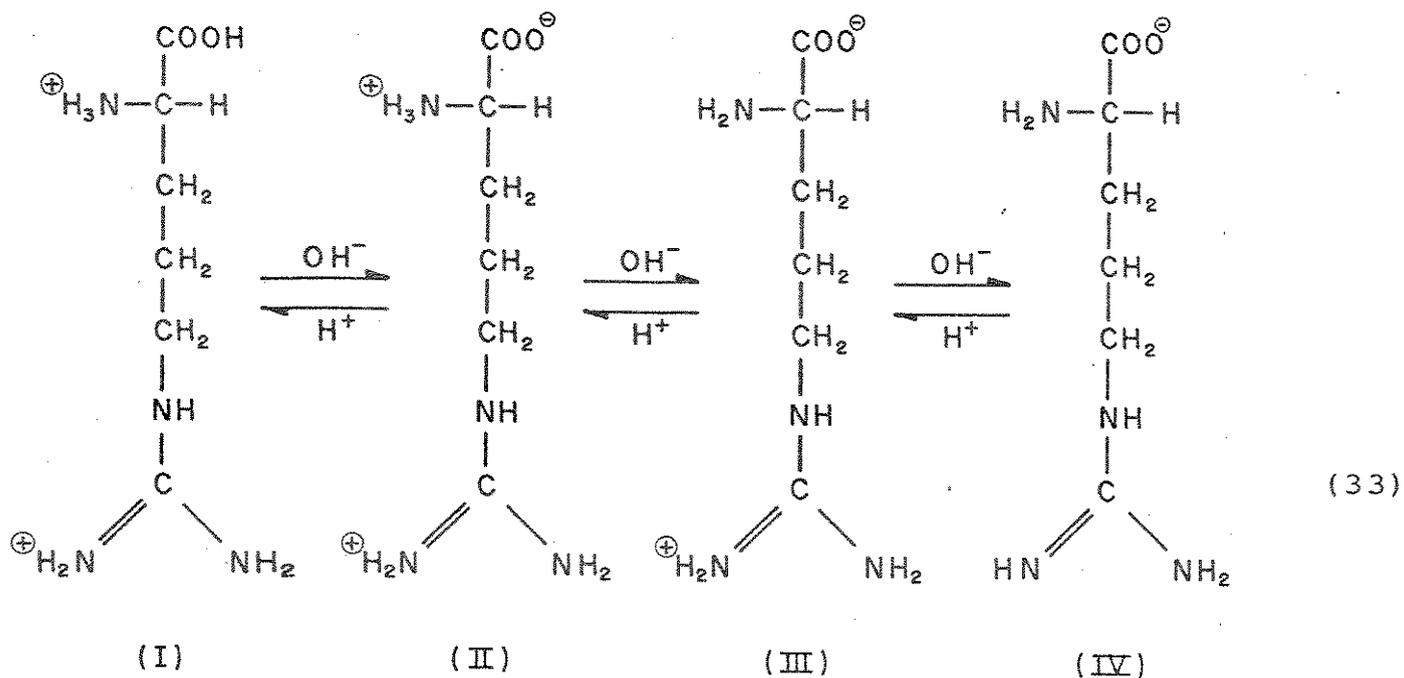
A arginina ou ácido- α -amino- δ -guanidínico-n-valérico, símbolo Arg. apresenta um grupo guanidínico carregado positivamente.



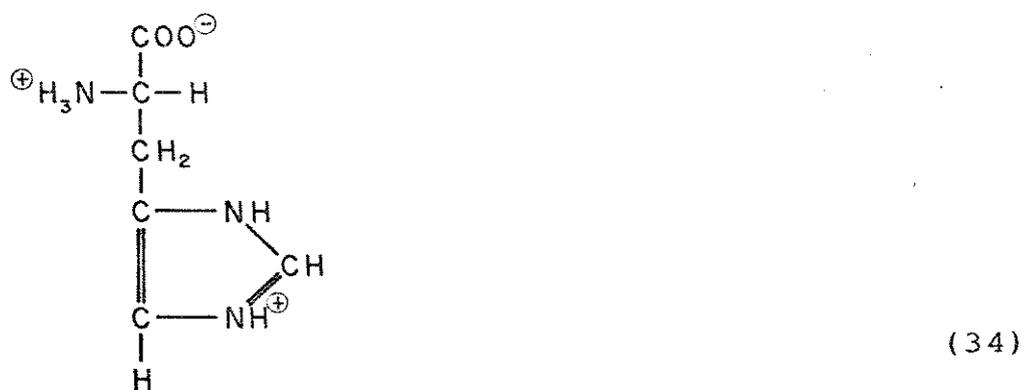
Arginina hidrofílica

Apresenta os seguintes valores de pka para os seus grupos: $\text{pk}_1' (-\text{COOH}) = 2,17$; $\text{pk}_2' (-\text{NH}_3^+) = 9,04$; $\text{pk}_3' (\text{grupo R}) = 12,48$.

Neste caso é necessário considerar os seguintes equilíbrios, sendo que a forma (III) é a isoelétrica. Note-se que o grupo guanidínico apresenta um pka = 12,48 que é um valor bastante alto.



A histidina ou ácido α -amino- β -imidazol propiônico, símbolo HyS, contém o grupo imidazol que se ioniza fracamente.

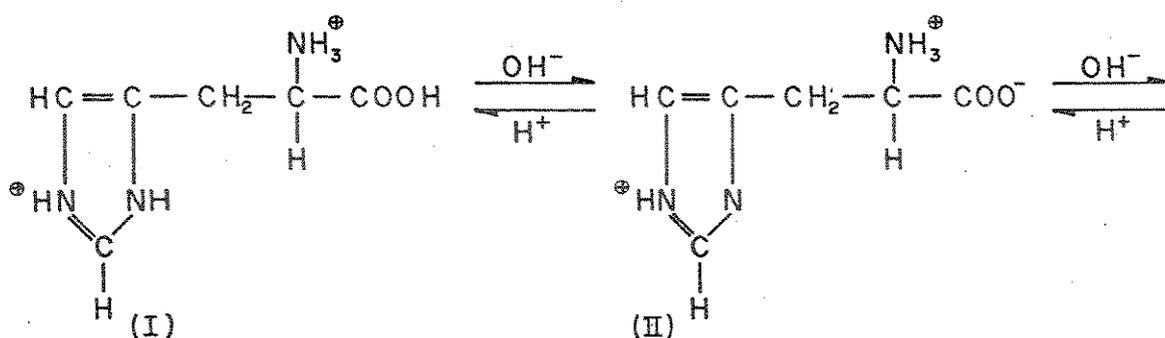


HISTIDINA HIDROFÍLICA

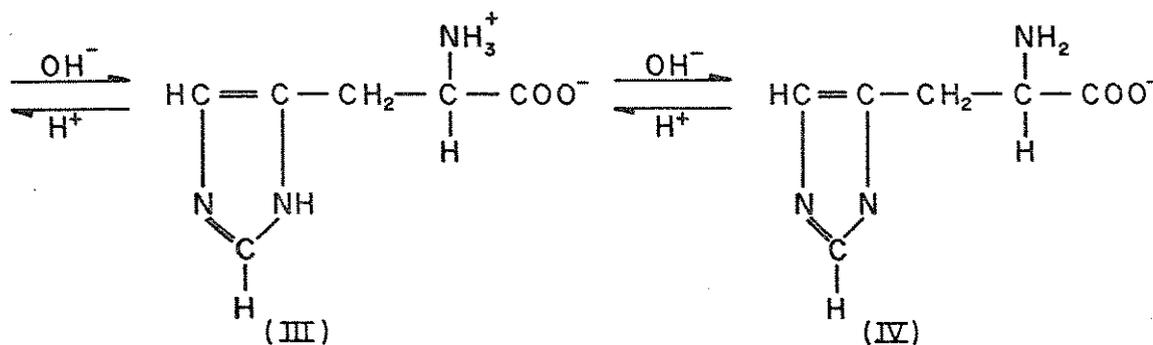
Apresenta os seguintes valores de pka para os seus gru-

pos: pk_1^1 ($-\text{COOH}$) = 1,82; pk_2^1 ($-\text{NH}_3^+$) = 9,17; pk_3^1 (grupo R) = 6,00.

Neste caso tem-se os seguintes equilíbrios, sendo que a forma (III) é a isoelétrica. Note-se que o grupo imidazólico apresenta um $pka = 6,00$, que é mais baixo que o grupo amino ($pka = 9,17$).



(35)



As proteínas podem ser classificadas em função da sua forma, solubilidade e composição química em:

a) Proteínas fibrosas - constituem de moléculas alongadas que podem ser formadas por várias cadeias polipeptídicas, em espiral firmemente ligadas. São insolúveis em água.

b) Proteínas globulares - apresentam cadeias polipeptí-

dicas dobradas sobre si mesmas de maneira compacta, resultando em esferóides. Geralmente são solúveis em água, ou em meio aquoso contendo sais, ácidos e bases, são solúveis também em meio misto constituído por água e etanol.

As proteínas mais variadas e altamente especializadas são aquelas com atividade catalítica, que são as enzimas. Quase todas as reações químicas envolvendo biomoléculas orgânicas nas células são catalisadas por enzimas.

A tripsina é uma protease, secretada pelas células acinosas pancreáticas sob a forma de proenzima, inativa, o tripsinogênio. No intestino o tripsinogênio é ativado pela enteroquinase, convertendo-se em tripsina. Esta transformação ocorre a um pH ótimo situado na faixa de 6 a 9.

A ativação ulterior depende de autocatálise no pH de 7 a 8, sendo acelerada pelos íons cálcio e outros alcalinos terrosos. A ativação implica na separação de um peptídeo ácido da molécula de tripsinogênio. A tripsina atua de maneira ideal no pH de 8 a 9 como endopeptidase e hidrolisa praticamente todos os tipos de proteínas, entre elas várias que são poupadas pela pepsina. Da mesma maneira que esta última, digere as proteínas desnaturadas e parcialmente digeridas, com maior rapidez que as originais, desdobrando-se em polipeptídeos de peso variável e alguns aminoácidos. Supõe-se que atua principalmente nas ligações peptídicas das quais participa o grupo carboxila da arginina ou lisina. A tripsina é uma enzima proteolítica, portanto catalisa as reações de transaminação e transesterificação. Apresenta massa molecular relativa de 24.000 (tripsina do pâncreas bovino) tem um grupo aminoterminal conferido pela isoleucina e possui seis ligações S-S.

A mioglobina é uma proteína relativamente pequena, com massa molecular relativa de 16.700, captadora de oxigênio e encontrada em células musculares. Sua função é armazenar oxigênio a ela ligado e ativar o seu transporte para a mitocôndria, a qual consome oxigênio durante a oxidação dos nutrientes celulares.

Kendrew⁽⁸⁴⁾, através de estudos de difração de raio-X, deduziu a estrutura tridimensional da mioglobina. A mioglobina contém uma só cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos de sequência já conhecida e um grupo de ferroporfirina, ou grupo heme, idêntico ao da hemoglobina, a proteína captadora de oxigênio das células vermelhas do sangue. O grupo heme é o responsável pela intensa cor vermelha da hemoglobina e da mioglobina. É particularmente abundante nos músculos dos mamíferos marinhos como a baleia, a foca e o golfinho.

O esqueleto da molécula de mioglobina é constituído por 8 segmentos, relativamente retos, interrompidos por curvaturas. Cada segmento reto constitui de porções em α -hélice, o maior contendo 23 resíduos de aminoácidos e o menor apenas 7. Todos os segmentos em α -hélice têm orientação à direita. Quase oitenta por cento dos aminoácidos da molécula de mioglobina estão nas regiões de α -hélice.

Outras conclusões importantes foram obtidas, com base nos dados obtidos por difração de raio-X⁽⁸⁴⁾, como se segue:

a) A molécula de mioglobina é tão compacta que no seu interior existe espaço para apenas quatro moléculas de água.

b) À exceção de dois, todos os grupos R polares da cadeia da mioglobina estão localizados nas superfícies externa da molécula e todos eles estão hidratados.

c) A maioria dos grupos R hidrofóbicos estão no interior da molécula de mioglobina, não sendo possível sua exposição à água.

d) Cada um dos quatro resíduos de prolina da mioglobina ocorrem em uma curva. Outras curvas ou dobras contém resíduos de serina, treonina e asparagina, os quais estão entre os aminoácidos que tendem a ser incompatíveis com a α -hélice quando em íntima justaposição.

e) Todas as ligações peptídicas estão em configuração coplanar trans.

f) O grupo heme plano localiza-se em uma fenda ou bolsa da moléculas de mioglobina. O átomo de ferro, no centro de grupo heme, tem duas valências de coordenação que são perpendiculares ao plano do grupo heme.

Um dos grandes problemas envolvidos na titulação termométrica de aminoácidos e proteínas é a sua baixa solubilidade em solventes orgânicos. Entretanto, quando usamos a mistura água e solvente orgânico a solubilidade é aumentada, contudo o aumento da proporção de água no sistema solvente apresenta um efeito adverso nas curvas de titulação. Este assunto já foi tratado anteriormente.

Godinho e Greenhow⁽⁸⁵⁾ estabeleceram qual é a melhor condição para a titulação de aminoácidos e grupos ácidos de proteínas, através do estudo do parâmetro α (logaritmo do coeficiente angular da curva de titulação após o ponto final) e da estequiometria da reação determinativa para avaliar a performance da titulação de aminoácidos e proteínas, quando se variava a proporção de água e solvente dipolar aprótico. Através deste estudo, ficou estabelecido que a melhor mistura de solventes é a constituída

por água:DMSO 0,8:7 (V/V) e o melhor volume de acrilonitrila é o que é obtido quando temos 4 ml presentes no sistema. Desta forma o sistema solvente utilizado para a titulação termométrica catalítica de aminoácidos e proteínas foi estabelecido como sendo o seguinte: DMSO:H₂O:AN 7:0,8:4 (V/V). Apesar da adição de água ao solvente orgânico facilitar a solubilização, existem algumas substâncias que permanecem parcialmente solúveis no meio em questão, como é o caso da mioglobina. Entretanto, optamos pelo não aumento da proporção de água, pois o aumento da mesma irá provocar um decréscimo do valor de α , o que inviabiliza em parte a T.T.C.

Cumpre-se ressaltar que as mesmas titulações foram realizadas potenciometricamente para fins de comparação. Neste caso usou-se o mesmo titulante e a mesma mistura de solventes no titulado, com exceção da presença de acrilonitrila.

V.B. PARTE EXPERIMENTAL

V.B.1. Aparelhagem

As titulações potenciométricas, que foram utilizadas como método comparativo, foram realizadas em um béquer de 100 ml, com junção líquida. Foi utilizado um eletrodo de vidro "Beckmann" modelo 39000 como indicador e o eletrodo de calomelano "Beckmann", como referência.

De acordo com o proposto por Georgieva et alii⁽⁸²⁾, o eletrodo de vidro foi mergulhado na mistura de solvente DMSO:H₂O, 7:0,8 (V/V) por cerca de 20 minutos antes de utilizá-lo. A junção entre as soluções teste e de referência é feita por um tubo em U.

A composição do solvente na junção é DMSO:H₂O 1:1 (V/V) e cloreto de potássio 10⁻³ M. O potencial da cela foi medido com um potenciômetro "Orion" modelo 701, com uma incerteza de ± 1 mV. O sinal também foi derivado, utilizando um derivador por nós construído e registrado em registrador potenciométrico ECB "Equipamentos Científicos do Brasil" modelo RB-101.

Nas titulações termométrica e potenciométrica de tripsina, mioglobina, L(+)monocloridrato de histidina e monocloridrato de arginina o titulante foi adicionado por meio de uma seringa de vidro, marca "Omega" com a capacidade de 20,0 ml, acoplada ao equipamento "Syringe Pump 351" da Sage Instruments. Utilizamos respectivamente as vazões nominais de 0,2 e 1,5 ml/min, cujo valor de calibração é igual a 0,199 ± 0,002 e 1,502 ± 0,003 ml/min, respectivamente.

V.B.2. Reagentes Utilizados

- Hidróxido de potássio R.P.E. "Carlo Erba"
- Iso-propanol P.A. "Baker"
- Dimetilssulfóxido P.A. "Merck"
- Acrilonitrila P.A. "Merck"
- L(+)monocloridrato de histidina R.P.E. "Carlo Erba"
- Monocloridrato de arginina "Sigma"
- Mioglobina "Sigma"
- Tripsina "Sigma"
- Ácido clorídrico R.P.E. "Carlo Erba"
- Cloreto de potássio P.A. "Merck"

Utilizamos a solução de hidróxido de potássio 0,1 M em iso-propanol, preparada e padronizada conforme descrito em IV.B.3.

V.B.3. Procedimento

Fizemos titulações termométricas catalíticas e potenciométricas dos seguintes aminoácidos: cloridrato de arginina e cloridrato de histidina e das seguintes proteínas: mioglobina e tripsina em meio DMSO:H₂O:AN, na proporção de 7:0,8:4 (V/V). Apesar deste sistema solvente favorecer a solubilização destas substâncias, a mioglobina é parcialmente solúvel neste meio, porém existe uma influência da ordem de adição dos solventes utilizados na sua solubilização, que será discutida a posteriori.

Para a titulação termométrica catalítica do cloridrato de arginina, cloridrato de histidina, mioglobina e tripsina em geral o seguinte procedimento foi adotado: cerca de 25 mg da substância foram pesados, colocados no frasco Dewar não espelhado e dissolvidos no meio de titulação constituído por DMSO:H₂O:AN na proporção de 7:0,8:4 (V/V) e titulados com a solução de KOH 0,1 M em iso-propanol, adicionado a fluxo constante (0,199 ml/min) e o ponto final detectado pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador já descrito.

Para a titulação potenciométrica pesamos cerca de 25 mg da substância e dissolvemos em um bēquer de 50 ml, com 19,5 ml do sistema solvente constituído de DMSO; H₂O na proporção de 7:0,8 (V/V).

V.C. RESULTADOS E DISCUSSÕES

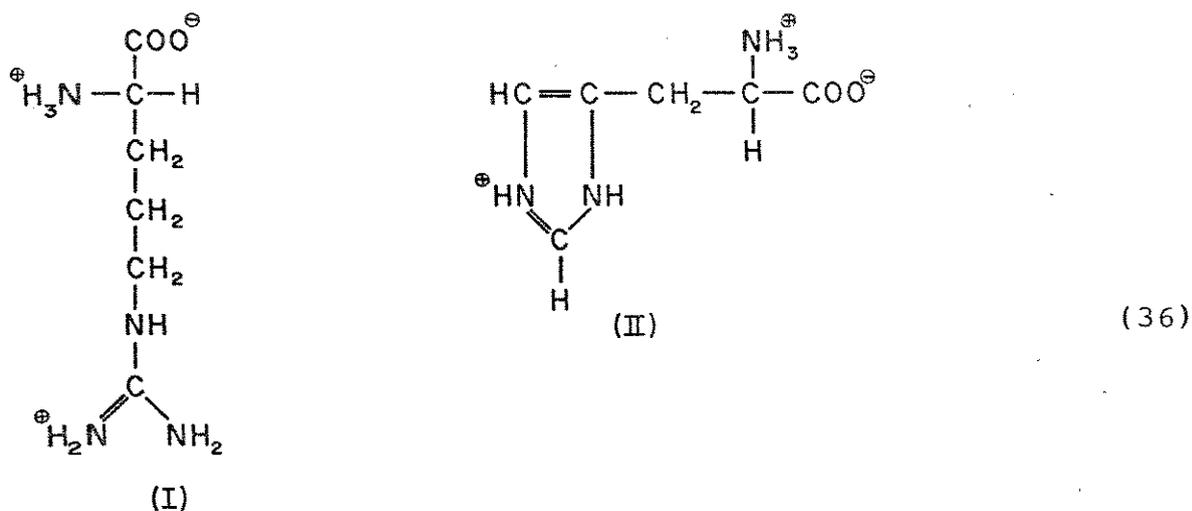
V.C.1. Titulação Termométrica Catalítica e Potenciométrica da Arginina e Histidina

A arginina possui três pK a saber: $pK_1' = 2,7$ (-COOH); $pK_2' = 9,04$ (-NH₃⁺); $pK_3' = 12,48$ (grupo guanidínico). A histidina também apresenta três grupos com os valores de pK: $pK_1' = 1,82$ (-COOH); $pK_2' = 9,17$ (-NH₃⁺) e $pK_3' = 6,00$ (grupo imidazólico). Nas titulações termométricas destes aminoácidos foram utilizados os cloridratos de histidina e o de arginina. Então, no caso da histidina temos os grupos amino e imidazol protonados e carboxilato desprotonado e no caso de cloridrato de arginina temos os grupos guanidino e amino protonados e o grupo carboxilato desprotonado.

Na T.T.C. destes aminoácidos pudemos observar, através

de parâmetros estequiométricos, que somente $1,94 \pm 0,03$ grupos foram titulados na arginina e $1,98 \pm 0,04$ grupos na histidina. Estes resultados mostraram que os grupos imidazóis, amino e guanidino, de aminoácidos são titulados neste meio por esta técnica. A diferença significativa é a titulação do grupo guanidino protonado, não titulado em meio aquoso pois o valor de seu pKa é 12,48. Na figura 23 temos os gráficos obtidos por T.T.C. destes aminoácidos.

Então em meio DMSO:H₂O 7:0,8 (V/V) que corresponde a 98,7% de DMSO o cloridrato de arginina (I) e o cloridrato de histidina (II) devem estar nas formas mostradas a seguir.



Quando adicionamos ao meio de titulação 1,0 ml da solução de HCl 0,1 M em DMSO:H₂O 7:0,8 (V/V), para favorecer a protonação de algum outro grupo e procedemos a sua titulação por T.T.C., descontando-se a quantidade de HCl adicionada, os seguintes parâmetros estequiométricos foram obtidos: para o cloridrato de arginina $2,07 \pm 0,03$ grupos e para o cloridrato de histidina $1,99 \pm$

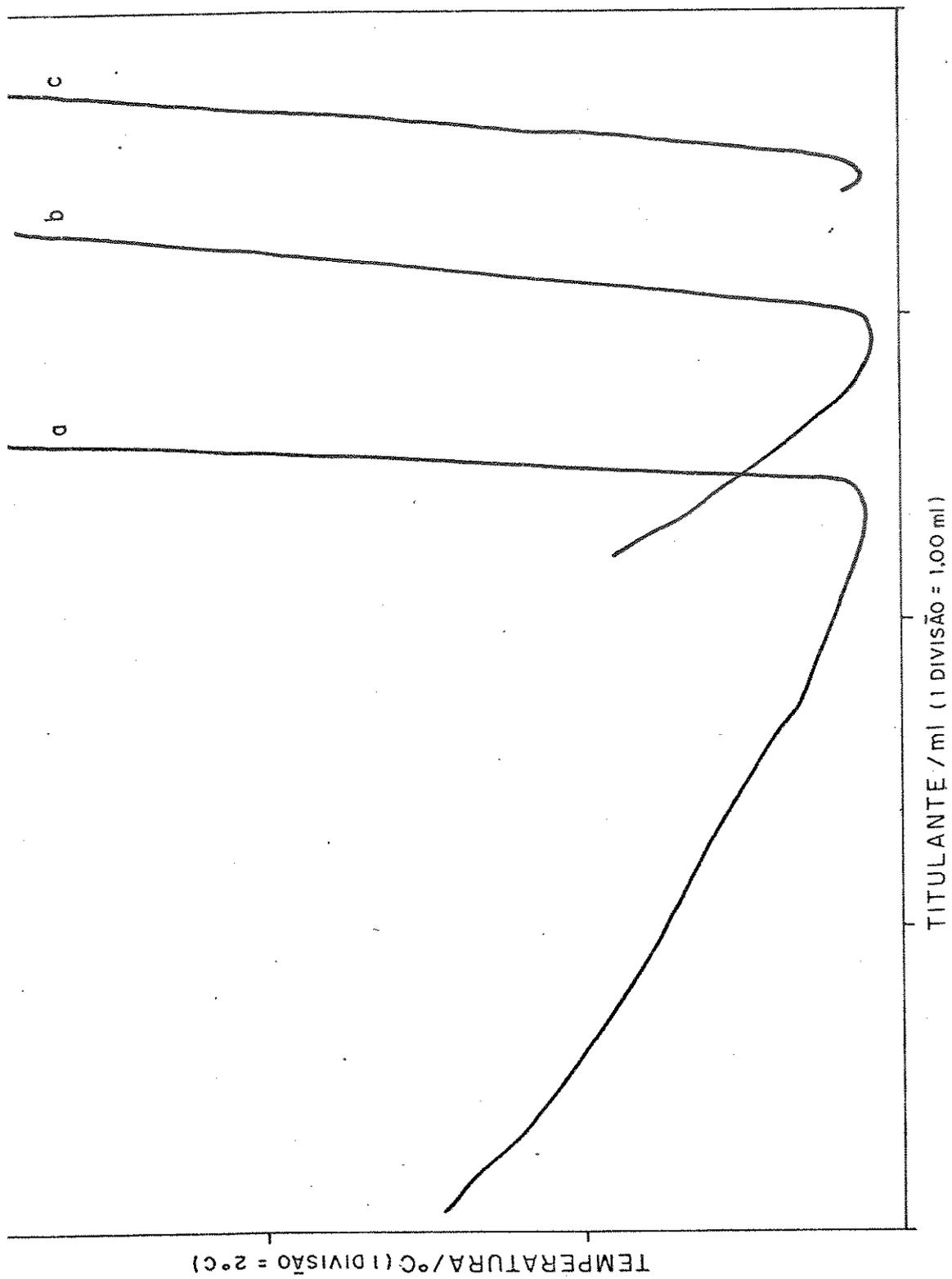


Figura 23. Curvas de titulação termométrica catalítica dos aminoácidos. a) cloridrato de histidina; b) cloridrato de arginina; c) branco. Titulante: solução de KOH 0,1234 M em iso-propanol.

0,01 grupos. Estes resultados apenas confirmam as conclusões obtidas nas titulações das formas não protonadas. Na figura 24 temos os gráficos obtidos por T.T.C. dos cloridratos de arginina e de histidina em meio contendo HCl.

Através de titulação potenciométrica destes aminoácidos em meio DMSO:H₂O 7:0,8 (V/V), de acordo com o procedimento proposto por Georgieva et alii⁽⁸²⁾. Podemos estabelecer correlações entre a T.T.C. e a titulação potenciométrica.

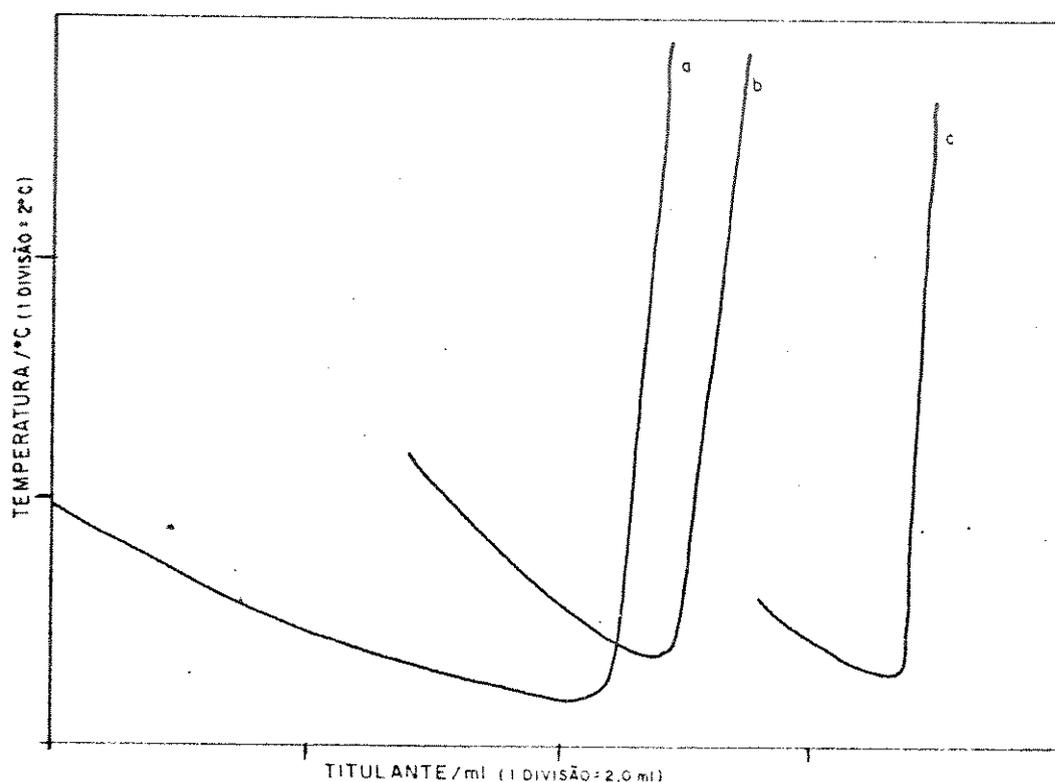


Figura 24. Curvas de titulação termométrica catalítica dos aminoácidos, após adição de 1,0 ml da solução de HCl 0,1 M em DMSO:H₂O 7:0,8 (V/V). a) cloridrato de histidina; b) cloridrato de arginina; c) branco. Titulante: solução de KOH 0,1234 M em iso-propanol.

Podemos constatar que as estequiometrias observadas para os cloridratos de arginina e histidina são da mesma ordem, ou seja, para o primeiro encontramos o valor de $2,10 \pm 0,03$ grupos e para o segundo $1,99 \pm 0,05$ grupos. Os gráficos correspondentes a estas titulações podem ser vistos nas figuras 25 e 26.

Fizemos também a titulação potenciométrica destes aminoácidos, adicionando ao meio de titulação 1,0 ml de solução de HCl 0,1 M, anteriormente referida. Os gráficos correspondentes a estas titulações podem ser vistos nas figuras 27 e 28.

Os resultados encontrados estão de acordo com os da T.T.C. em presença do mesmo ácido. Para o cloridrato de arginina encontramos $1,70 \pm 0,06$ grupos e para o cloridrato de histidina $2,03 \pm 0,02$ grupos. Isto mostra que por titulação potenciométrica também é possível determinar os grupos imidazol e amino da histidina e os grupos amino e guanidino da arginina. Assim essa possibilidade de determinar os grupos guanidino diferencia a titulação termométrica neste meio da titulação em meio aquoso. De fato, em meio aquoso não é possível titular os grupos guanidino por titulação potenciométrica.

V.C.2. Titulação Termométrica Catalítica e Potenciométrica da Tripsina

A tripsina apresentou-se solúvel no meio por nós utilizado para a sua titulação. Apesar do meio já ter sido previamente estabelecido⁽⁸⁵⁾, procedemos a um estudo para verificar a influência da quantidade de água, na estequiometria da reação determina-

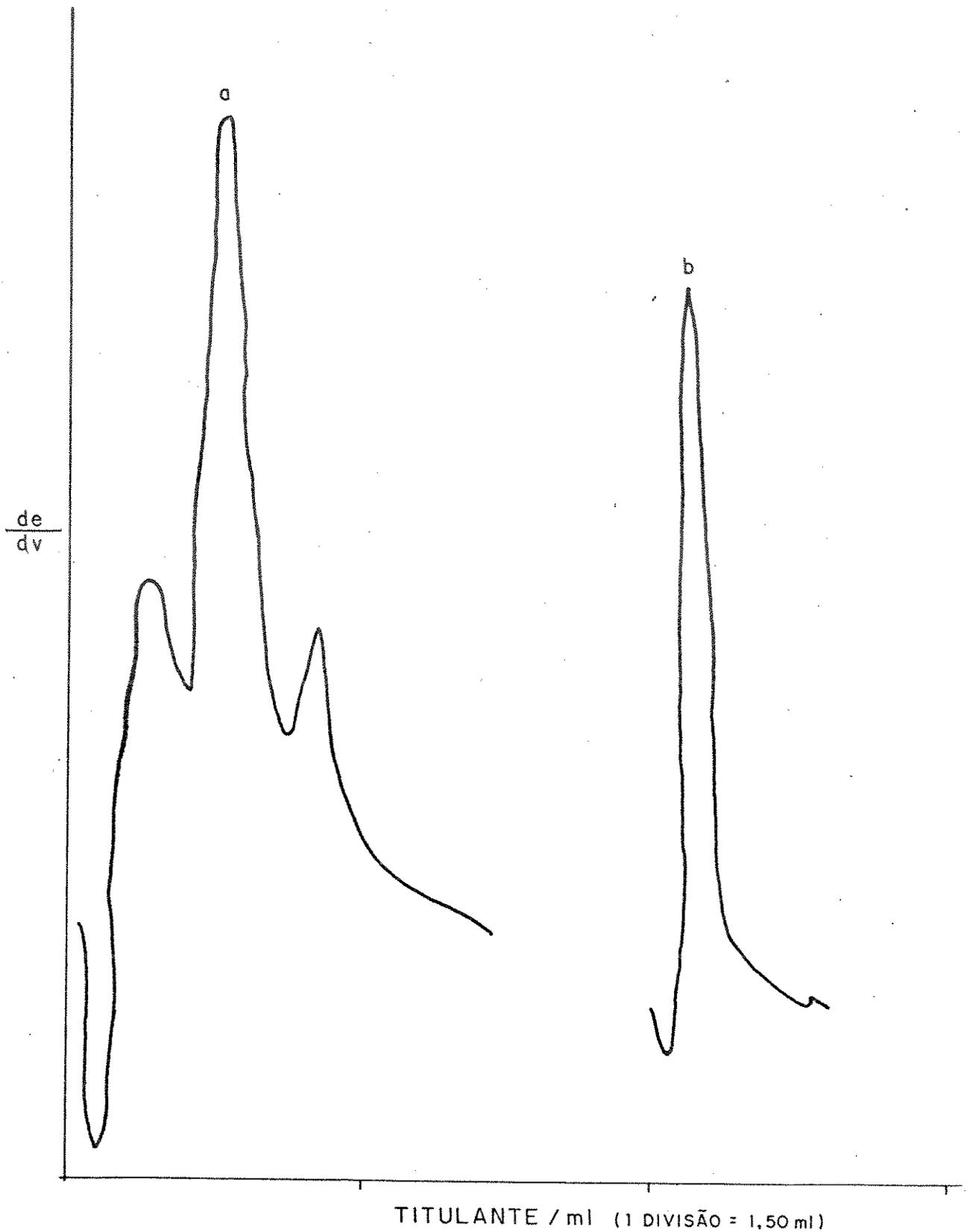


Figura 25. Curva derivada da titulação potenciométrica do cloridrato de arginina (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,1234 M em iso-propanol.

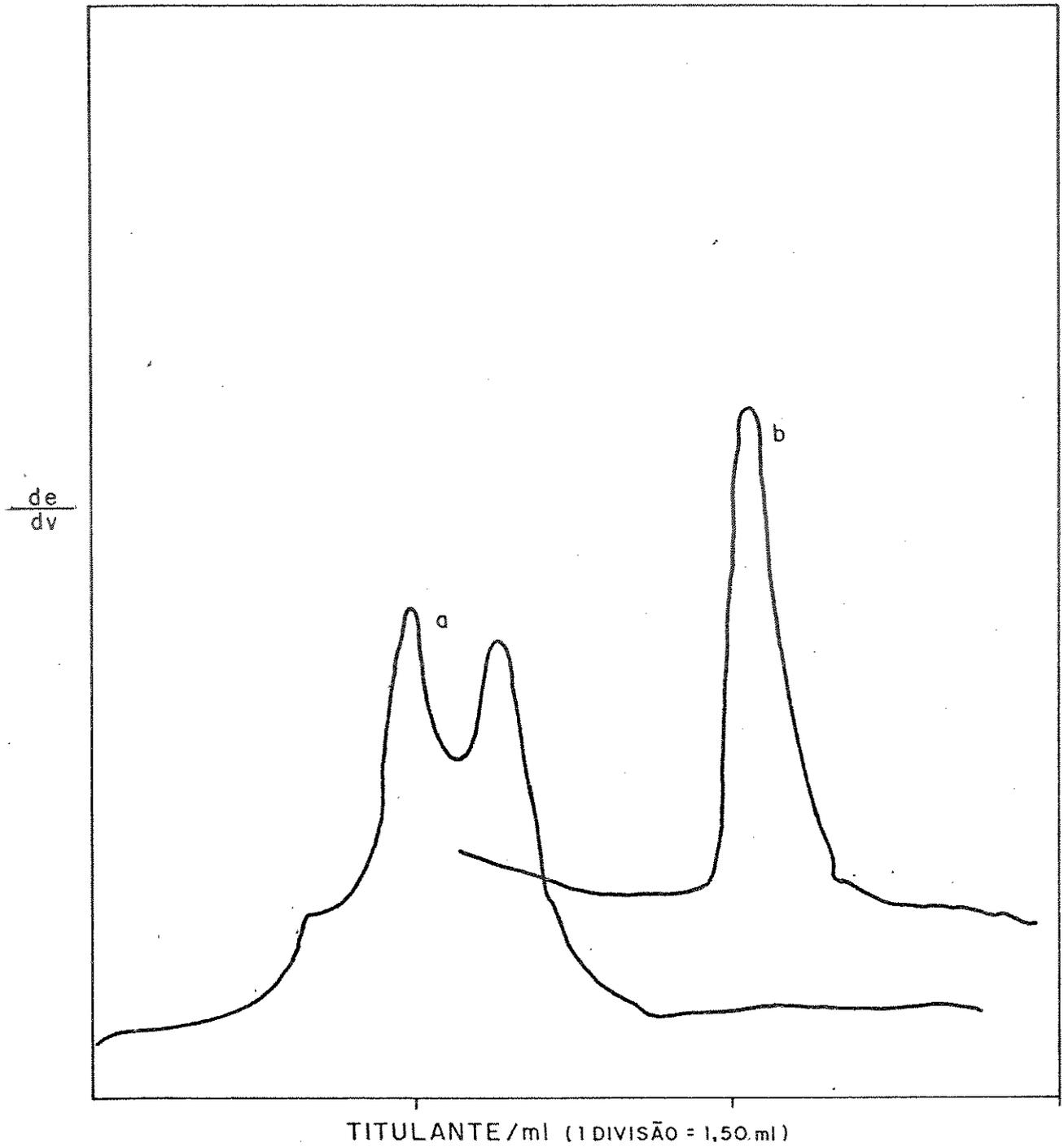


Figura 26. Curva derivada da titulação potenciométrica de cloridrato de histidina (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,096 M em iso-propanol.

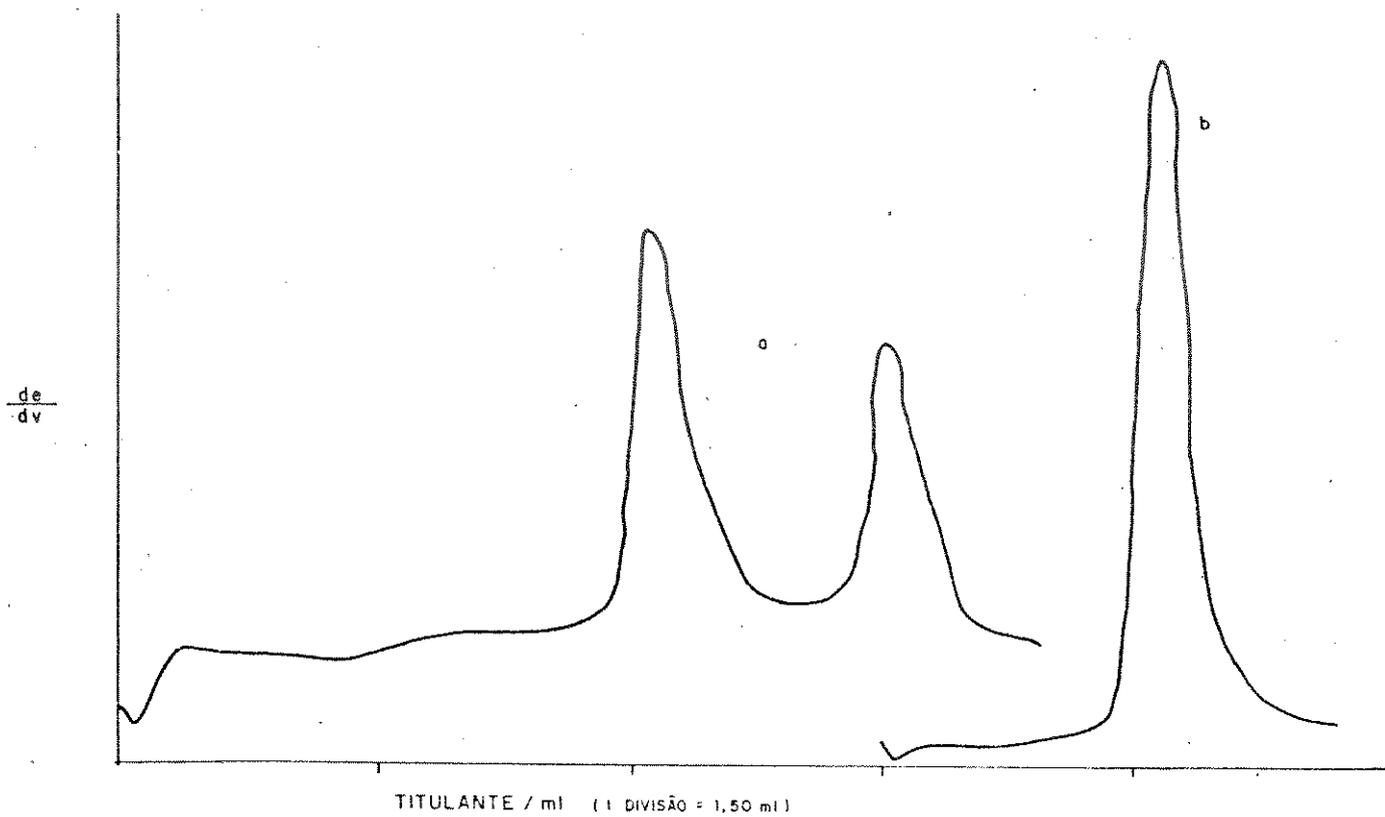


Figura 27. Curva derivada da titulação potenciométrica do cloridrato de histidina em presença de HCl (a); branco (b).
Titulante: solução de KOH 0,096 M em iso-propanol.

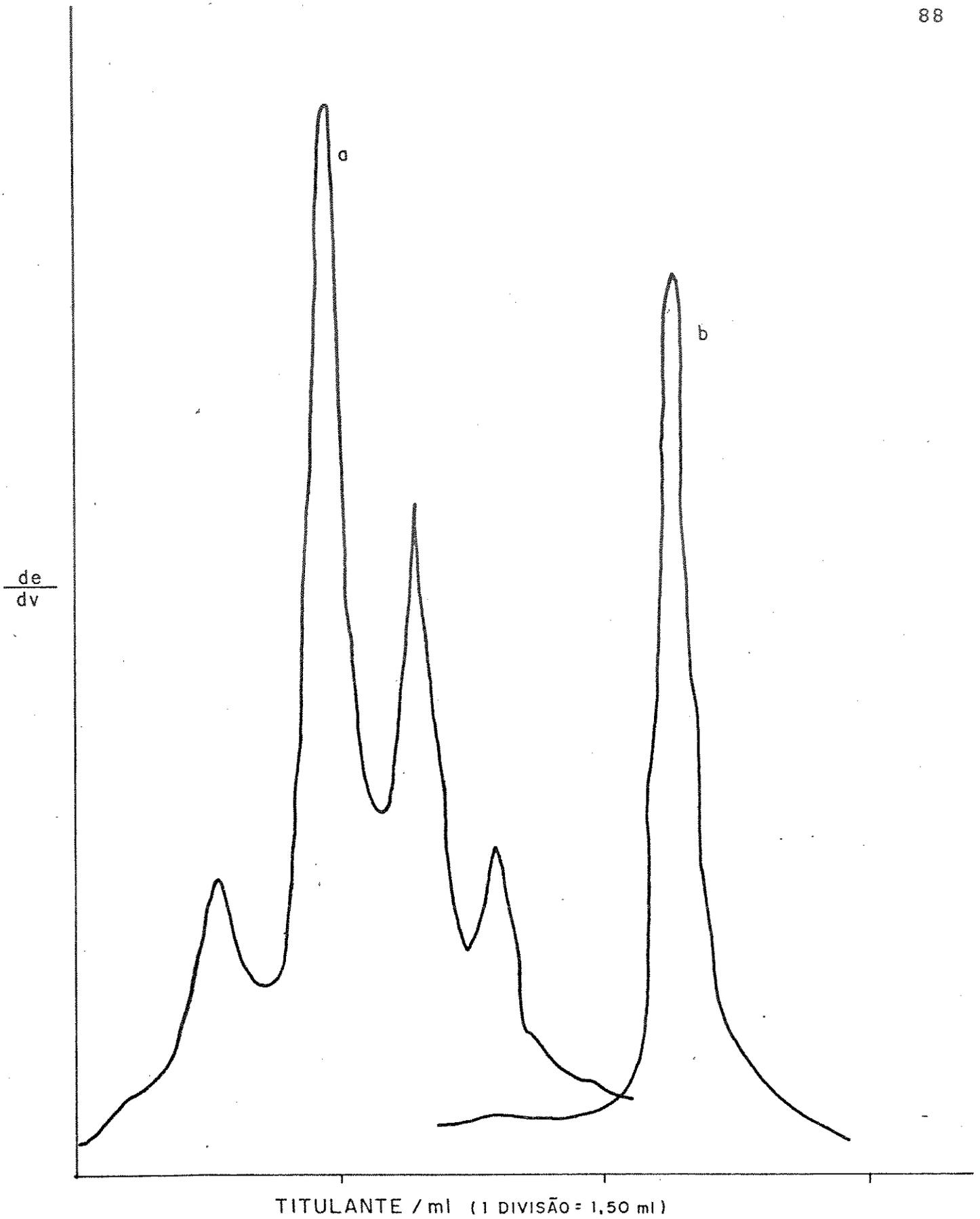


Figura 28. Curva derivada da titulação potenciométrica do cloridrato de arginina em presença de HCl (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,1234 M em iso-propanol.

tiva e no parâmetro α , na titulação da mesma. Para tanto mantivemos a quantidade de DMSO e AN constante e variamos a quantidade de água. Procedemos a T.T.C. e a titulação potenciométrica, cujos resultados encontram-se no gráfico da figura 29.

Considerando a T.T.C., verificamos que a estequiometria da reação não se altera com o aumento da quantidade de água. Por outro lado, temos que α apresenta um valor máximo quando temos 0,2 ml de água no meio de titulação e neste ponto a estequiometria é máxima. Entretanto, este baixo volume de água nos acarretou problemas na solubilização da proteína. Como a estequiometria e o valor de α não se alteraram de forma significativa quando aumentamos a água e, além disso, há um favorecimento da solubilidade, nós optamos pela quantidade de água obtida quando temos presente 0,8 ml de água no meio de titulação.

Verificada a influência do volume de água na titulação da tripsina, procedemos a T.T.C. da mesma no meio citado anteriormente. O gráfico de titulação pode ser visto na figura 30.

Para compararmos os resultados obtidos por T.T.C., fizemos titulação potenciométrica desta proteína no mesmo meio utilizado para a T.T.C., de acordo com o método proposto por Georgieva et alii⁽⁸²⁾. O gráfico correspondente a esta titulação pode ser visto na figura 31.

Neste meio de titulação acreditamos que só é possível a titulação dos grupos protonados desta proteína, incluindo a possibilidade de titulação dos grupos fenólicos. Os grupos protonados tituláveis são conferidos pelos seguintes aminoácidos:

a) Grupos carboxílicos (HA_1 ; HA_2) - ácido aspártico e glutâmico e possivelmente pela hidrólise de asparagina e glutamina.

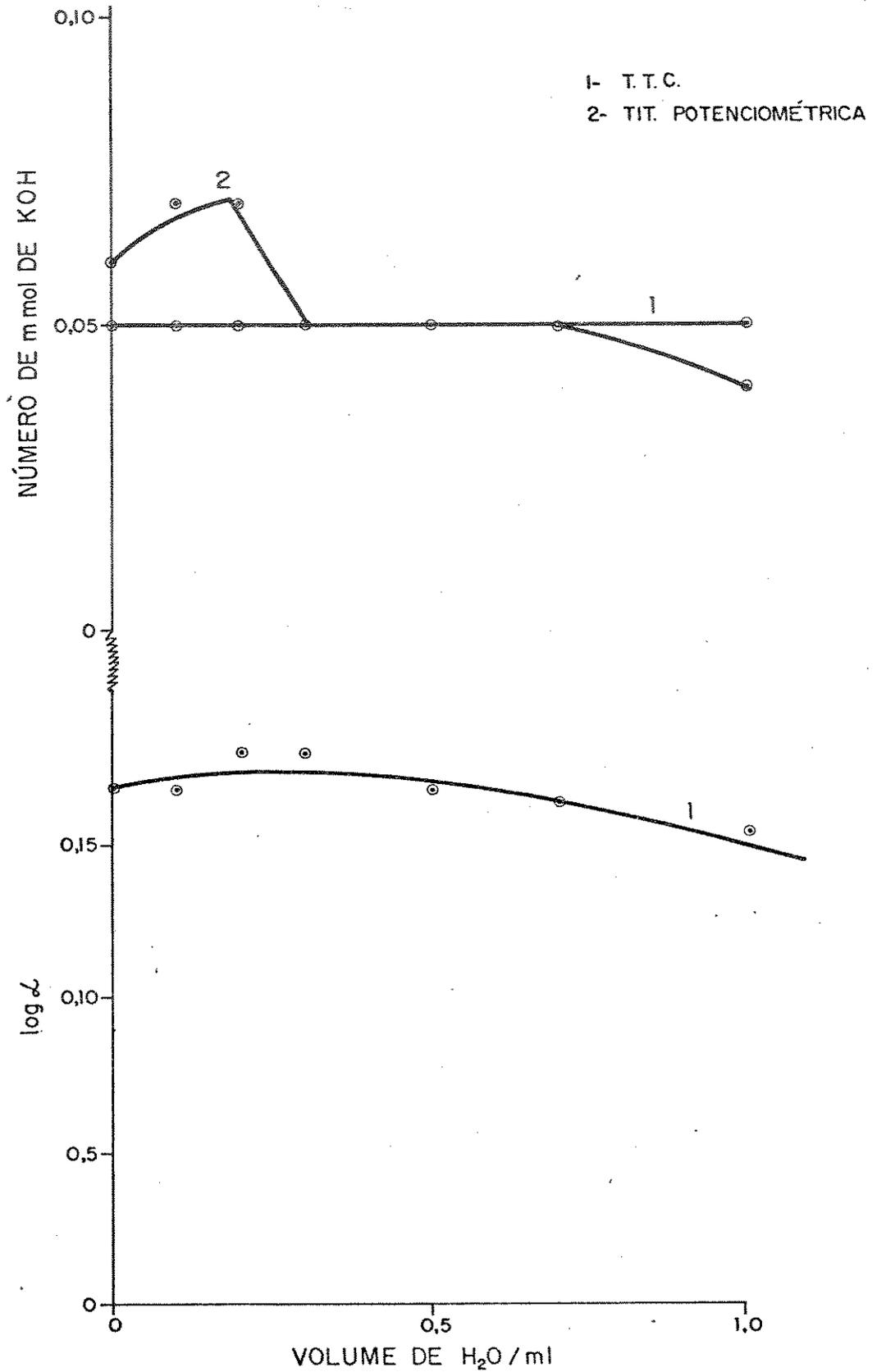


Figura 29. Estudo da influência da quantidade de água na titulação da tripsina.

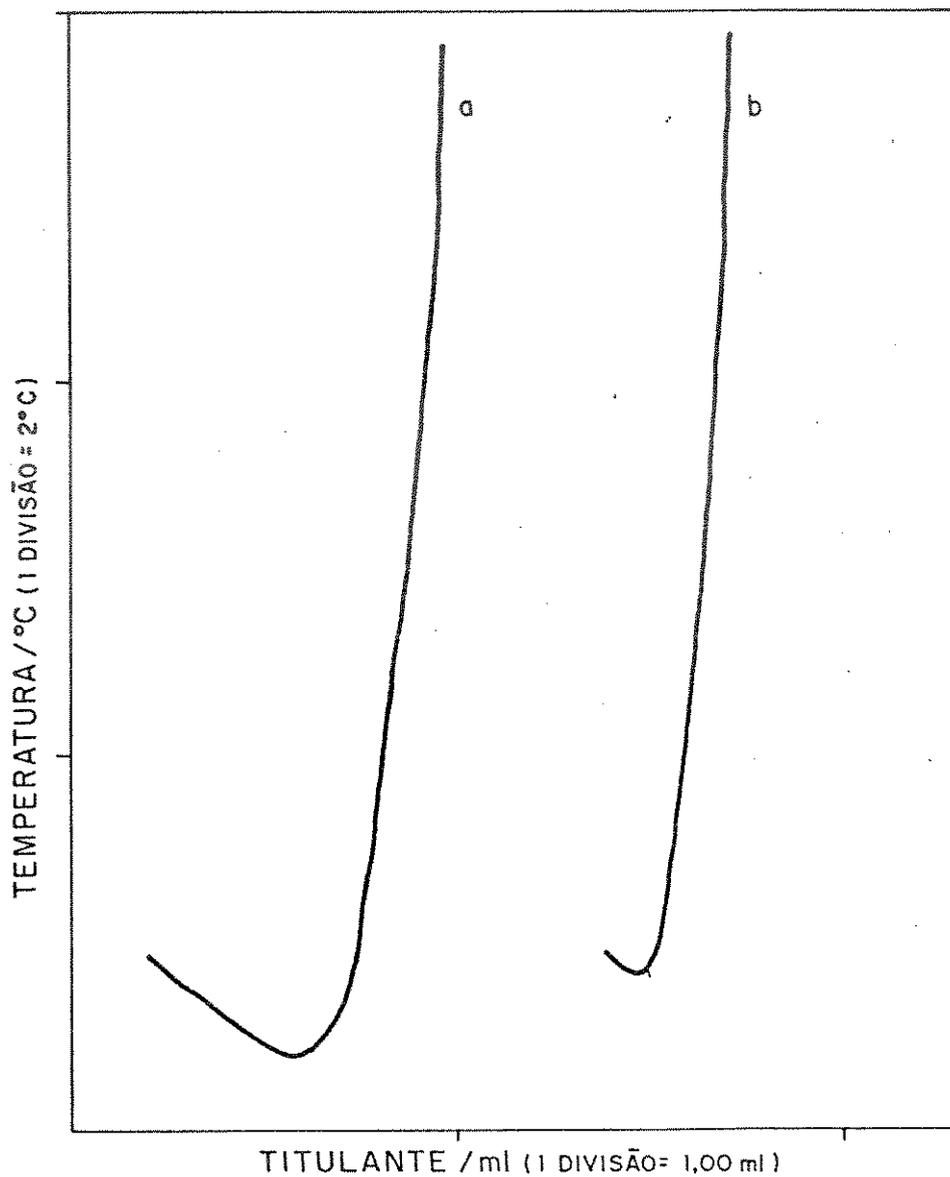


Figura 30. Curva de titulação termométrica catalítica da tripsina (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,0912 M em iso-propanol.

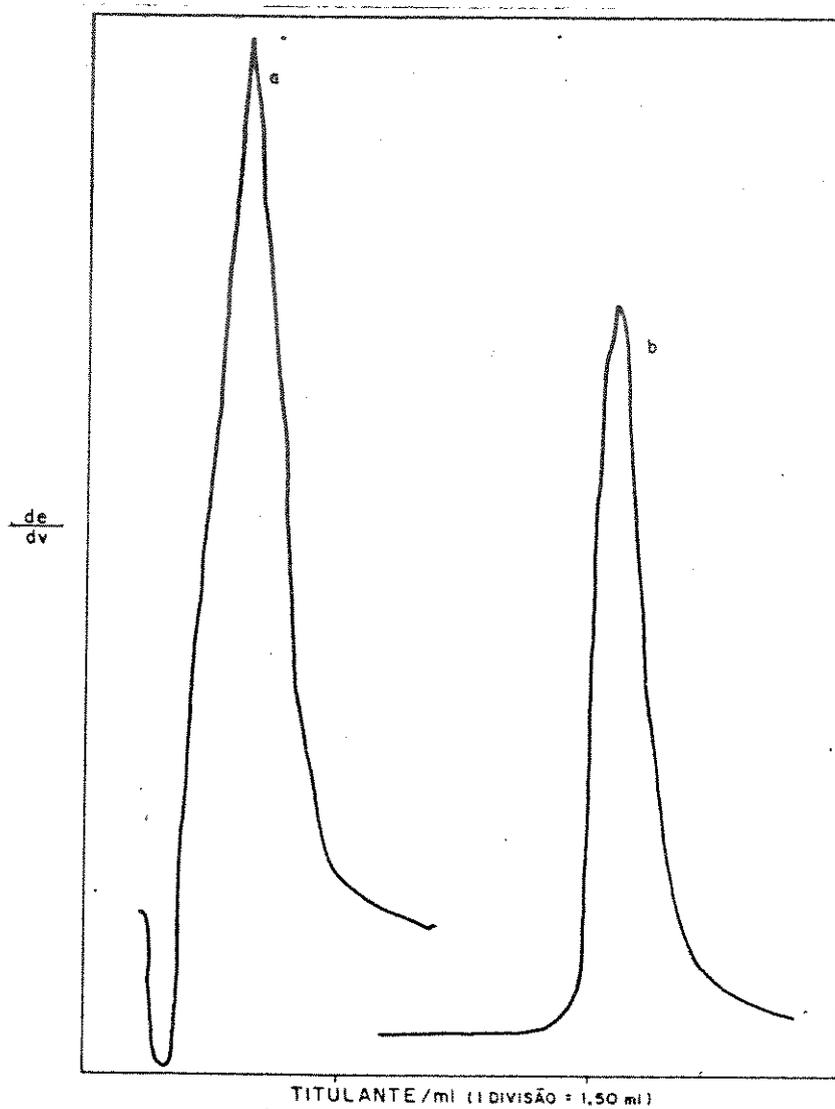


Figura 31. Curva derivada da titulação potenciométrica da tripsina (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,1166 M em iso-propanol.

- b) Grupos imidazóis (HA_3^+) - histidina.
- c) Grupos aminos (HA_4^+) - lisina.
- d) Grupos guanidinos (HA_5^+) - arginina.
- e) Grupos fenólicos - tirosina.

Na tabela 12 temos o número de grupos tituláveis da tripsina e os aminoácidos correspondentes obtidos de acordo com Croft⁽⁸⁶⁾.

Tabela 12. Número de grupos tituláveis da tripsina

Grupos	Aminoácido	Quantidade
Carboxílicos	Asp; Asn	5; 9
HA_1 ; HA_2	GLu; Gln	2; 12
Imidazóis - HA_3^+	His	3
Aminos - HA_4^+	Lys	13
Guanidino - HA_5^+	Arg	2
Fenólicos	Tyr	10

O número de grupos titulados obtidos por T.T.C. e por titulação potenciométrica são apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Número de grupos titulados na tripsina por T.T.C. e titulação potenciométrica

	T.T.C.	Titulação potenciométrica
	44,5	43,4
	44,2	43,6
	44,3	42,7
\bar{N}_g	$44,3 \pm 0,2$	$43,2 \pm 0,5$

De acordo com os dados da tabela 12 o número total de grupos protonáveis é 35 e, levando em conta que apenas uma parte destes grupos deve estar na forma protonada, o número de grupos que se esperava encontrar na titulação deveria ser menor que 35. Entretanto, os números de grupos protonados por mol de tripsina nas titulações termométrica catalítica e potenciométrica foram respectivamente $44,3 \pm 0,2$ e $43,2 \pm 0,5$.

Uma explicação para este fato seria que parte da proteína estaria hidrolisada pelo efeito da tripsina. Outra hipótese é que parte dos grupos glutamina e asparagina, estejam hidrolisados pelo efeito da tripsina.

Entretanto, a concordância razoável entre os valores da titulação termométrica catalítica e potenciométrica mostram a aplicabilidade da técnica na determinação dos grupos protonáveis de proteínas.

V.C.3. Titulação Termométrica Catalítica e Potenciométrica da Mioglobina

Esta proteína é parcialmente solúvel no meio utilizado para a titulação.

Existe uma influência da ordem de adição dos solventes que compõem o meio de titulação na solubilização desta proteína e que influem de maneira significativa na estequiometria da reação determinativa. Na tabela 14 temos os dados estequiométricos obtidos por T.T.C. desta proteína em função da ordem de adição dos solventes.

Tabela 14. Influência da ordem de adição dos solventes na T.T.C. da mioglobina

Ordem de adição dos solventes ^a	Estequiometria m mol de KOH/mg
H ₂ O; DMSO; AN	0,032
DMSO; H ₂ O; AN	0,015
AN; H ₂ O; DMSO	0,027

^a H₂O = 0,8 ml; DMSO = 7,0 ml; AN = 4,0 ml

Obtivemos a melhor condição estequiométrica quando a ordem de adição de solventes era a seguinte: H₂O:DMSO:AN. Mesmo assim, a solubilização da proteína não era total, havendo, entretanto, uma solubilização da mesma no decorrer da titulação, sendo que ao término da mesma não visualizamos nenhum sólido em suspensão. Com este estudo, pudemos verificar que a presença de água no sistema solvente, independentemente da ordem em que era adicionada, era importante na solubilização da proteína. Para tal, procedemos a um estudo para verificar esta influência no valor de α e na estequiometria da reação determinativa. Neste estudo mantivemos a quantidade de DMSO e AN constante e variamos a de água para T.T.C. Na titulação potenciométrica mantivemos a quantidade de DMSO constante e variamos a de água. Os resultados obtidos encontram-se no gráfico da figura 32.

Analisando o gráfico da figura 32, podemos verificar que tanto na T.T.C. como na titulação potenciométrica, quando temos 0,2 ml de água, o valor de α tende a se estabilizar e o mesmo ocorre com a estequiometria. Como a água é importante no processo

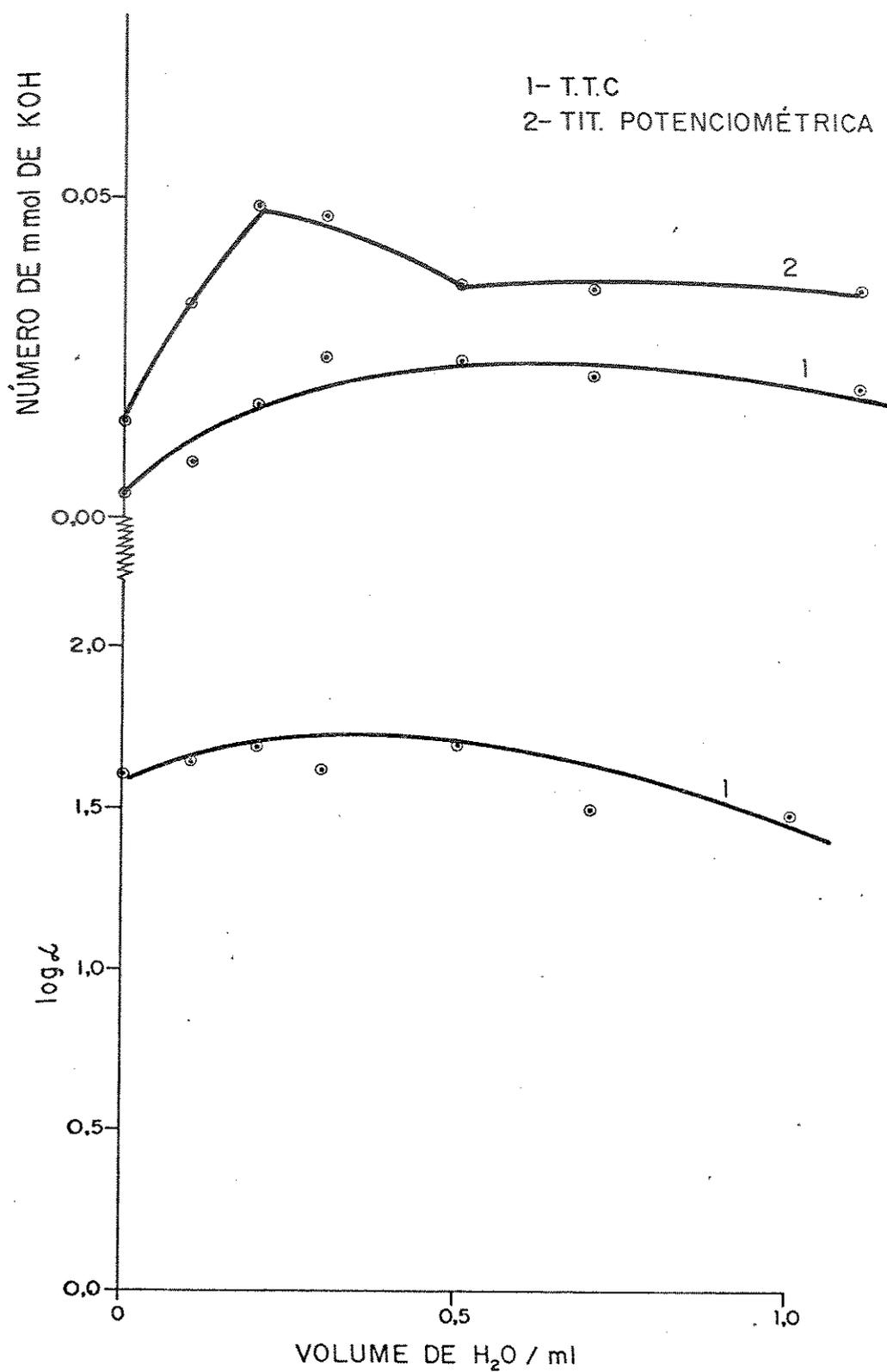


Figura 32. Estudo da influência da quantidade de água na titulação da mioglobina.

de solubilização da proteína e como não havia grande comprometimento na estequiometria e no valor de α , nós optamos por utilizar no meio de titulação o volume de 0,8 ml de água.

Estabelecidas as condições ideais para a T.T.C. e a titulação potenciométrica, passamos a T.T.C. da mioglobina, cujo gráfico de titulação pode ser visto na figura 33.

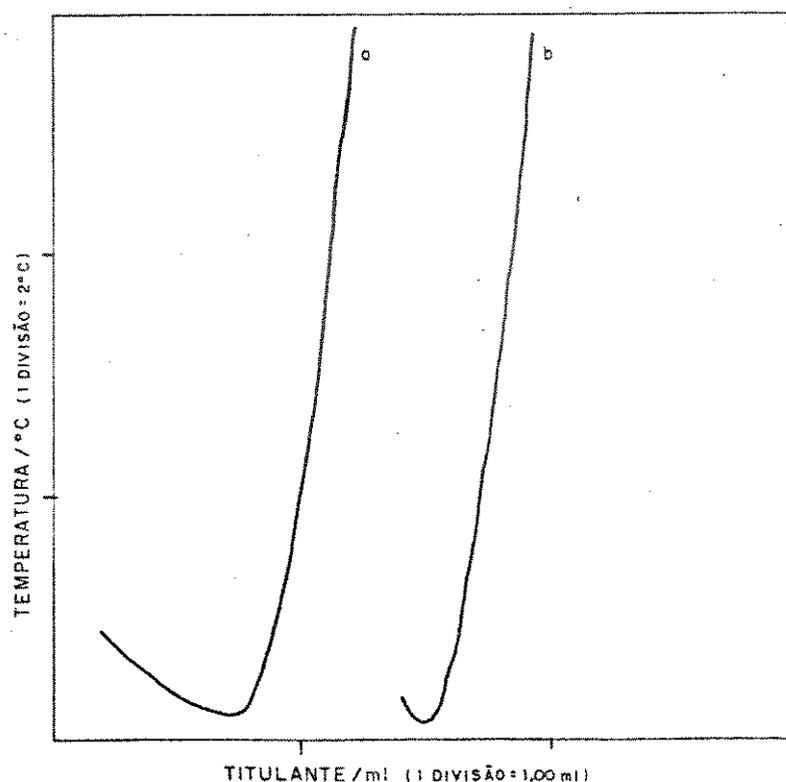


Figura 33. Curva de titulação termométrica catalítica da mioglobina (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,1085 M em iso-propanol.

Com a finalidade de compararmos os resultados obtidos por T.T.C., fizemos titulação potenciométrica desta proteína de acordo com o proposto por Georgieva et alii⁽⁸²⁾. O gráfico correspondente

a esta titulação encontra-se na figura 34.

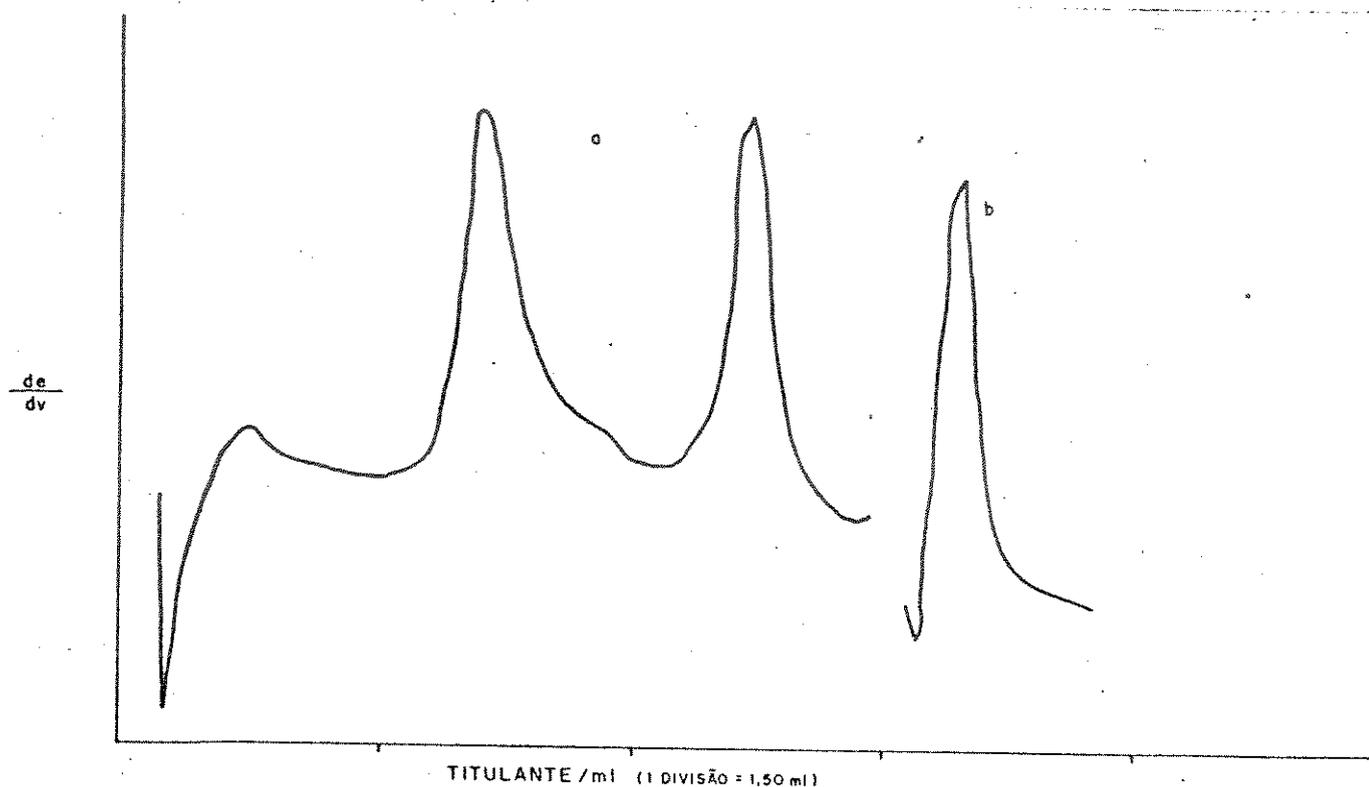


Figura 34. Curva derivada da titulação potenciométrica da mioglobina (a); branco (b). Titulante: solução de KOH 0,1149 M em iso-propanol.

Na tabela 15 temos o número de grupos tituláveis da mioglobina e os aminoácidos correspondentes obtidos de acordo com Dayttoff⁽⁸⁷⁾.

O número de grupos titulados por T.T.C. e titulação potenciométrica estão apresentados na tabela 16.

Os resultados obtidos por T.T.C. são comparados com os dados obtidos por titulação potenciométrica no mesmo meio e o

Tabela 15. Número de grupos tituláveis da mioglobina

Grupos	Aminoácidos	Quantidade
Carboxílicos	Asp; Asn	6; 2
HA ₁ ; HA ₂	GLu; GLn	14; 5
Imidazóis - HA ₃ ⁺	His	12
Aminos - HA ₄ ⁺	Lys	19
Guanidina - HA ₅ ⁺	Arg	4
Fenólicos	Tyr	3

Tabela 16. Número de grupos titulados na mioglobina por T.T.C. e titulação potenciométrica

	T.T.C.	Titulação potenciométrica	Número de grupos esperados
	28,2	30,8	
	28,9	31,4	
	29,2	30,7	
\bar{N}_g	28,8 ± 0,5	31,0 ± 0,4	27,7

número de grupos esperados levando em conta a titulação potenciométrica em meio aquoso. Na realidade foram determinados em solução aquosa o número de grupos não protonados da proteína⁽⁸⁸⁾. Assim o número de grupos protonados foram calculados pela diferença entre o número total de grupos protonáveis (retirados da tabela 15) e o número de grupos não protonados obtidos na referida titulação. É possível ver que neste caso há uma razoável concordância entre os

valores da titulação potenciométrica, da titulação termométrica catalítica e aquele esperado pela composição dos grupos protonados das proteínas. A diferença entre os valores da titulação termométrica catalítica e a potenciométrica pode estar relacionada a algum erro sistemático na localização do ponto final da titulação termométrica catalítica.

V.D. CONCLUSÃO

Das titulações de arginina e histidina foi possível concluir que, além dos grupos amino, os grupos imidazol e guanidino são titulados no meio $H_2O:DMSO:AN$. Por outro lado, sabe-se da literatura⁽⁸⁵⁾ que os grupos carboxílicos e os grupos fenólicos da tirosina são titulados na forma protonada.

Desta forma podemos afirmar que todos grupos laterais protonáveis das proteínas são titulados nos aminoácidos.

Em seguida foi observado que os resultados da titulação termométrica catalítica da mioglobina está de acordo com o esperado, admitindo-se que todos os grupos protonados desta proteína são titulados por esta técnica.

Mesmo no caso da tripsina, em que os resultados são mais altos que os esperados, o que pode ser explicado admitindo-se hidrólise da proteína ou dos grupos glutamina e asparagina, há uma boa concordância com os dados da titulação potenciométrica no mesmo meio.

Deste modo pode-se concluir que a técnica da titulação termométrica catalítica pode ser utilizada como um meio rápido pa-

ra se determinar o número total de grupos ácidos das proteínas. Entretanto, para se poder fazer esta afirmação este estudo deve ser extendido a outras proteínas.

CAPÍTULO VI

INTRODUÇÃO AO USO DE SUBSTÂNCIAS TERMOCRÔMICAS COMO INDICADOR DE PUNTO FINAL DE TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS CATALÍTICAS

O conhecimento de substâncias que experimentam alterações reversíveis de cor a certas temperaturas data de 1871.

Nesta época Houston⁽⁸⁹⁾ realizou uma série de experimentos com vários sais, principalmente do cobre, antimônio, mercúrio, níquel, ferro e arsênico e verificou que, quando submetidos a uma certa temperatura, sofriam uma alteração de cor e que com o posterior resfriamento retomavam a cor inicial. Anos após, Bachman e Marginis⁽⁹⁰⁾ retomaram o trabalho realizado por Houston e verificaram que o fenômeno de alterações reversíveis de cor, que tais compostos experimentavam, era de grande interesse por uma série de razões tais como:

a) Oferecia uma ampla possibilidade de estudo no campo da física do estado sólido.

b) Oferecia muitas possibilidades de aplicações práticas, principalmente como sensor de temperatura, em locais onde termômetros ou termopares eram de difícil utilização, devido a uma excessiva capacidade calorífica ou pouco contato térmico.

Portanto, o conhecimento de substâncias termosensíveis ou termocrômicas é bastante antigo, principalmente no que se refere a substâncias termocrômicas inorgânicas. Na literatura encontramos descritas várias substâncias inorgânicas pertencentes a este grupo. Na tabela 17 encontramos alguns exemplos.

A alteração de cor, na maioria das vezes, pode ser explicada por uma mudança na estrutura cristalina do composto, a

Tabela 17. Comportamento de alguns materiais sensores de temperatura⁽⁹⁰⁾

Fórmula	Cor original	Cor final	Temperatura de transição em °C
HgI (amarelo)	amarela	laranja	54-82
HgI ₂ (vermelho)	vermelha ^a	vermelho escuro	48-127
	vermelho escuro ^b	amarelo	127
ZnO	branco	amarelo	250
CuI	marrom	laranja	60-62
AgI	amarelo	castanho	145
Cu ₂ HgI ₄	vermelho	preto	70
Ag ₂ HgI ₄	amarelo	laranja	47

^a Mudança lenta e gradual, iniciando a 48°C, temperatura esta em que o composto é vermelho e adquire coloração vermelha escura a 127°C.

^b Alteração da estrutura cristalina passando da forma tetragonal para a rômica.

qual é provocada por um aumento de temperatura, sendo esta reversível. Este fato nos levou a pensar na possibilidade de utilizarmos estas substâncias como indicadores de ponto final em titulação termométrica catalítica.

Embora o universo de substâncias termocrômicas inorgânicas seja bastante vasto, a maioria delas apresenta temperatura de transição elevada, o que inviabiliza, ou pelo menos torna pouco prático, o seu uso como indicador de ponto final de titulação ter-

mométrica catalítica.

Isto se deve ao fato de se necessitar trabalhar a uma temperatura muito alta, para se atingir a temperatura de transição do indicador, considerando que a temperatura das soluções em equilíbrio térmico com o ambiente se encontram a temperaturas da ordem de 25°C. Para que uma substância termocrômica possa ser empregada como indicador termocrômico, em T.T.C., é necessário que apresente uma temperatura de transição abaixo de 40°C.

Outra possibilidade existente é a da utilização dos cristais líquidos como indicadores termocrômicos. Alguns cristais líquidos, puros ou em misturas, apresentam temperaturas de transição mais favoráveis para nossa finalidade. Eles permitem a escolha de uma substância ou mistura de substâncias que apresentem uma temperatura de transição mais adequada, considerando a temperatura ambiente e a variação de temperatura produzida pela reação catalisada. Na tabela 18 são apresentados alguns exemplos de cristais líquidos e suas respectivas temperaturas de transição.

Tabela 18. Alguns exemplos de cristais líquidos⁽⁹¹⁾

Composto	Temperatura de transição (°C)
4-n-Hexil-4'cianobifenil	14-28
4-metoxibenzilidina-4'-n-butyl anilina (MBBA)	21-47
ácido p-n-actiloxibenzóico	108-147
4-butiloxibenzal-4-etilanilina	40,5-65,5
nanoato de colesterila	145-179
hexabutoxitrifênileno	88,6-145,6
p-azoxianisole (PAA)	117-137

Para melhor entendimento, discutimos separadamente o uso de substâncias termocrômicas inorgânicas e orgânicas (cristal líquido), as quais, como já visto anteriormente, podem em princípio serem utilizadas como indicadores de ponto final em T.T.C.

VI.A. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA UTILIZANDO INDICADOR TERMOCRÔMICO INORGÂNICO

VI.A.1. Considerações Gerais

Introduzimos⁽⁹²⁾ o uso de substâncias termocrômicas inorgânicas como indicadoras de ponto final em T.T.C. Neste trabalho tivemos como objetivo: a) preparar um indicador termocrômico inorgânico; b) adaptar a aparelhagem e empregar o sistema numa dada titulação envolvendo a técnica da T.T.C. A titulação foi escolhida na literatura⁽⁷²⁾, levando em conta a variação de temperatura no ponto final da titulação. Visa também estudar a influência da temperatura inicial da solução titulada sobre os resultados da análise. Utilizamos uma mistura de substâncias termocrômicas inorgânicas constituída por uma solução sólida de Ag_2HgI_4 e Cu_2HgI_4 , contendo 43 moles% do composto de cobre e 57 moles% do de prata, como indicador termocrômico inorgânico. A titulação utilizada para aplicação do método foi a de ácido benzóico, em meio AN:DMSO 2:1 (V/V), usando como titulante a solução de n-butóxido de potássio 0,1 M em n-butanol, que constitui um sistema de solvente e titulante desenvolvido por Greenhow e Dajer de Torrijos⁽⁷²⁾. Tal sistema foi desenvolvido com a finalidade de proceder a titulação de ácido benzóico, usando a técnica da T.T.C., com o uso da aparelha-

gem convencional. Nesta titulação a reação responsável pelo aumento de temperatura no ponto final da titulação, conforme estudado por Greenhow e Dajer de Torrijos⁽⁷²⁾, é a cianoetilação do n-butanol a qual é catalisada pelo íon n-butóxido do titulante. As titulações foram realizadas com duas modalidades operacionais, sendo que numa delas o titulante é adicionado a fluxó constante e em outra o titulante é adicionado gota a gota com uma bureta comum. A vantagem da segunda modalidade é que a mesma dispensa o uso de qualquer aparelhagem, a não ser aquela usada na titulação convencional.

Quando usamos substâncias termocrômicas como indicadoras de ponto final em T.T.C., há a necessidade de termos um aumento de temperatura suficientemente grande no ponto final da titulação. Isto é exatamente o que ocorre em T.T.C., onde um aumento de temperatura é observado no ponto final da titulação, sendo que em alguns casos pode chegar a 30°C.

Baseado neste fato, várias são as reações catalisadas que, pelo menos em princípio, podem ser utilizadas nesta técnica, o que pode ser observado em uma extensa revisão feita por Greenhow⁽⁴⁶⁾. No nosso caso, em que o indicador utilizado apresenta uma temperatura de transição de 34°C e admitindo que a temperatura das soluções titulada e titulante estejam a cerca de 25°C, isto é, à temperatura ambiente, seria necessário uma variação de temperatura mínima de cerca de 10°C para se perceber a mudança de cor do indicador.

O método de indicação do ponto final em T.T.C., através de substâncias termocrômicas inorgânicas, foi aplicado inicialmente na determinação de ácido benzóico⁽⁹²⁾, posteriormente na deter-

minação de ácido acetil salicílico puro e em suas preparações farmacêuticas.

Salicilatos são largamente usados em medicina. Os vários derivados compreendem duas grandes classes: éteres do ácido salicílico (ex. salicilato de metila), ésteres salicilatos de ácidos orgânicos (ex. ácido acetil salicílico ou aspirina), comumente indicado pela sigla A.A.S.

Aspirina é normalmente dispensada sozinha ou em misturas com fenacetina e codeína, como comprimidos designados pela sigla A.P.C.

O conteúdo de A.A.S. em comprimidos normalmente é determinado por titulação, após extração com solvente do produto hidrolisado, que é o salicilato⁽⁹³⁾. Outros métodos baseados em cromatografia a gás^(94,95), cromatografia líquida⁽⁹⁶⁾, espectrofotometria UV/visível⁽⁹⁷⁾ e fluorimetria⁽⁹⁸⁾ foram desenvolvidos mas requerem uma extração prévia do material a ser analisado. Um outro método que utiliza como titulante metóxido de sódio em benzeno-metanol foi desenvolvido por Song-Ling e Martin⁽⁹⁹⁾. Recentemente Choi e Fung⁽¹⁰⁰⁾ desenvolveram um eletrodo seletivo para salicilato, o qual pode ser usado na análise de A.A.S., após a sua transformação em salicilato solúvel em meio aquoso. Nesta parte do trabalho descrevemos as determinações de ácido benzóico, de ácido acetil salicílico puro e em preparados farmacêuticos por T.T.C. usando substância termocrômica inorgânica como indicador de ponto final. Em ambas titulações usamos como titulante a solução de n-butóxido de potássio 0,1M em n-butanol e o titulado em meio AN:DMSO 2:1 (V/V)⁽⁷²⁾.

Este sistema nos permite obter uma curva de titulação

bem favorável. Neste caso a variação de temperatura no ponto final é da ordem de 25°C.

VI.A.2. Parte Experimental

VI.A.2.a. Aparelhagem

Nas titulações potenciométricas que foram levadas a cabo, como método comparativo⁽¹⁰¹⁾, utilizamos, no caso do ácido acetil salicílico, um potenciômetro "Orion" modelo 701, um eletrodo de vidro combinado marca "Metrohm" modelo E.A-109 em solução 6 M de cloreto de potássio. A incerteza da medida é de ± 1 mV.

Nas titulações termométricas com indicador termocrômico, o titulante foi adicionado por meio de uma seringa de vidro marca "Omega" com a capacidade de 20,0 ml acoplada ao equipamento "Syringe Pump 351", da Sage Instruments. No presente trabalho utilizamos a vazão nominal de 0,4 ml/min, cujo valor de calibração é igual ao da vazão nominal.

O frasco usado para titulação consiste de um frasco de Dewar não espelhado, com capacidade de 20,0 ml, o qual pode ser visto na figura 35.

VI.A.2.b. Reagentes Utilizados

- Ácido benzóico P.A. "Merck"
- Ácido acetil salicílico P.A. "Merck"
- n-butanol P.A. "Merck"

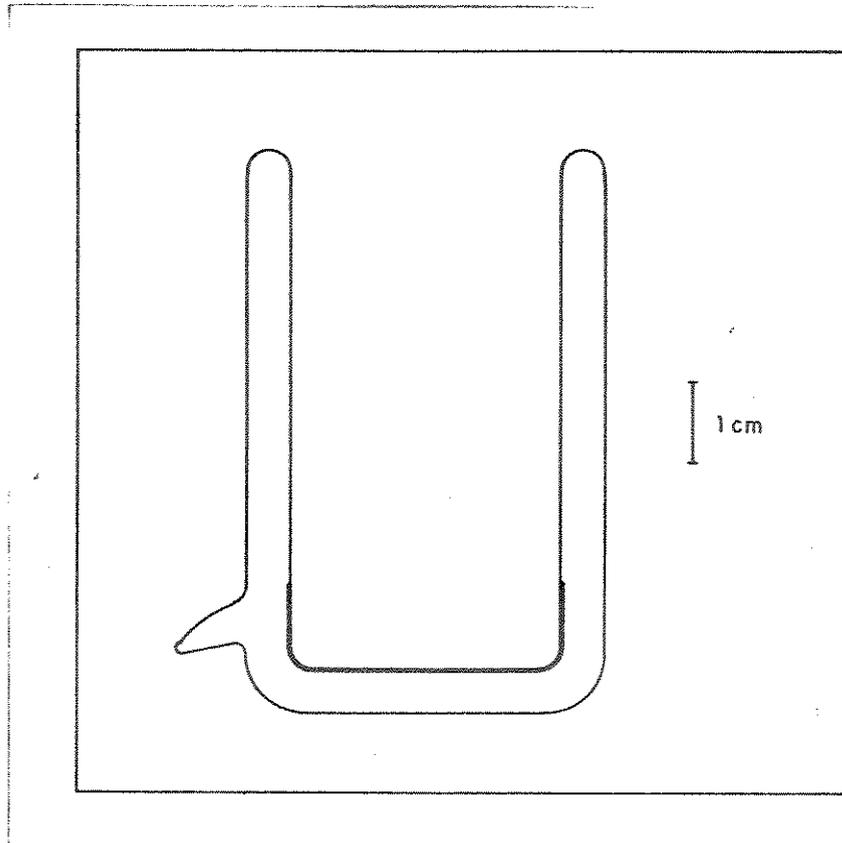


Figura 35. Frasco de titulação contendo o indicador termocrômico inorgânico.

- Acrilonitrila P.A. "Merck"
- Dimetilsulfóxido P.A. "Merck"
- Nitrato de cobre R.P. "Carlo Erba"
- Nitrato de prata P.A. "Merck"
- Nitrato de mercúrio(II) R.P. "Carlo Erba"
- Iodeto de potássio R.P. "Carlo Erba"
- Potássio metálico comercial
- Hidróxido de sódio R.P. "Carlo Erba"
- Ácido sulfúrico P.A. "Merck"
- Ftalato ácido de potássio P.A. "Baker"
- Carbonato de sódio R.P.E. "Carlo Erba"

A solução de n-butóxido de potássio 0,1 M em n-butanol foi preparada e padronizada conforme descrito em IV.B.3. A solução 0,5 N de hidróxido de sódio foi preparada a partir da sua solução saturada, da qual tomamos quantidade suficiente para prepararmos 500,0 ml de solução 0,5 N. Esta solução foi padronizada com ftalato ácido de potássio, usando o indicador fenólftaleína.

A solução 0,5 N de ácido sulfúrico foi preparada por diluição da sua solução concentrada, da qual tomamos quantidade suficiente para prepararmos 500,0 ml de solução 0,5 N. Tal solução foi padronizada com carbonato de sódio, usando o indicador heliantina.

O meio de titulação dos ácidos benzóico e acetil salicílico consiste de uma mistura de AN e DMSO na proporção de 2:1 (V/V), a qual pode ser preparada no momento de uso⁽¹⁰²⁾.

VI.A.2.c. Procedimento

A preparação da substância termocrômica foi feita por precipitação simultânea⁽¹⁰³⁾, a partir de soluções contendo quantidades estequiométricas dos reagentes. Este método produz resultados mais satisfatórios que o da reação no estado sólido. Soluções aquosas contendo misturas de nitrato de prata e nitrato de cobre, com concentração total do metal em torno de 0,4 M, são adicionadas sobre uma solução em ebulição de tetraiodo mercurato(II) de potássio. Esta última solução foi preparada a partir de nitrato de mercúrio(II) e iodeto de potássio em quantidade suficiente para reduzir cobre(II) a cobre(I). A mistura resultante é aquecida até qua-

se a secura para remover o iodo formado. A seguir, filtra-se, lava-se e seca-se a 70°C . Por este procedimento obtém-se uma solução sólida de $\text{Ag}_2[\text{HgI}_4]$ e $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$ contendo 43 moles% do composto de cobre, de acordo com os resultados obtidos pelos autores⁽¹⁰³⁾.

O indicador, após a secagem a 70°C , foi colocado no lado externo do frasco interno, como é mostrado na figura 35, com um adesivo à base de cianoacrilato, tendo por nome comercial "Superbonder". Logo após, o frasco externo foi soldado, enquanto o espaço entre os dois frascos era evacuado. Desta forma, a solução não entra em contato com o indicador. Este indicador, à temperatura abaixo de 34°C , portanto à temperatura ambiente, apresenta uma coloração alaranjada, como pode ser visto na figura 36.

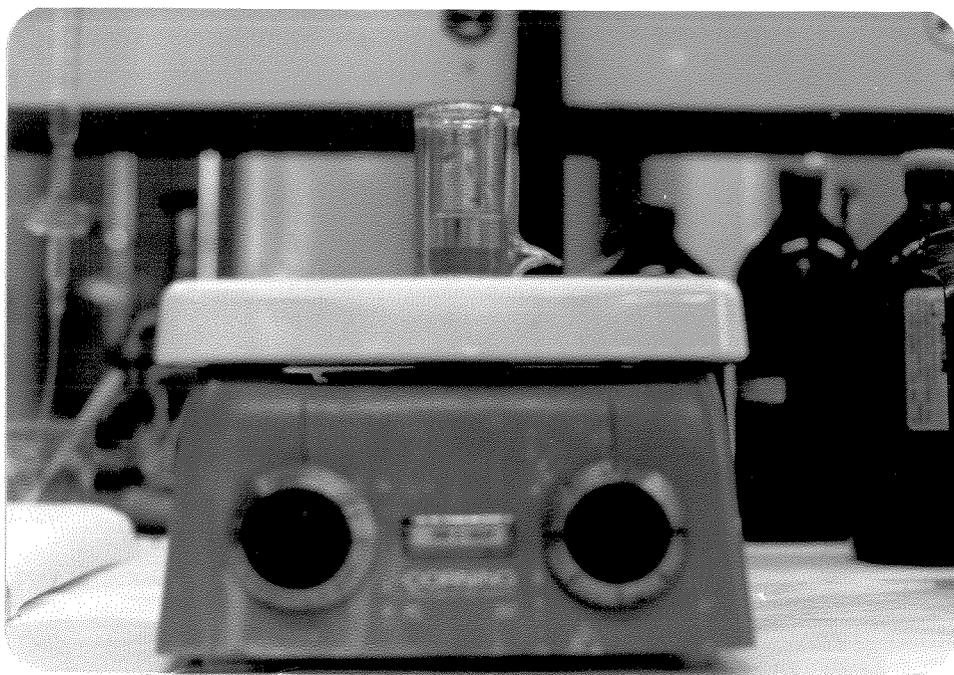


Figura 36. Frasco de titulação, mostrando a cor do indicador termocrômico inorgânico antes do ponto de viragem.

Acima de 34°C , que é a sua temperatura de transição, a solução sólida apresenta uma coloração vermelha púrpura. Tal é mostrado na figura 37.

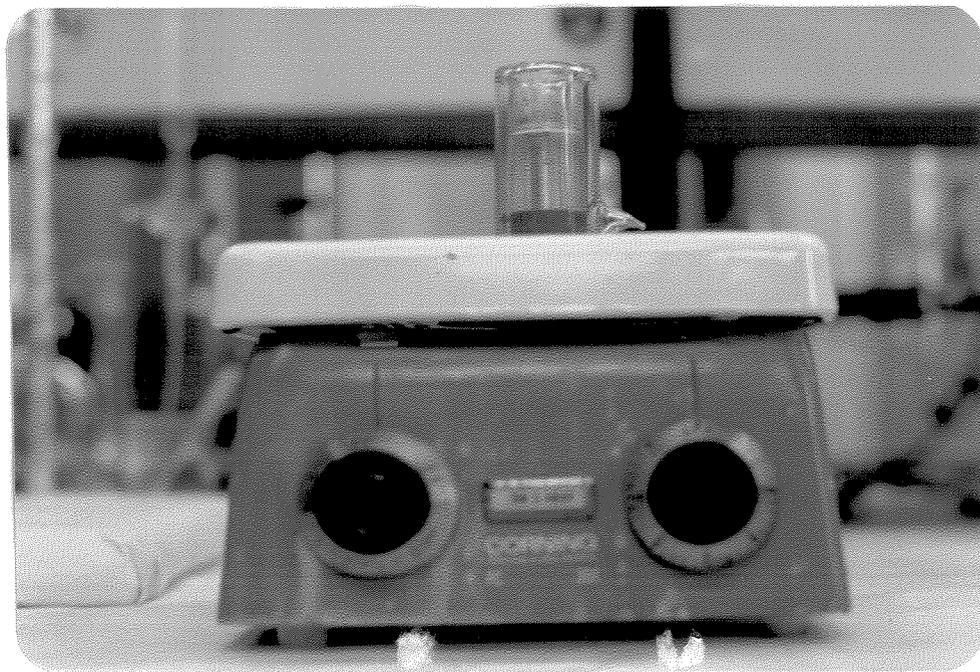


Figura 37. Frasco de titulação mostrando a cor do indicador termocrômico inorgânico no ponto de viragem.

A temperatura de transição deste indicador termocrômico foi determinada por calorimetria de varredura diferencial (DSC). O termograma é mostrado na figura 38.

Com a lavagem do frasco de Dewar com água gelada, a cor original, ou seja, coloração alaranjada, é restabelecida.

Devido a mistura sólida apresentar uma temperatura de transição em torno de 34°C , há a necessidade da reação catalisada nos fornecer um aumento de temperatura da ordem de 10°C ou mais ou menos dependendo da temperatura ambiente. Se tal condição não for alcan-

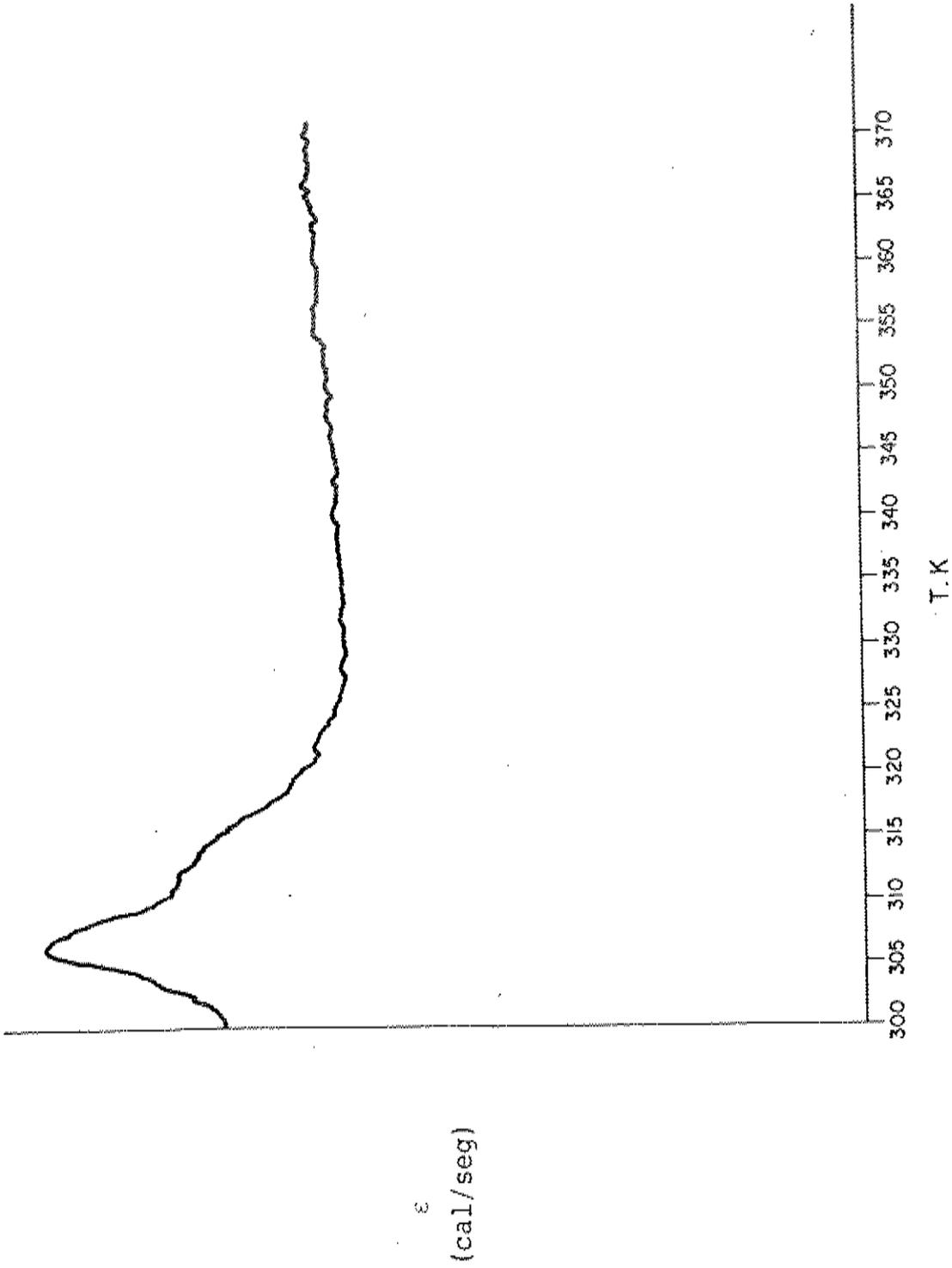


Figura 38. DSC da mistura sólida de Ag_2HgI_4 e Cu_2HgI_4 .

çada, é inviável a utilização deste sistema para indicação do ponto final em titulação termométrica catalítica, a não ser que a solução titulante e titulada sejam aquecidas.

Foram feitos dois procedimentos, ou seja, fluxo constante e manual.

De uma solução 0,1000 M de ácido acétil salicílico, em meio AN:DMSO 2:1 (V/V), tomamos 2,0 ml, completamos o volume para 4 ml com o próprio meio, titulamos com solução n-butóxido de potássio 0,1000 M em n-butanol.

O titulante foi adicionado por:

a) Seringa de fluxo constante, vazão real de 0,400 ml/min, o ponto final detectado tanto pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador, como por indicador termocrômico inorgânico e o tempo de titulação foi registrado por um cronômetro.

b) Bureta comum, gota a gota, e o ponto final detectado por indicador termocrômico inorgânico. Neste procedimento, observamos que a mudança de coloração do indicador no ponto final não ocorre imediatamente após a adição do excesso. Por este motivo, perto do ponto final, adotamos o critério de esperarmos 30 segundos entre uma adição de uma gota e outra. Em ambos os procedimentos é necessário que se faça um branco.

Após o término da titulação, o frasco de Dewar deve ser lavado inicialmente com água gelada, para que o indicador retome a sua cor original, sendo a seguir lavado com água à temperatura ambiente e seco.

O mesmo procedimento foi seguido para o ácido-benzóico, só que aqui a massa do ácido foi dissolvida em 4 ml da mistura AN:DMSO 2:1 (V/V) e titulada com a solução de n-butóxido de potássio

0,1000 M em n-butanol.

Para compararmos os resultados, no caso do ácido acetil salicílico, usamos o método proposto por Connors⁽¹⁰¹⁾. Neste método, uma massa de cerca de 1,50000 g é pesada e colocada em um erlenmeyer de 250 ml com tampa esmerilhada. A seguir, junta-se 50,0 ml de NaOH 0,5 N e ferve-se a mistura brandamente a refluxo, por 10 minutos. Esfriamos e titulamos potenciométricamente o excesso de NaOH 0,5 N com H₂SO₄ 0,5 N. Nesta titulação foi utilizado um potenciômetro "Orion" modelo 701 e eletrodo de vidro combinado marca "Metrohm" modelo G.A. 109, em KCl 6 M.

VI.A.3. Resultados e Discussões

É de se presumir que a exatidão do método depende da inclinação $\Delta T/\Delta V$ no ponto final e a diferença entre a temperatura da solução e o ponto de transição do indicador. Entretanto, no caso estudado em que temos um grande aumento de temperatura no ponto final, rigorosamente não há a necessidade de se controlar a temperatura inicial da solução, como pode ser verificado no gráfico da figura 39, que mostra a influência da temperatura inicial da solução no volume de equivalência da titulação.

Os resultados do gráfico correspondem à titulação de A.A.S., na qual temos como solução titulada 1,00 ml da solução de A.A.S. 0,1016 M em AN:DMSO 2:1 (V/V), diluída com 4,0 ml de AN:DMSO 2:1 (V/V). O titulante é uma solução de n-butóxido de potássio 0,1146 M em n-butanol.

Analisando os dados do gráfico da figura 39, verificamos

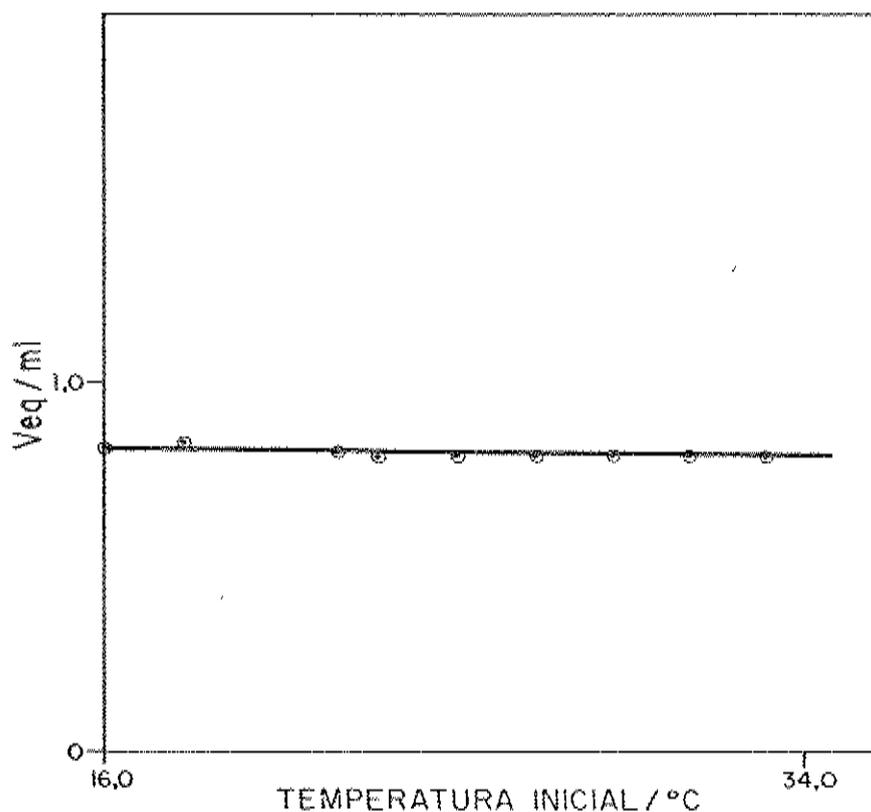


Figura 39. Gráfico mostrando a influência da temperatura inicial da solução titulada no volume de equivalência da titulação.

que não há influência considerável da temperatura inicial da solução titulada no volume de equivalência, dentro dos limites estudados, o que nos leva a concluir que o controle de temperatura, neste caso, pode ser negligenciado. Neste caso, isto já era esperado, uma vez que a variação de temperatura é de 25°C. Entretanto, quando se utilizam reações que apresentam uma menor variação térmica no ponto final da titulação, o efeito da temperatura inicial da solução deve ser estudado.

Na tabela 19 temos os resultados obtidos para a titula-

ção de ácido benzóico com n-butóxido de potássio 0,1000 M em n-butanol. A titulação foi feita em meio de 4,0 ml de AN:DMSO 2:1 (V/V). Nesta titulação comparamos os procedimentos manual e fluxo constante para a adição do titulante.

Tabela 19. Resultados obtidos na titulação de ácido benzóico usando o indicador termocrômico inorgânico na detecção do ponto final

Ácido benzóico adicionado (mg)	Ácido benzóico encontrado (mg)	Erro relativo %
10,02	10,03 (1)	0,1
13,40	13,52 (1)	0,9
19,76	20,08 (1)	1,6
24,55	24,97 (1)	1,7
31,49	32,17 (1)	2,2
32,95	33,66 (1)	2,2
12,59	12,86 (2)	2,1
16,86	17,12 (2)	1,5
17,19	17,55 (2)	2,1
18,77	19,28 (2)	2,7
18,89	19,04 (2)	0,8
35,59	36,05 (2)	1,3

Meio: 4,0 ml da mistura AN:DMSO 2:1 (V/V)

Titulante: n-C₄H₉OK 0,1059 M em n-C₄H₉OH

(1) Titulante adicionado manualmente (gota a gota)

(2) Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min)

No estudo da determinação do ácido acetil salicílico também foram estudados os dois métodos, envolvendo o uso de indicador termocrômico. Entretanto, aqui utilizamos, para fins de comparação, o sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador, para

a detecção do ponto final da titulação. Os resultados deste estudo encontram-se na tabela 20.

Tabela 20. Resultados da titulação de A.A.S. em meio AN:DMSO com n-butóxido de potássio em n-butanol

Método I (mg)	Erro re- lativo %	Método II (mg)	Erro re- lativo %	Método III (mg)	Erro re- lativo %
35,89	-0,39	35,89	-0,39	35,88	-0,42
35,91	-0,33	35,92	-0,31	36,20	-0,47
36,17	0,39	36,19	0,44	36,24	0,58
36,20	0,47	36,20	0,47	35,90	-0,36
36,07	0,11	36,09	0,17	36,19	0,44
35,84	-0,53	35,84	-0,53	35,86	-0,47

$$\bar{X}=(36,0\pm 0,1) \quad E_m=0,37 \quad \bar{X}=(36,0\pm 0,1) \quad E_m=0,39 \quad \bar{X}=(36,0\pm 0,2) \quad E_m=0,46$$

Massa de A.A.S. tomada 36,03 mg (2,00 ml de uma solução 0,10000 M em AN:DMSO 2:1 (V/V), em 4,0 ml de AN:DMSO 2:1 (V/V).

Titulante: solução 0,1130 M de n-C₄H₉OK em n-C₄H₉OH

Método I - Titulante é adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador.

Método II - Titulante é adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min) detecção do ponto final feita por indicador termocrômico inorgânico.

Método III - Titulante é adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico.

Para avaliar a exatidão da determinação de A.A.S. em comprimidos, foi necessário comparar os resultados obtidos pelo método proposto, com os resultados de um método já aceito. Para tanto, foi utilizado o método proposto por Connors⁽¹⁰¹⁾, já descrito anteriormente. Entretanto, antes de aplicá-lo na análise de

preparados farmacêuticos contendo A.A.S., testamos a sua performance na determinação de A.A.S. puro. Os resultados são apresentados na tabela 21.

Tabela 21. Titulação potenciométrica de ácido acetil salicílico

Massa de A.A.S. pesada ⁽¹⁾ (g)	Massa de A.A.S. encontrada (g)	Erro relativo %
1,52971	1,53802	0,54
1,56442	1,55624	-0,52
1,51662	1,52643	0,65
1,28786	1,50036	-0,84
1,54790	1,53552	-0,80
1,59135	1,57560	-0,99
		Em = 0,88 %

(1) A massa foi tratada com 50,0 ml de NaOH 0,5373 N e o excesso titulado com H_2SO_4 0,494 N.

Pretendíamos utilizar o presente método para analisar A.A.S. em seus preparados farmacêuticos. Entretanto, estas preparações normalmente vêm acompanhadas de amido, cafeína, lactose, estereato de magnésio e em tratando-se de preparações infantis, temos também a presença de corantes. Assim, julgamos necessário verificar se essas substâncias interferem no nosso método de análise. Os testes foram efetuados e os resultados encontram-se na tabela 22.

Em função dos resultados obtidos, verificamos que as substâncias que normalmente acompanham o A.A.S. em suas formula-

Tabela 22. Estudo de interferentes (1)

Massa de A.A.S. pesada (mg)	Amido (mg)	Cafeína (mg)	Lactose (mg)	Estearato de magnésio (mg)	Massa de A.A.S. encontrada (mg)	Erro relativo %
51,60	16,30	--	--	--	51,46	-0,27
51,56	18,22	--	--	--	51,64	0,16
51,18	12,68	--	--	--	51,22	0,08
61,73	--	--	12,16	--	60,96	1,25
62,89	--	--	12,57	--	62,76	-0,22
66,21	--	--	13,04	--	66,38	0,26
52,84	--	12,65	--	--	52,92	0,15
53,86	--	14,26	--	--	53,70	-0,30
51,27	--	15,62	--	--	51,14	-0,25
59,65	--	--	--	17,85	59,71	0,10
56,27	--	--	--	13,46	56,38	0,20
51,34	--	--	--	19,20	51,19	-0,29

(1) Titulação de A.A.S. em presença de amido, cafeína, lactose e estearato de magnésio; meio - 4,0 ml de AN:DMSO 2:1 (V/V).
 Titulante: $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OK}$ 0,138 M em $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$. Titulante adicionado gota a gota, ponto final detectado por indicador termocrômico inorgânico.

ções farmacêuticas, não interferem significativamente na sua determinação pelo método proposto. Isto é verdade quando se refere aos teores de interferentes normalmente encontrados nestes produtos.

Procedemos à determinação de A.A.S., em várias preparações farmacêuticas, conforme mostrado na tabela 23.

Uma das vantagens deste métodos é que não há a necessidade de procedermos a extração do A.A.S. e tão pouco transformá-lo em salicilato solúvel em água.

Tabela 23. Resultado das análises

Produto Farmacêutico	A.A.S. presente na fórmula (1) (mg)	Método I (mg)	Método II (mg)	Método III (mg)	Método Comparativo (mg)
"Aspirina"ad.	500	493,6±6,8	498,3±4,4	504,5±4,1	500,3±2,5
"A.A.S."ad.	500	489,6±2,2	493,9±7,0	501,5±1,6	497,5±3,4
"Melhoral"ad.	500	493,3±4,9	497,2±4,5	500,2±2,8	500,0±3,0
"Aspirina"inf.	125	129,4±4,3	124,8±3,4	124,2±4,3	123,0±2,0
"A.A.S."inf.	100	109,1±2,6	104,8±1,4	105,4±2,6	100,0±0,5
"Melhoral"inf.	85	83,2±2,6	88,5±1,1	88,8±0,9	84,5±0,4

(1) De acordo com a fórmula de cada produto.

Método I - Meio: 4,0 ml de AN:DMSO 2:1 (V/V); titulante: $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OK}$ 0,1401 M em $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$. Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita pelo sistema termistor - ponte de Wheatstone-registrador.

Método II - Meio: 4,0 ml de AN:DMSO 2:1 (V/V); titulante: $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OK}$ 0,1401 M em $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$. Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita por indicador termocrômico.

Método III - Meio: 4,0 ml de AN:DSMSO 2:1 (V/V); titulante: $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OK}$ 0,1286 M em $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$. Titulante adicionado gota a gota, detecção do ponto final feita por indicador termocrômico.

Método comparativo - titulação potenciométrica

As amostras foram obtidas a partir de vinte comprimidos, previamente pesados, os quais são triturados e homogeneizados em gral. Do todo homogêneo, pesamos cerca de 50 mg, dissolvemos dire-

tamente no meio de reação e titulamos. Normalmente fizemos a análise em triplicata.

Na figura 40 mostramos algumas curvas de T.T.C. de A.A.S. puro e em seus preparados farmacêuticos.

VI.A.4. Conclusão

O método de indicação do ponto final em T.T.C., utilizando-se de substâncias termocrômicas inorgânicas, mostrou-se ser bem exato, como pode ser visto nas tabelas 19 e 20, que tratam respectivamente da titulação do ácido benzóico e do ácido acetil salicílico. Por outro lado, o método se presta para a determinação de A.A.S. em preparações farmacêuticas, como pode ser visto na tabela 23. Achamos portanto, que este método pode vir a substituir a aparelhagem usual de T.T.C., o que vem tornar a técnica bem mais simples e barata. Esta é a maior vantagem uma vez que a técnica poderá ser realizada sem necessidade de aparelhagem especial, isto é, com uma bureta comum. Neste caso, o titulante é adicionado gota a gota como em qualquer outra titulação envolvendo o uso de indicador. Por outro lado, a substância termocrômica inorgânica, por nós utilizada, é fácil de ser obtida e a montagem do frasco de titulação é bem simples. Convém salientar que o indicador pode ser usado para muitas titulações.

Creemos que este método presta-se para ser aplicado em laboratórios de análise de rotina, como por exemplo na Indústria Farmacêutica. Foi este o motivo que nos levou a utilizarmos esta técnica na análise de preparados farmacêuticos contendo A.A.S.,

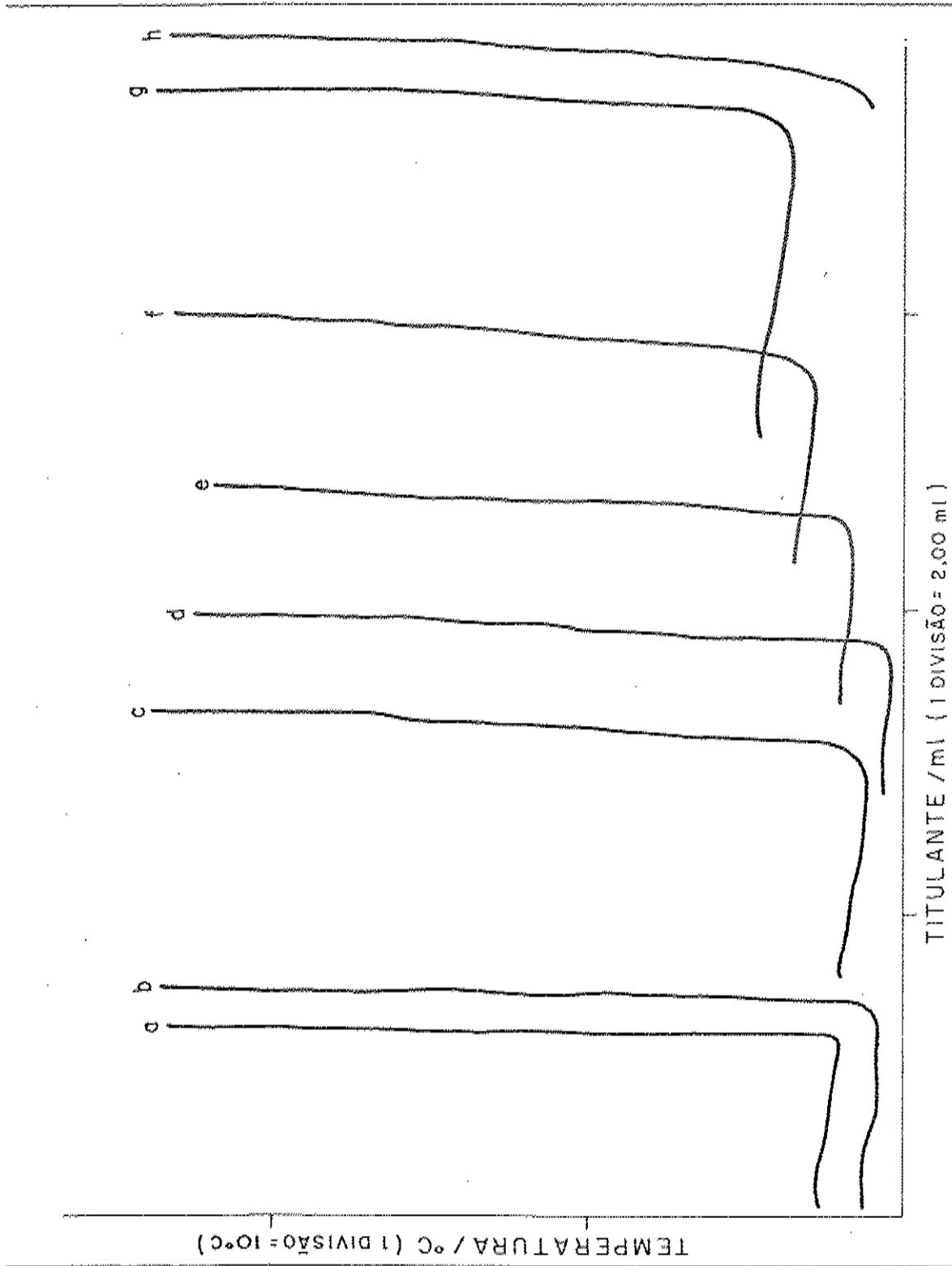


Figura 40. Curvas de titulação termométrica catalítica para A.A.S. a) A.A.S. puro; b) Aspirina adulto; c) A.A.S. adulto; d) Melhoral adulto; e) Aspirina infantil; f) A.A.S. infantil; g) Melhoral infantil; h) branco.

visto que o método não requer a extração da amostra a ser analisada e nem o seu tratamento prévio, ou seja, a transformação do A.A.S. em salicilato solúvel em água, como requerem algumas técnicas. Por outro lado, reafirmamos que a limitação deste método reside na escolha da reação indicadora de ponto final. Tendo em vista que a substância utilizada tem seu ponto de transição em 34°C , temperatura esta na qual a coloração alaranjada da substância termocrômica passa a vermelho púrpura, necessário é, portanto, que a reação indicadora nos forneça uma variação de temperatura da ordem de 10°C ou mais ou menos. Quanto ao controle da temperatura inicial da solução titulada, esta vai depender também da escolha da reação indicadora, sabendo-se que na maioria das vezes a temperatura de trabalho está situada em torno de 25°C .

VI.B. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA UTILIZANDO INDICADOR TERMOCRÔMICO ORGÂNICO

VI.B.1. Considerações Gerais

O termo "cristal líquido"⁽¹⁰⁴⁾ foi usado pela primeira vez por Lehmann em 1890, para designar o estado da matéria intermediário entre um sólido cristalino e uma fase líquida ordinária (isotrópica).

A sua descoberta porém é devida à Friedrich Reinitzer, um botânico austríaco que preparou o benzoato de colesterila e verificou suas propriedades. Este composto, quando aquecido a 145°C , sua estrutura cristalina colapsa, formando um líquido turvo (cristal líquido). A 179°C , o líquido turvo desaparece para dar origem

a um líquido isotrópico, sendo que este processo é reversível. Reinitzer observou que a cor do líquido turvo alterava de vermelho para azul, com o aumento da temperatura e de azul para vermelho quando o sistema era resfriado.

Cristais líquidos apresentam comportamento de líquidos ordinários, como por exemplo, adotam a forma do recipiente que os contém. Por outro lado, exibem propriedades anisotrópicas como as do sólido cristalino. Podemos, desta forma, definir cristais líquidos como "fases fluídas condensadas com anisotropia espontânea". São também chamados por mesofases mesomórficas, por causa da sua natureza intermediária.

Muitos compostos orgânicos formam líquidos cristalinos quando seu cristal sólido é aquecido a temperaturas acima do seu ponto de fusão. A fase mesomórfica aparece como um fluido mais ou menos viscoso, o qual pode ser identificado visualmente pela sua turbidez característica ou com um polarímetro, devido a sua birrefringência óptica.

A altas temperaturas, em alguns casos, podem ocorrer transições para outras mesofases. Tais cristais líquidos, que são formados quando a temperatura é variada, são chamados termotrópicos. Muitos compostos formam um segundo tipo de mesofase, quando um solvente é adicionado. Uma quantidade de solvente, acima da concentração crítica, provoca uma transformação para um líquido ordinário (isotrópico). Fases mesomórficas deste tipo são chamadas liotrópicas e são formadas, por exemplo, com ácidos graxos de cadeia longa em meio aquoso ou outro solvente polar.

Há três tipos básicos de cristais líquidos, de acordo com Friedel⁽¹⁰⁵⁾, que são denominados como sméticos, nemáticos e

colestéricos. Uma representação esquemática destes três tipos básicos é dada na figura 41.

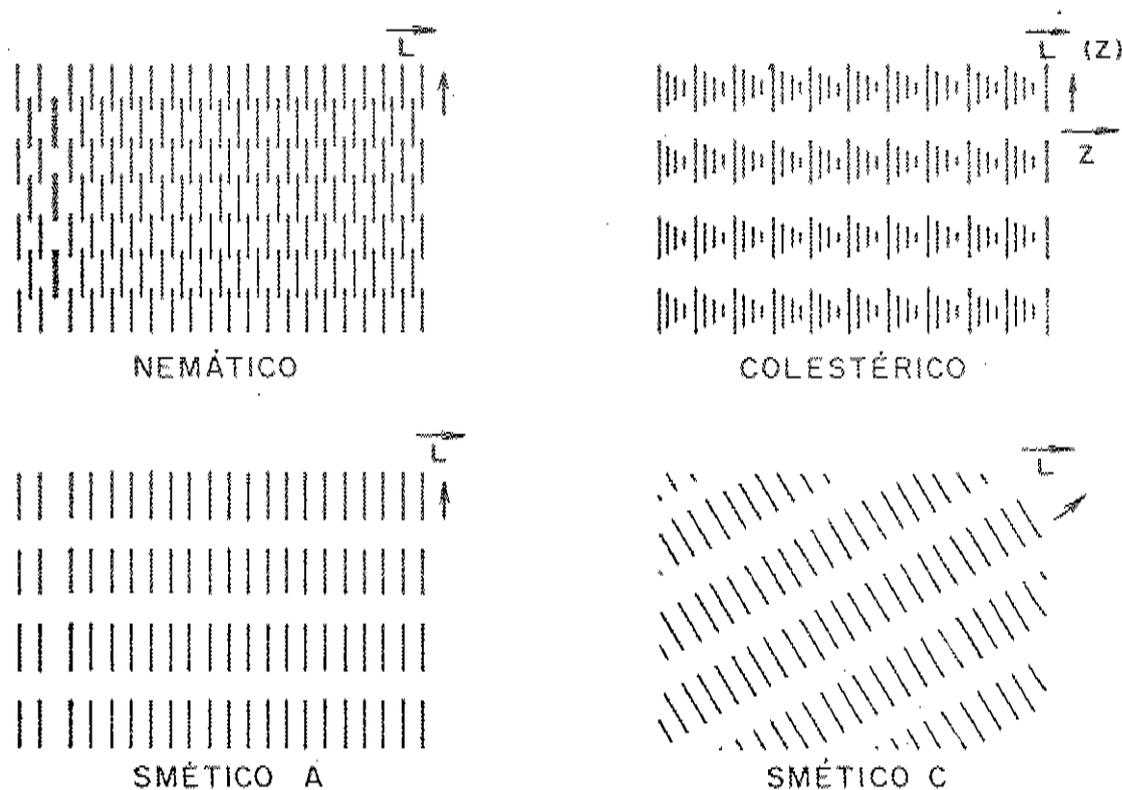


Figura 41. Estrutura de cristais líquidos.

Muitos compostos não formam somente um destes três tipos, mas exibem acima do ponto de fusão um ou mais tipos sméticos e a altas temperaturas ambos os tipos, nemáticos ou colestéricos. A mesofase colestérica é formada por compostos ou misturas de moléculas quirais. Os vários tipos de mesofases diferem na ordem de orientação do arranjo molecular. Em todos os casos conhecidos até o presente momento, este ordenamento é apolar e não apresenta comportamento ferroelétrico.

a) Cristais líquidos sméticos

A classificação de Friedel foi estendida para explicar o fato da existência de vários tipos de cristais líquidos sméticos, denominados por A, B, C, etc. Todos os cristais líquidos sméticos apresentam uma estrutura em camadas. Os centros de gravidade das moléculas alongadas são arranjadas em planos equidistantes. Os arranjos moleculares são paralelos a uma direção preferida \vec{L} a qual pode ser normal ao plano (smético A) ou inclinada por um certo ângulo (smética C). O arranjo dos centros de gravidade dentro do plano pode ser regular ou ao acaso. Os vários tipos sméticos podem ser distinguidos por sua textura em um polarímetro e o seu ordenamento molecular pode ser obtido por difração de raio-X. De acordo com Demus et alii⁽¹⁰⁶⁾, há pelo menos sete tipos diferentes de cristais líquidos sméticos. Um exemplo típico de um composto que forma fase smética é o p-(p'-etoxibenzilidenoamino)-etilcinamato, que apresenta a seguinte sequência de fases: 81°C (smético B); 118,5°C (smético A); 156,5°C (nemático); 159°C (isotrópico).

b) Cristais líquidos nemáticos

Cristais líquidos nemáticos diferem de líquidos ordinários por uma ordem de alinhamento orientacional, do arranjo molecular, o qual é caracterizado por um princípio simples: média sobre tempo ou espaço. Os arranjos moleculares são alinhados paralelamente a uma direção preferida \vec{L} , como nenhum efeito ferroelétrico pode ser detectado o alinhamento é assumido como sendo não polar. Os centros de gravidade são distribuídos ao acaso como em um líquido ordinário. As moléculas são permitidas girarem livremente em torno de si mesmas. Partindo desta estrutura, cristais líquidos

são uniaxiais com respeito a todas propriedades físicas. O eixo de simetria é idêntico ao eixo preferido da estrutura \vec{L} .

De acordo com a teoria molecular estatística, a anisotropia da polarizabilidade molecular é a responsável pela ocorrência da fase de líquido cristalino. A anisotropia da polarizabilidade, por sua vez, é a primeira aproximação determinada pela anisotropia geométrica. O comportamento mesomórfico é encontrado em compostos com moléculas alongadas, as quais na maioria dos casos consistem de sistemas aromáticos conjugados. Existe uma relação entre estrutura molecular e comportamento mesomórfico, o que não cabe ser aqui discutido. Muitos compostos que formam cristais líquidos nemáticos apresentam a seguinte estrutura:



Em que R e R_1 são unidades terminais tais como metil, etil, metóxi, etóxi, halogênios, etc.

O grupo central X, que faz a ligação entre os dois anéis fenil, é listado na tabela 24.

Tabela 24. Grupos ligadores mais importantes

Grupo X	Nome
-N=N-	azobenzeno
-N=NO-	azoxibenzeno
-CH=CH-	estibenos (trans)
-C≡C-	tolanos
-CH=N(O)-	nitrones
-CH=N-	bases de schiff
-O-CO-	fenil benzoatos

Um cristal líquido nemático muito importante, à temperatura ambiente, é o MBBA, ou seja, 4-metóxi-4'-n-butil-benzidenoanilina, cuja faixa nemática é de 21 a 48°C.

c) Cristais líquidos colestéricos

Cristal líquido colestérico é a denominação dada a compostos derivados do colesterol, quando os mesmos não exibem fases mesomórficas. A estrutura pode ser descrita como sendo nemática enrolada. Considerando um certo plano, as moléculas são alinhadas paralelamente para uma direção preferida \vec{L} , como em uma fase nemática. Quando procede na direção normal para o plano, gira continuamente, como resultado temos uma estrutura em hélice, cujo eixo pode ser descrito por único vetor \vec{Z} . O "pitch" p da estrutura é definido pela distância que é necessária para girar \vec{L} por 2π quando procede ao longo de Z . O valor de p varia amplamente e normalmente cai entre 0,2 μm a valores maiores. Um infinito "pitch" corresponde a uma estrutura nemática e pode ser ajustado a um valor desejado pela adição de quantidades apropriadas de compostos quirais, para um cristal líquido nemático. A rotação da hélice pode ser à esquerda (tipo leve) ou à direita (tipo dextro). Muitos compostos derivados do colesterol são do tipo leve, entretanto, o cloreto de colesterila é do tipo dextro. Não existem correlação entre o sinal da atividade óptica da molécula livre (i.e., em solução diluída), com o tipo da hélice colestérica. Entretanto, uma condição necessária para a formação de mesofases colestéricas é que a molécula seja quiral.

Os cristais líquidos são divididos em duas categorias: termotrópicos e liotrópicos. A categoria mais estudada é a termo-

trópica. Os cristais líquidos termotrópicos apresentam algumas propriedades importantes que são⁽⁹¹⁾:

1) Formação de monocristais (ordem molecular em uma dimensão), com a aplicação de um campo magnético ordinário ou elétrico.

2) Atividade óptica dos cristais líquidos colestéricos, de magnitude sem paralelismo em outro estado da matéria.

3) sensibilidade da estrutura colestérica à alteração de temperatura, que resulta em alteração de cor.

A sensibilidade dos cristais líquidos colestéricos à temperatura e à radiação tornou-os largamente utilizados como sensores de temperatura.

Compostos colestéricos com "pitches" menores que 700 nm, exibem uma fase reconhecida recentemente, chamada de fase azul, a qual está situada entre a região isotrópica e a colestérica. A faixa de temperatura desta fase é em torno de 1°C, na qual reflete a cor da luz, que está associada com a estrutura cúbica apresentando um parâmetro cristalino dela mesma com o "pitch" da fase colestérica.

Empregamos uma fita de cristal líquido, como sensor de temperatura, para indicação do ponto final em T.T.C. É objetivo deste trabalho viabilizar esse uso, desenvolver o frasco de titulação adequado para tal, bem como verificar quais as reações de indicação do ponto final que podem ser utilizadas. Pretendemos, também, procedermos a aplicação deste método.

Ao contrário do que vimos no item VI.A., onde havia a necessidade de termos um aumento de temperatura no ponto final da ordem de 10°C, para que a indicação fosse viável, neste método tal

exigência não é necessária, visto que o cristal líquido "sente" temperaturas da ordem de mais ou menos 1°C . Por isso, achamos que o campo de atuação deste tipo de substância termocrômica (cristal líquido) é mais amplo que a mistura sólida de Ag_2HgI_4 e Cu_2HgI_4 contendo 43 moles% do último.

Para tanto, em uma extensa revisão feita por Greenhow⁽⁴⁶⁾, encontramos várias reações catalisadas indicadoras de ponto final em T.T.C., as quais poderão ser utilizadas com esta categoria de indicador termocrômico.

O método de indicação do ponto final em T.T.C., utilizando substâncias termocrômicas orgânicas, foi aplicado na análise de cafeína pura, em preparações farmacêuticas e no refrigerante "Coca-Cola". Foi aplicado também na determinação de ácido acetil salicílico (A.A.S.) puro e em preparações farmacêuticas.

Cafeína é um estimulante presente em muitos preparados farmacêuticos, em produtos alimentares e em bebidas (alcoólicas e não alcoólicas). Nas preparações farmacêuticas sua presença é quase que obrigatória nas formulações analgésicas e antipiréticas.

Vários são os métodos utilizados na sua análise, tais como: titulação complexométrica, espectrofotometria UV, nefelometria, titulação potenciométrica, gravimetria e cromatografia, como pode ser visto na revisão feita por Connors⁽¹⁰¹⁾. Recentemente, Fogg et alii⁽¹⁰⁷⁾ desenvolveram um método para a determinação de cafeína usando a técnica voltamétrica por injeção de fluxo. Mayana e Jayaram⁽¹⁰⁸⁾ determinaram cafeína em bebidas não alcoólicas, em chá, café e em preparações farmacêuticas por titulação usando o N-cloro-p-toluenossulfonamida (CAT).

No presente trabalho, determinamos cafeína pura, em pre-

parações farmacêuticas e em "Coca-Cola", por titulação termométrica catalítica, usando como titulante uma solução de ácido acético glacial e anidrido acético na proporção de 98:2 (V/V). O meio de reação consiste de uma suspensão de quinidrona em anidrido acético (0,8 g de quinidrona em 5 ml de anidrido acético), que constitui uma combinação de solvente e titulante obtida por Greenhow⁽¹⁰⁹⁾, que leva a uma curva de titulação bem favorável, como pode ser visto na figura 42.

Nesta titulação a reação de indicação do ponto final é a acetilação da quinidrona, a qual tem um aumento de temperatura no ponto final da ordem de 4°C.

VI.B.2. Parte Experimental

VI.B.2.a. Aparelhagem

Nas titulações termométricas o titulante foi adicionado da forma como descrito a seguir, bem como a velocidade de adição do titulante. As titulações potenciométricas, as quais foram desenvolvidas como método comparativo, foram feitas de acordo com Wimer⁽¹¹⁰⁾. Para tanto, utilizamos o eletrodo de vidro "Beckmann" modelo 39.000, como indicador e como eletrodo de referência o de calomelano "Beckmann", ambos com solução saturada de cloreto de potássio.

O potencial foi medido através de um potenciômetro "Orion" modelo 701. Na determinação de cafeína na "Cola-Cola", utilizamos como método comparativo o proposto por Parke et alii⁽¹¹¹⁾. Para tanto utilizamos um espectrofotômetro UV/visível "Zeiss" modelo P.M.Q. II.

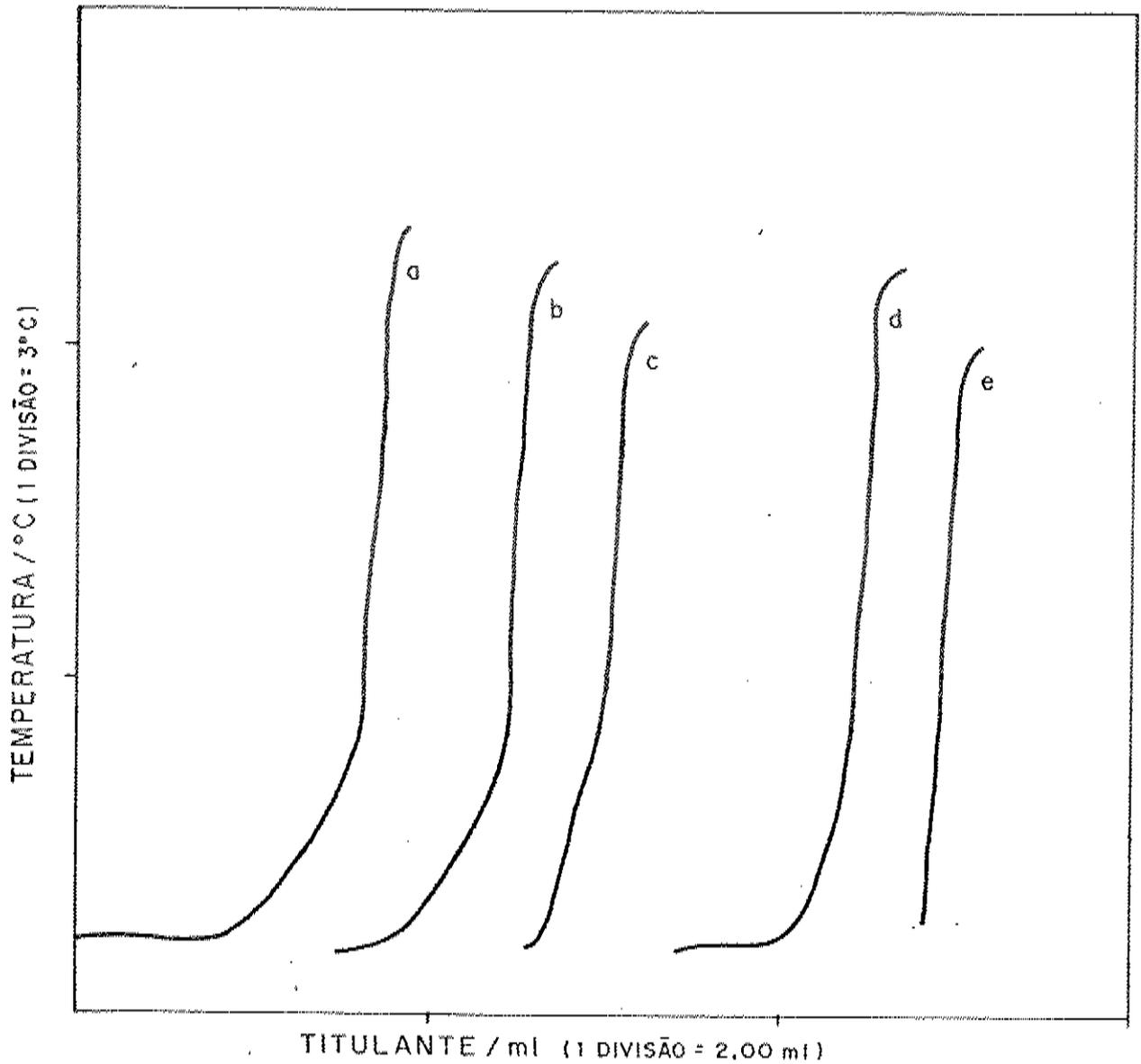


Figura 42. Curvas de titulação termométrica catalítica para a cafeína. a) Cafeína pura; b) Melhoral adulto; c) Coristina d; d) "Coca-Cola"; e) branco.

As titulações potenciométrica do ácido acetil salicílico foram efetuadas tal como descrito em VI.A.2.a.

O frasco usado para titulação consiste de um bēquer com

capacidade de 20,0 ml. Pelo lado de fora deste, afixamos a fita e introduzimos o b quer com a mesma afixada dentro de um outro b quer e colamos a sua extremidade com "Araldite". Este frasco de titula o pode ser visto nas figuras 43 e 44. A finalidade de colocarmos o b quer com a fita afixada dentro de um outro b quer   para evitar que a mesma molhe e, com isto, seja destruída. Resta esclarecer que não há outro cuidado a ser observado que não seja o descrito acima.

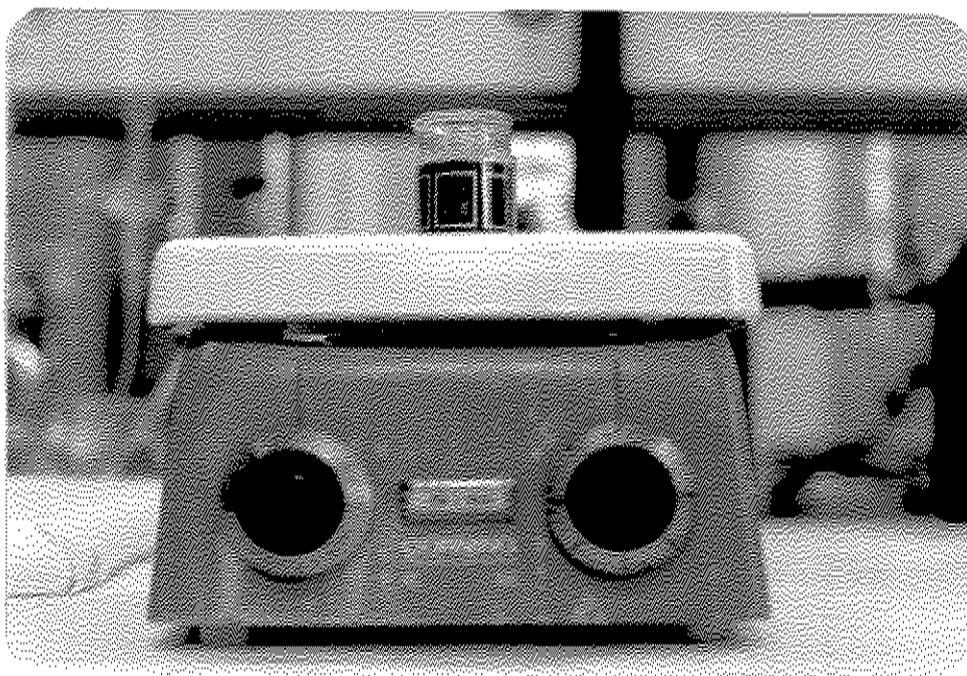


Figura 43. Frasco de titula o mostrando o comportamento do indicador termocrômico orgânico antes do ponto de viragem.

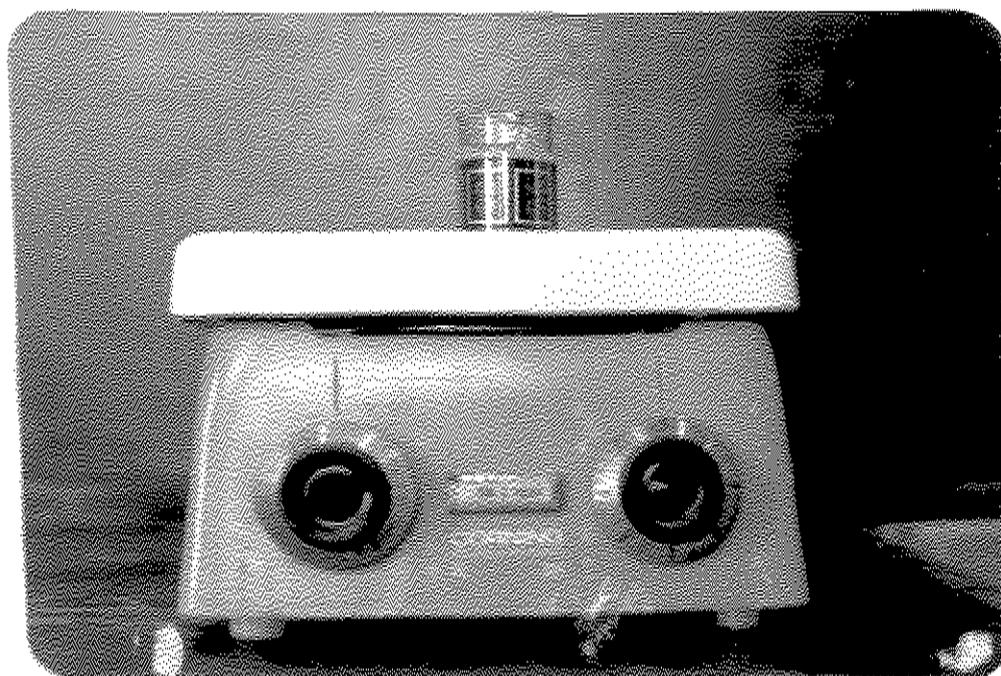


Figura 44. Frasco de titulação mostrando o comportamento do indicador termocrômico orgânico no ponto de viragem.

VI.B.2.b. Reagentes Utilizados

- Hidróxido de amônio P.A. "Merck"
- Clorofórmio P.A. "Merck"
- Ácido acetil salicílico P.A. "Merck"
- Cafeína anidra R.P.E. "Carlo Erba"
- Ácido acético glacial "Merck"
- Anidrido acético P.A. "Merck"
- Quinidrona R.P. "Carlo Erba"
- Ácido perclórico R.P.E. "Carlo Erba"
- Ftalato ácido de potássio P.A. "Baker"

- n-butanol P.A. "Merck"
- Acrilonitrila P.A. "Merck"
- Dimetilssulfóxido P.A. "Merck"
- Potássio metálico comercial
- Ácido benzóico R.P.E. "Carlo Erba"

O indicador termocrômico orgânico consiste de uma fita utilizada para controlar temperatura de aquário. Esta fita provavelmente é constituída de uma mistura de aril e/ou alquil coles-terilas e pode ser encontrada em qualquer loja que trabalhe com material de aquário.

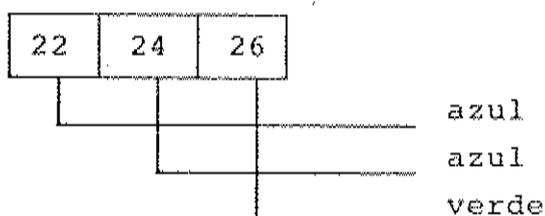
Quanto ao mecanismo de indicação, temos que considerar o seguinte: "o ponto de viragem" é aquele no qual o ponto indicativo da temperatura anterior "a viragem" está completamente azul, assim como a imediatamente superior.

Em seguida esquematizamos uma ilustração que vem a explicar melhor tal fato.

a) Início da titulação



b) Término da titulação



A solução de n-butóxido de potássio 0,1 M em n-butanol foi preparada e padronizada conforme descrito em IV.B.3.

A solução de ácido perclórico foi preparada pela dissolução de uma quantidade suficiente do ácido, para termos uma solução em torno de 0,1 M, em ácido acético glacial e anidrido acético na razão de 98:2 (V/V). Esta solução foi posteriormente padronizada com ftalato ácido de potássio em meio ácido acético glacial, usando como indicador a solução de cristal violeta a 0,5% em ácido acético glacial, segundo o procedimento recomendado por Kolthoff e Brucrenstein⁽¹¹²⁾. Esta solução tem que ter a sua concentração corrigida, quando a temperatura de trabalho tiver $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de diferença da temperatura de padronização. Para tanto, lançamos mão da seguinte expressão:

$$M_{T_1} = \frac{M_{T_0}}{1+0,0011(T_1-T_0)} \quad (38)$$

onde, M_{T_1} = molaridade corrigida para a temperatura de trabalho

M_{T_0} = molaridade na temperatura de padronização

T_1 = temperatura de trabalho

T_0 = temperatura de padronização

As soluções utilizadas para a titulação de ácido acetil salicílico, utilizando indicador termocrômico orgânico, foram descritas em VI.A.2.b.

O meio de reação para a titulação termométrica catalítica da cafeína consiste de uma suspensão de quinidrona em anidrido acético (0,8 mg de quinidrona para 5 ml de anidrido acético). Esta suspensão deve ser preparada no momento de uso⁽¹⁰⁹⁾.

VI.B.2.c. Procedimento

Uma solução de cafeína 0,1000 M em quinidrona e anidrido acético foi preparada. Desta solução tomamos várias alíquotas de 2,00 ml e titulamos com a solução de ácido perclórico 0,1000 M em ácido acético glacial e anidrido acético na proporção de 98:2 (V/V), segundo o procedimento descrito por Greenhow⁽¹⁰⁹⁾.

Primeiramente, o titulante foi adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min) e o ponto final detectado pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador ou a solução titulante foi adicionada a fluxo constante (0,400 ml/min) e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico (cristal líquido) e o tempo de titulação registrado por cronômetro. Outro procedimento adotado foi a titulação manual, na qual o titulante é adicionado gota a gota através de uma bureta comum. Neste processo, também adotamos o critério de esperarmos 30 segundos entre a adição de uma gota e outra, perto do ponto final. Em ambos os casos é necessário fazer uma correção de uma titulação em branco. Determinamos também cafeína pura e em preparações farmacêuticas usando o método proposto por Wimer⁽¹¹⁰⁾, que consiste em titular potenciométricamente cafeína, com solução de ácido perclórico, já descrita, em meio anidrido acético.

Na determinação da cafeína no refrigerante "Coca-Cola", fez-se necessário uma extração prévia da mesma. Para tal, utilizamos o método proposto por Mayana e Jayaram⁽¹⁰⁸⁾. Este método consiste na extração da cafeína com hidróxido de amônio ($d_R = 0,895$) com quatro porções de 20 ml de clorofórmio, e posteriormente evaporado em banho maria. Como método comparativo na deter-

minação de cafeína no refrigerante "Coca-Cola", usamos espectrofotometria UV a 273 nm, de acordo com o proposto por Parke et alii (111).

Quanto à determinação de A.A.S. puro e em preparações farmacêuticas, o procedimento adotado foi o mesmo descrito em VI.A.2.c.

VI.B.3. Resultados e Discussões

A titulação de uma solução de cafeína em meio de quínidrona (0,8 g) e anidrido acético (5 ml), com ácido perclórico 0,1000 M em ácido acético glacial e anidrido acético na proporção de 98:2 (V/V), foi realizada com a finalidade de avaliar os resultados obtidos com este tipo de indicador. Os resultados encontram-se na tabela 25.

A fim de avaliar a exatidão do método de análise da cafeína nos materiais estudados, a determinação da cafeína foi também realizada por um método já aceito. O método aceito, usado para comparar com os resultados do nosso método foi a titulação potenciométrica da cafeína em meio não aquoso, de acordo com o procedimento proposto por Wimer⁽¹¹⁰⁾. Neste método a cafeína é titulada potenciometricamente com solução de ácido perclórico 0,1000 M em ácido acético glacial e anidrido acético na proporção de 98:2 (V/V). O meio de titulação é o anidrido acético.

Como eletrodo indicador utilizamos o de vidro e como referência o de calomelano em perclorato de lítio 0,1 M em anidrido acético.

Tabela 25. Titulação de uma solução de cafeína^a com HClO₄ 0,1000 M com o uso de substância termocrômica orgânica como indicador

Método I (mg)	Erro re- lativo %	Método II (mg)	Erro re- lativo %	Método III (mg)	Erro re- lativo %
38,49	-0,85	38,46	-0,93	38,51	-0,80
38,53	-0,75	38,53	-0,75	39,20	0,98
39,19	0,95	39,17	0,90	39,08	0,67
38,85	0,08	38,85	0,08	38,49	-0,85
39,00	0,46	39,00	0,46	38,67	-0,39
38,62	-0,52	38,64	-0,46	38,63	-0,49
$\bar{X}=(38,8\pm 0,3)$ Em=0,60					
$\bar{X}=(38,8\pm 0,3)$ Em=0,60					
$\bar{X}=(38,8\pm 0,3)$ Em=0,70					

^a 2,00 ml de uma solução de cafeína 0,1000 M em anidrido acético (38,82 mg).

Meio: 5,0 ml de anidrido acético e 0,8 g de quinidrona. Titulante: solução de HClO₄ 0,1130 M em ácido acético glacial:anidrido acético 98:2 (V/V).

Método I - Titulante é adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador.

Método II - Titulante é adicionado a fluxo constante (0,400ml/min), detecção do ponto final feita por indicador termocrômico orgânico.

Método III: Titulante é adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico.

Algumas titulações, feitas com a cafeína pura, serviram para testar a performance do método. Os resultados encontram-se na tabela 26.

Tabela 26. Titulação potenciométrica da cafeína

Cafeína ^a (mg)	Erro relativo (%)
38,82	----
38,69	-0,33
38,90	0,21
38,95	0,33
38,49	-0,85
38,84	0,05
$\bar{X}=(38,8\pm 0,2)$	Em = 0,30

^a 2,00 ml de uma solução de cafeína 0,1000 M em anidrido acético (38,82 mg). Titulante: solução de HClO₄ 0,1130 M em ácido acético e anidrido acético 98:2 (V/V). Meio: 8,0 ml de anidrido acético.

Como já visto anteriormente, a cafeína tem sua presença quase que obrigatória nas formulações analgésicas e antipiréticas. Assim, as formulações de cafeína contêm, além da mesma, A.A.S., amido e às vezes estearato de magnésio. Algumas formulações podem ter outros constituintes, além dos já citados, porém estão presentes em quantidades tão pequenas que, se houver interferência, esta estará situada na faixa de erro do método de análise usado. Na tabela 27 temos os resultados dos testes de interferência realizados.

Em vista dos resultados obtidos, podemos verificar que os constituintes normalmente encontrados nas formulações farmacêuticas, não interferem significativamente na sua determinação nos teores normalmente presentes.

Tabela 27. Estudo de interferentes⁽¹⁾

Cafeína pesada (mg)	Amido (mg)	A.A.S. (mg)	Estearato de magnésio (mg)	Cafeína encontrada (mg)	Erro relativo (%)
37,87	14,29	--	--	37,57	-0,99
35,43	16,39	--	--	35,23	-0,51
39,12	15,84	--	--	39,35	0,59
36,81	--	560,19	--	36,98	0,46
35,49	--	584,30	--	35,67	0,51
34,56	--	570,26	--	34,82	-0,40
37,45	--	--	11,80	37,32	-0,35
38,36	--	--	12,12	38,55	0,50
37,26	--	--	11,04	36,94	-0,86

(1) Titulação de cafeína em presença de amido, A.A.S. e estearato de magnésio. Meio: 5 ml de anidrido acético e 0,8 g de quini-drona. Titulante: solução de HClO_4 0,1097 M em ácido acético glacial e anidrido acético 98:2 (V/V), adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico.

Foram feitas determinações de cafeína em várias preparações farmacêuticas. Como já visto anteriormente, não há a necessidade da sua extração prévia. As amostras foram obtidas a partir de vinte comprimidos, previamente pesados, os quais foram triturados e homogeneizados em gral. Do todo homogêneo, pesamos cerca de 500 mg e dissolvemos diretamente no meio de reação e titulamos. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados encontram-se na tabela 28.

Algumas curvas de T.T.C. da cafeína foram mostradas na figura 42.

Tabela 28. Resultados das análises de cafeína, efetuadas em preparações farmacêuticas

Produto	Cafeína presente ¹ /mg	Método I /mg	Método II /mg	Método III /mg	Método comparativo /mg
Melhoral ad.	30	28,0±0,4	28,6±0,7	28,8±0,1	29,0±0,7
Coristina d	30	27,4±0,1	27,3±0,1	27,8±0,2	27,4±0,3

¹ De acordo com a fórmula de cada produto.

Meio de titulação: 5 ml de anidrido acético e 0,8 g de quinidrona. Titulante: solução de HClO₄ 0,1097 M em ácido acético glacial e anidrido acético 98:2 (V/V).

Método I: Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador.

Método II: Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita por indicador termocrômico orgânico.

Método III: Titulante adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico.

Método comparativo : Titulação potenciométrica em meio anidrido acético.

Estudamos também a aplicação do método na determinação de cafeína no refrigerante que leva o nome comercial de "Coca-Cola". Para determinarmos cafeína na "Coca-Cola" há a necessidade de realizarmos a sua extração, a qual já foi anteriormente descrita e que consiste na sua extração com clorofórmio, em meio amoni-

cal. Fizemos um teste de recuperação da mesma após extração, cujo resultado encontra-se na tabela 29. A recuperação da cafeína após a extração foi de $(99,3 \pm 0,2)\%$, o que vem a mostrar que este método é bastante eficiente.

Tabela 29. Teste de recuperação da cafeína após extração⁽¹⁾

Cafeína pesada (mg)	Cafeína recuperada (mg)	Cafeína recuperada %
25,48	25,32	99,4
26,84	26,60	99,1
27,64	27,45	99,3
$\bar{X} = (99,3 \pm 0,2)$		

- (1) A cafeína foi extraída e titulada com HClO_4 0,146 M em ácido acético glacial e anidrido acético 98:2 (V/V), em meio de 5 ml de anidrido acético e 0,8 g de quinidrona. O titulante foi adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico.

A determinação da cafeína na "Coca-Cola" pelo método comparativo⁽¹¹¹⁾ foi feita da seguinte forma: uma alíquota de 5,0 ml foi tratada com 10 ml de NH_4OH ($d_R=0,895$) e submetida a extração com quatro porções de 20 ml de clorofórmio. O solvente foi evaporado em banho-maria. O resíduo foi dissolvido com água destilada em um balão de 100,0 ml cujo volume foi completado até a marca. Fizemos a medida de transmitância em espectrofotômetro usando cela de quartzo de 1,0 cm de espessura, no comprimento de onda de 273 nm.

Para procedermos a T.T.C., fizemos a extração a partir de uma alíquota de 100,0 ml. O resíduo foi dissolvido em 5 ml de ani-

drido acético e transferido diretamente para o frasco de titulação. Adicionou-se 0,8 g de quinidrona e titulou-se com solução de HClO_4 0,1 M em ácido acético glacial e anidrido acético 98:2 (V/V). Os resultados encontram-se na tabela 30.

Tabela 30. Determinação de cafeína na "Coca-Cola"

Produto	Cafeína presente (1) ($\mu\text{g/ml}$)	Método I ($\mu\text{g/ml}$)	Método II ($\mu\text{g/ml}$)	Método III ($\mu\text{g/ml}$)	Método comparativo ($\mu\text{g/ml}$)
"Coca-Cola"	100	93,4 \pm 0,2	93,8 \pm 0,1	94,0 \pm 0,1	95,4 \pm 0,4

(1) Teor máximo tolerado pela Organização Mundial de Saúde (113)

Meio: 5 ml de anidrido acético e 0,8 g de quinidrona. Titulante: solução de HClO_4 0,1108 M em ácido acético glacial e anidrido acético 98:2 (V/V).

Método I: Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita por termistor-ponte de Wheatstone-registrador.

Método II: Titulante adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min), detecção do ponto final feita por indicador termocrômico orgânico.

Método III: Titulante adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico.

Método comparativo . Determinação espectrofotométrica a 275 nm.

Determinamos A.A.S. puro e em preparações farmacêuticas utilizando como titulante a solução de n-butóxi de potássio 0,1 M em n-butanol e como meio de reação a mistura AN:DSMO 2:1 (V/V), descrita em VI.A.1.

Inicialmente, titulamos A.A.S. puro, cujos resultados

encontram-se na tabela 31.

A seguir temos na tabela 32 os resultados de determinação de A.A.S. em preparações farmacêuticas. O procedimento para a obtenção das amostras e a quantidade tomada para análise já foram descritas em VI.A.3.

Tabela 31. Titulação de uma solução de ácido acetil salicílico⁽¹⁾ com n-butóxi de potássio⁽²⁾

Método I (mg)	Erro relativo %	Método II (mg)	Erro relativo %
38,10	0,13	37,97	-0,21
38,18	0,34	38,12	0,18
37,96	-0,24	37,89	-0,42
38,22	0,45	38,90	-0,39
38,15	0,26	38,16	0,29
37,92	-0,34	38,21	0,42
$\bar{X} = (38,1 \pm 0,1)$	$Em = 0,29$	$\bar{X} = (38,0 \pm 0,1)$	$Em = 0,32$

(1) 2,00 ml de uma solução 0,1056 M (38,05 mg) em AN:DMSO 2:1 (V/V)

(2) solução de n-C₄H₉OK 0,1167 M em n-C₄H₉OH

Meio: 2 ml da msitura AN:DMSO 2:1 (V/V)

Método I: Titulante é adicionado a fluxo constante (0,400 ml/min) e detecção do ponto final feita pelo sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador.

Método II: Titulante é adicionado gota a gota e o ponto final detectado por indicador termocrômico orgânico.

Tabela 32. Resultados das análises de A.A.S. em preparações farmacêuticas

Produto	A.A.S. (1) presente (mg)	Método I (mg)	Método compara- tivo (mg)
"Aspirina" ad.	500	494,2±0,5	494,0±7,0
"A.A.S." ad.	500	500,0±0,3	490,0±2,0
"Aspirina" inf.	125	121,2±0,8	127,0±2,0
"Melhoral" inf.	85	85,5±0,9	85,0±1,0

(1) Quantidade presente de acordo com a fórmula do produto.

Meio de titulação: 4 ml de AN:DSMO 2:1 (V/V). Titulante: $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OK}$ 0,1154 M em $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$.

Método I: titulante adicionado gota a gota, detecção do ponto final feita por indicador termocrômico orgânico.

Método comparativo : Titulação potenciométrica.

VI.B.4. Conclusão

Os estudos realizados nas partes VI.A. e VI.B. desta tese, mostram a possibilidade de uso de substâncias termossensíveis para indicação do ponto final da titulação. Estas substâncias termossensíveis inorgânicas ou orgânicas (cristais líquidos) permitem a realização de T.T.C., sem a utilização da aparelhagem normalmente usada para este fim, isto é, o sistema termistor-ponte de Wheatstone-registrador. Como a titulação pode ser realizada com a adição do titulante "gota a gota", a mesma pode ser realizada com aparelhagem convencional. Isto torna o método mais simples e possibilita a utilização da mesma em laboratórios onde não exista o

titulador termométrico. A não necessidade do uso do referido equipamento torna o método mais barato. A exatidão e a precisão nos estudos realizados estão próximos daquelas conseguidas com o titulador termométrico. Assim, no caso da titulação do ácido benzóico ou ácido acetil salicílico com n-butóxio de potássio em n-butanol, no meio estudado, pode-se utilizar tanto o indicador inorgânico (temperatura de transição igual a 34°C) como o indicador à base de cristal líquido, com temperatura de transição cerca de 10°C mais baixo. Isto é esperado levando em conta que o aumento da temperatura no ponto final da titulação é da ordem de 25°C e que a temperatura ambiente é de cerca de 25°C .

Entretanto, na titulação de cafeína com ácido perclórico em meio anidrido acético e quinidrona, o indicador inorgânico (solução sólida de $\text{Ag}_2[\text{HgI}_4]$ e $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$ não pode ser utilizado, se a temperatura ambiente for da ordem de 25°C , porque o aumento de temperatura no ponto final da titulação é da ordem de 4°C . Entretanto, com o termômetro à base de cristal líquido esta titulação se torna possível, visto que temos transições de cor a temperaturas logo acima da ambiente.

Portanto, quando uma nova titulação tiver que ser utilizada, é importante considerar o aumento de temperatura no ponto final da titulação e a diferença entre a temperatura da solução e a de transição do indicador. Outra vantagem é que os indicadores termocrômicos podem ser utilizados infinitamente para muitas titulações. Tanto o indicador à base da mistura sólida, $\text{Ag}_2[\text{HgI}_4]$ e $\text{Cu}_2[\text{HgI}_4]$, como o indicador à base de cristal líquido têm sido usados em nosso laboratório a cerca de um ano sem apresentar problemas.

Outro ponto a considerar é que os métodos analíticos descritos na Farmacopéia Brasileira são, em sua maioria, métodos exequíveis num laboratório de uma farmácia clássica (onde era suficiente ter uma balança com até três casas decimais, pipetas, buretas, etc.). Acreditamos que o método de titulação termométrica catalítica com o uso de indicador termocrômico pode ser adaptado a essas farmácias ou pequenos laboratórios farmacêuticos com poucos recursos.

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Estender a aplicação da titulação termométrica catalítica para outras proteínas para se ter maior segurança quanto à aplicabilidade do método.

2. Procurar desenvolver métodos baseados nesta mesma técnica para titulação de grupos não protonados das proteínas. Se isto for possível, se poderia determinar o número total de grupos tituláveis das proteínas por um método simples e rápido.

3. Tentar utilizar a técnica da titulação termométrica catalítica para outros sistemas por se tratar se uma técnica simples e que dispensa o uso de aparelhagem.

4. Atualmente tem-se desenvolvido aparelhagem onde tem-se sensores ópticos acoplados a absorciômetros por meio de fibra óptica. As substâncias termocrômicas podem ser usadas como sensores térmicos acoplados a absorciômetros por meio de fibra óptica. Neste caso se poderia realizar a titulação termométrica a fluxo constante, sendo que a variação da potência da luz refletida pelo indicador serviria para indicar o ponto final da titulação. Tal sistema, apresentaria desvantagens, em relação ao titulador termométrico, em que se utiliza o termistor como sensor de temperatura mas permitira que a titulação termométrica fosse realizada com um fotômetro de filtro ou espectrofotômetro, aparelhos estes disponíveis na maioria dos laboratórios.

5. Outra possibilidade seria usar estas substâncias termossensíveis em testes qualitativos. Assim se poderia colocar o sensor de um lado de uma lâmina de vidro e do outro certas substâncias que poderiam reagir, com liberação de calor, catalisadas pela que se quer identificar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HUME, D.N. e JORDAN, J., Anal. Chem. 30, 2064 (1958).
2. CHAGAS, A.P., trabalho a ser publicado.
3. BELL, J.M. e COWELL, C.F., J. Am. Chem. Soc. 35, 49 (1913).
4. HOWARD, H., J. Soc. Chem. Ind. (LONDON) 29, 3 (1910).
5. RICHMOND, H.D. e MERREYWETHER, L., ibid. 42, 273 (1917).
6. DUTOIT, P. e GROBET, E., J. Chim. Phys. 19, 324 (1922).
7. MÜLLER, R.H., Ind. Eng. Anal. Educ. 13, 671 (1941).
8. LINDE, H.W., ROGERS, L.B. e HUME, D.N., Anal. Chem. 25, 404 (1953).
9. ZENCHELSKY, S.T., ibid. 32, 289R (1960).
10. HARMELIN, M., Chim. Anal. (Paris) 44, 153 (1962).
11. SNELDERS, H.A.M., Chem. Tech. (Amsterdam) 13(7), 311 (1963).
12. BARK, L.S., Ind. Chem. 39, 545 (1963).
13. JORDAN, J., J. Chem. Educ. 40, A.5 (1963).
14. MURPHY, C.B., Encycl. Ind. Chem. Anal. 3, 672 (1966).
15. CARR, P.W., CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 2, 491 (1972).
16. HEISTAND, R.N., Rev. Anal. Chem. 2(3), 193 (1975).
17. EWING, G.H., "Métodos Instrumentais de Análise Química", Editora Edgard Blücker Ltda., São Paulo, 1ª ed. 359 (1972).
18. WILLARD, H.H., MERRIT, Jr., L.L. e DEAN, J.A., "Instrumental Methods of Analysis", von Nostrand Reinhold Company, London, 4ª ed. 465 (1970).
19. WENDLANT, W.W., "Thermal Methods of Analysis", Interscience, New York (1964).
20. ROBINSON, J.W., "Principios de Analises Instrumental", Editorial Acribia, Zaragoza, 1ª ed., 266 (1970).

21. TYRREL, H.J.U. e BEEZER, A.E., "Thermometric Titrimetry", Chapman and Hall, New York (1968).
22. BARK, L.S. e BARK, S.M., "Thermometric Titrimetry", Pergamon Press, New York (1969).
23. VAUGHAN, G.A., "Thermometric and Enthalpimetric Titrimetry", von Nostrand Reinhold, London (1973):
24. GRIME, J.K., "Analytical Solution Calorimetry", John Willey and Sons, New York (1985).
25. LINGANE, J.J., Anal. Chem. 20, 285 (1948).
26. JORDAN, J. e ALLEMAN, T.G., ibid. 29, 9 (1957).
27. CHRISTENSEN, J.J. e IZATT, R.M., J. Phys. Chem. 66, 1030 (1962).
28. CRISTCHFIELD, F.E. e JOHNSON, J.B., Anal. Chem. 26, 1803 (1954).
29. MAYR, C. e FISCH, J., Z. Anal. Chem. 76, 418 (1929).
30. JORDAN, J., MEIER, E.G., BILLINGHAN, Jr., e PENDEGAST, J., Anal. Chem. 32, 651 (1960).
31. SAJO, I. e SIPOS, B., Talanta 14, 203 (1967).
32. EWING, G.J. e MAZAC, C.J., Anal. Chem. 38, 1575 (1966).
33. SAJO, I. e SIPOS, B., Mikrochim. Acta, 248 (1967).
34. PERCHEC, H. e GILOT, B., Bull Soc. Chim. Fr. 3, 619 (1964).
35. SAJO, I. e SIPOS, B., Z. Anal. Chem. 221, 23 (1966).
36. PRIESTLEY, P.T., Analyst 88, 194 (1963).
37. SCHAFER, H. e WILDE, G., Z. Anal. Chem. 130, 396 (1949).
38. FORMAN, E.J. e HUME, D.N., Talanta 11, 129 (1964).
39. VAUGHAN, G.A. e SWITHEBANK, J.J., Analyst 90, 594 (1965).
40. VAJGAND, V.J. e GAÁL, F.F., Talanta 14, 345 (1967).
41. GREENHOW, E.J., Chem. Ind. (London), 442 (1972).

42. *ibid.*, *ibid.*, 466 (1972).
43. WEIZ, H., KISS, T. e KLOCHOW, D., Z. Anal. Chem. 247, 248 (1969).
44. WILLARD, H.H. e YOUNG, P., J. Am. Chem. Soc. 50, 1372 (1928).
45. WEIZ, H. e KISS, T., Z. Anal. Chem. 249, 302 (1970).
46. GREENHOW, E.J., Chem. Rev. 77(6), 835 (1977).
47. VAJGAND, V.J., GAÁL, F.F. e BRUSIN, S.S., Talanta 17, 415 (1970).
48. GREENHOW, E.J. e SPENCER, L.E., *ibid.* 24, 201 (1977).
49. GREENHOW E.J. e SHAFI, A.A., *ibid.* 23, 73 (1976).
50. VAJGAND, V.J. e GAÁL, F.F., *ibid.* 14, 345 (1967).
51. VAJGAND, V.J., KISS, T.A., GAÁL, F.F. e ZSIGRAI, I.J., *ibid.* 15, 699 (1968).
52. VAJGAND, V.J., GAÁL, F.F., ZRNIC, Lj., BRUSIN, S.S. e VELMIROVIC, D., Proc. Anal. Chem. conf. 3Rd 2, 443 (1970).
53. GREENHOW, E.J. e SPENCER, L.E., Analyst 98, 81 (1973).
54. *ibid.*, *ibid.* 100, 747 (1975).
55. MILLER, J. e PARKER, A.J., J. Am. Chem. Soc. 83, 117 (1961).
56. ARNETT, E.M. e MC'KELVEY, D.R., *ibid.* 88, 2598 (1966).
57. BROWN, U.K., ROBINSON, J. e STEVENSON, D.E., J. Pharm. Pharmacol. 15, 688 (1963).
58. MARTIN, D., WEISE, A. e NICLAS; H.J., Angew. Chem. Int. Ed. 6(4), 317 (1967).
59. SCHÄFER, H.L. e SCHAFFERNICHT, P., Angew. Chem. 72, 618 (1960).
60. LINDENBERG, J.J., Finska Kemist Samfundets Medd. 70, 33 (1961).

61. PARKER, A.J., Quart. Rev. (Chem. Soc. London) 16, 163 (1962).
62. STEWART, R. e O'DONNELL, J.P., Can. J. Chem. 42, 1681 (1964).
63. RAMMLER, D.H. e ZAFFARONI, A., Ann. N. Y. Acad. Sci. 20, 13 (1975).
64. GODINHO, O.E.S. e GREENHOW, E.J., Anal. Chem. 57(8), 1725 (1985).
65. TOKUHIRO, T., MENAFRA, L. e SZMANT, H.H., J. Chem. Phys. 61(6), 2275 (1974).
66. HENDERSON, T.R. e HENDERSON, R.F., Ann. N. Y. Acad. Sci. 243, 38 (1975).
67. BRUNSON, H.A., "Organic Reactions", Adams, R., Editor, Willey, New York, 5, 79 (1952).
68. GREENHOW, E.J., Chem. Ind. (London), 422 (1972).
69. TATSUMI, C. e Kotani, R., Bull. Univ. Osaka, Pref. Ser. B 11, 123 (1969).
70. ROBERTSON, E.C., RASFET, R., SWARTS, J.H. e LILLARD, M.E., Geological Survey Bulletin, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1203.
71. MACEDO COSTA, J.L., "Desenvolvimento de um titulador termométrico e sua aplicação na determinação de azotetos insolúveis", Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1977).
72. GREENHOW, E.J. e DAJER DE TORRIJOS, L.A., Analyst 104, 851 (1979).
73. FEIT, B.A. e ZILKHA, A., J. Org. Chem. 28, 406 (1963).
74. ZILKHA, A., FEIT, B.A. e FRANKEL, M., J. Chem. Soc., 928 (1959).
75. CALDIN, E.F. e LONG, G., J. Chem. Soc., 3737 (1954).

76. CHATTERGI, K.K. e GHOSH, A.K., J. Indian Chem. Soc. 34, 407 (1957).
77. EATOUGH, D.J., KASSIERER, E.F., HANSEN, L.D., JENSEN, T.E., IZATT, R.M. e CHRISTENSEN, J.J., Biochemistry, submetido para publicação.
78. SMITH, E.B. e CARR, P.W., Anal. Chem. 45, 1688 (1973).
79. JORDAN, J. e JESFERSEN, N.D., Thermochimie, Colloques Internationaux du C.N.R.S., nº 201, Centre National de la Recherche Scientifique, 1972.
80. GREENHOW, E.J. e SPENCER, L.E. Analyst 98, 81 (1973).
81. GREENHOW, E.J. e SHAFI, A.A., Talanta 23, 73 (1976).
82. GEORGIEVA, M., VELINOV, G. e BUDEVSKY, O., Anal. Chim. Acta 90, 83 (1977).
83. MEISTER, A., "Biochemistry of the Amino Acids and Proteins", Academic Press, Inc., New York, 2ª Ed., I e II (1965).
84. KENDREW, J.C., Sci. Am. 205, 96 (1961).
85. GODINHO, O.E.S. e GREENHOW, E.J., relatório nº 2, FAPESP, 1979.
86. CROFT, L.R., "Handbook of Protein Sequences", Joyson Bruvvers Ltd., Eynsham Oxford, 11, 1973.
87. DAYTTOFF, M.O., "Atlas of Protein Sequence and Structure" 4, 35 (1969).
88. VASCONCELOS, N.M.S., "Caracterização e determinação de grupos tituláveis de proteínas e aminoácidos em solução de uréia através da linearização de curvas de titulação potenciométrica", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1984).
89. HOUSTON, E.J., Chem. News 13(10), 177 (1971).

90. BACHAMN, C.H. e MARGINIS, J.B., Am. J. Phys. 19(7), 424 (1951).
91. BROWN, G.H., J. Chem. Educ. 60(10), 900 (1983).
92. GODINHO, O.E.S., PASQUINI, C., URZEDO DE QUEIROZ, R.R. e
ALEIXO, L.M., Anal. Lett. 17(A-2), 135 (1984).
93. "British Pharmacopeia", H.M.S.O., London, 37 (1973).
94. ALI, A.L., Chromatographia 7(11), 605 (1974).
95. TAM, Y.K., AN, D.S.L. e ABBOTT, F.S., J. Chromatogr. 174, 239
(1979).
96. TWERWEIJ-CROEN, C.P. e KROAK, J.C., ibid. 138, 245 (1977).
97. MANIEL, M. e STILLER, M., Anal. Chem. 48, 712 (1976).
98. KLEINERMAN, M., Anal. Lett. 10, 205 (1977).
99. LIN, S.L. e MARTIN, I.B., Anal. Chem. 38, 549 (1966).
100. CHOI, K.K. e FUNG, K.W., Anal. Chim. Acta 138, 385 (1982).
101. CONNORS, K.A., "A Textbook of Pharmaceutical Analysis", John
Willey and Sons, New York, 457 (1967).
102. GREENHOW, E.J. e DAJER DE TORRIJOS, K.A., Analyst 104, 801
(1979).
103. SUCHOW, L. e KECK, P.H., J. Am. Chem. Soc. 75, 518 (1953).
104. MEIER, G., SACKMAN, E. e GRABMAIER, J.C., "Applications of
Liquid Crystals", Springer Verlag, Berlin, 1975.
105. FRIEDEL, G., Ann. Physique 18, 273 (1922).
106. DEMUS, D., KLAPPERSTRICK, M., LINK, V. e ZASCHKE, H., Mol.
Cryst. Liq. Cryst. 15, 161 (1971).
107. FOGG, A.G., ALI, Md.A. e ABDALLA, M.A., Analyst 108, 840
(1983).
108. MAYANA, S.M. e JAYARAM, B., Analyst 106, 729 (1981).
109. GREENHOW, E.J., Analyst 102, 584 (1977).
110. WIMER, D.C., Anal. Chem. 30(1), 77 (1958).

111. PARKE, T.V., RIBLEY, A.M., KENNEDY, E.E. e HILTE, W.W.,
Anal. Chem. 23(7), 953 (1951).
112. KOLTHOFF, I.M. e BRUCRENSTEIN, S., "Treatise on Analytical
Chemistry", Kolthoff, I.M. e Elving, P.J., eds., Willey
Interscience, New York, 1(II), 1036 (1959).
113. PEARSON, D., "Chemical Analysis of Foods", Chemical
Publishing Company, New York, 269 (1970).