

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDOS POTENCIOMÉTRICOS DE EQUILÍBRIOS
ÁCIDO-BASE E DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ^{OMITE}
EM SOLUÇÃO AQUOSA _{DO}

Luiz Manoel Aleixo

TESE DE DOUTORADO

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

CAMPINAS - 1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais, à Odila, ao Alexandre,
à Ana Carolina e ao Dimitri (em memória)

AGRADEÇO

Ao Prof. Dr. Aécio Pereira Chagas, Diretor do Instituto de Química da UNICAMP, por valiosas discussões e pelas facilidades concedidas para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Giuseppe Cilento e ao Prof. Dr. Jayr de Paiva Campello (em memória), por oportunidades e facilidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Wallace Alves de Oliveira, pelas sugestões dadas em computação

Ao Prof. Dr. Douglas Wagner Franco, do Instituto de Química e Física de São Carlos, por nos ter iniciado na Química Analítica.

Ao Prof. Edson Stein e ao Sr. Hideo Yto, por colaborações prestadas.

Aos amigos, colegas e funcionários do Instituto de Química que conosco conviveram e colaboraram sob diversas formas.

À FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), pelo auxílio financeiro.

Em especial

Ao Prof. Dr. Oswaldo E.S. Godinho,
orientador devotado e amigo.

ÍNDICE

	página
I - Introdução	1
II- Discussão de alguns métodos usados nos cálculos de constantes de formação de complexos	4
II.1- Método de Froneaus	4
II.2- Métodos lineares	6
II.3- Método da "projeção de faixas"	7
III- Estudo potenciométrico do sistema Mn(II)-Azoto- to em solução aquosa	10
III.1- Considerações gerais	10
III.2- Determinação de E_j	11
III.3- Medidas experimentais	16
III.4- Cálculos e Resultados	17
III.5- Conclusão	46
IV- Estudo potenciométrico sobre determinação simul- tânea de constante de equilíbrio e ponto de equivalência de ácidos e bases muito fracos	47
IV.1- Titulação potenciométrica de azoteto	49
IV.2- Dados experimentais e cálculos	52
IV.3- Conclusão	59
V - Estudo potenciométrico sobre segmentação e linearização de curvas de titulações de proteí- nas	62
V.1- Considerações gerais	62
V.2- Dados experimentais e cálculos	67
V.3- Titulação potenciométrica de Ovalbumina com NaOH	76
V.4- Resultados e discussão	85
V.5- Conclusão	106
VI- Detalhes experimentais	109

	página
Apêndice I -	111
Apêndice II -	113
Referências Bibliográficas	123

SÍMBOLOS UTILIZADOS

- C_M - concentração molar total do metal M
 A - concentração molar total do ligante A
 H - concentração molar total de íons H
 h - concentração molar de íons H no equilíbrio
 a - concentração molar de ligante livre
 K_a - constante de dissociação do ácido fraco HA
 K_b - constante de dissociação da base fraca BOH
 B_n - constante de formação do complexo MA_n
 B_1 - constante de formação do complexo MA_1
 B_2 - constante de formação do complexo MA_2
 $\bar{n}$ - número médio de ligante
 C_H - concentração analítica de ácido
 C_B - concentração analítica de base
 E - força eletromotriz da cela
 $E^{o'}$ - potencial formal da cela
 E_j - potencial de junção líquida da cela
 F - faraday
 R - constante molar dos gases
 T - temperatura absoluta
 I - força iônica
 V_{eq} - volume de equivalência
 V - volume de titulante adicionado
 V_o - volume inicial, antes da adição de titulante

RESUMO

Realizamos esta tese com o objetivo de tentar aplicar a técnica potenciométrica à estudos de equilíbrios em meio aquoso, onde fizemos estudos cujos tópicos principais são os seguintes:

1) Inicialmente foi feito um estudo do sistema Mn(II) - Azoteto, com o fim de caracterizar e determinar as constantes de formação de espécies complexas que poderiam ser formadas em meio aquoso. Para esse fim foram utilizados três métodos de cálculo, o de Fronaeus, o de "projeção de faixas" e um método gráfico linear.

2) Procuramos a seguir aplicar a técnica potenciométrica à titulações ácido-base, utilizando métodos desenvolvidos mais recentemente, que permitem ampliar o campo de aplicação da titulação potenciométrica. Assim, fizemos um estudo de titulação de azoteto de sódio com ácido forte, onde foi empregado um modelo linear para titulação de base fraca com ácido forte, que permitiu determinar simultaneamente a constante de equilíbrio e o volume de equivalência.

3) Finalmente, empregando-se um modelo linear para titulações de misturas de ácidos monobásicos com base forte, procuramos aplicá-lo à titulações de proteínas. Esse estudo foi feito titulando-se a proteína na presença de ácido forte em excesso, com NaOH. O método utilizado permitiu-nos determinar os volumes de equivalência e os valores de pK dos grupos tituláveis da ovalbumina, que foi a proteína empregada para esse propósito.

ABSTRACT

The objective of this thesis involves the study of different equilibrium system in aqueous solution, through the use of potentiometry. The following topics have been studied:

1) At first we have studied the Mn(II)-Azide system in aqueous solution, with the objective of characterization the species presents and determination the respective stability constants. We have used three differentes methods of calculation: the Fronaeus method, the projection-strip method and a linear grafic method.

2) In the second part the potenciometric method has been applied in the acid-base titration, by using the modern calculations methods, which has permitted to increase the field of application of potenciometric titrimetry. We have used a linear model for titration of weak base with strong acid. In this manner it was possible to determine the equivalence volume and the pK_a value of the weak base azide.

3) Finally we have applied a linear model for the titration of a mixture of weak acids with strong base for the titration of titrable groups of proteins. This study has been done by titration of protein, which has been treated with excess of strong acid, with a NaOH solution. The method has permitted the determination of the equivalence volumes and pK_a values of the various titrable groups of ovalbumin.

I - INTRODUÇÃO

O objetivo de nossa tese consistiu em se familiarizar com os vários usos da técnica potenciométrica, onde procuramos aplicá-la em estudos envolvendo a formação de complexos, em titulações de ácidos ou bases muito fracos e em titulações de um material mais complexo, tal como as proteínas.

Quanto ao estudo envolvendo a formação de complexos, procuramos estudar o sistema $\text{Mn(II)} - \text{Azoteto}$ em meio aquoso, com o fim de investigar a respeito das espécies formadas assim como determinar as suas constantes de estabilidade. Esse sistema já havia sido anteriormente por nós estudado^(1,2), através da técnica espectrofotométrica, onde foi possível caracterizar a espécie 1:1 e determinar a sua constante de formação.

Há na literatura referências a estudos potenciométricos de sistemas de metais de transição e azoteto, como por exemplo $\text{Ni(II)} - \text{Azoteto}$ ^(3,4), $\text{Zn(II)} - \text{Azoteto}$ ^(5,6), $\text{Cu(II)} - \text{Azoteto}$ ⁽⁷⁾ e $\text{Co(II)} - \text{Azoteto}$ ^(8,9). Não havendo entretanto menção a respeito de estudos do sistema $\text{Mn(II)} - \text{Azoteto}$ por esta técnica, procuramos empregá-la ao estudo desse sistema.

O método potenciométrico utilizado em nossa investigação foi baseado no estudo realizado por Ahrlund⁽⁴⁾, sobre a formação de complexos do sistema $\text{Ni(I)} - \text{Azoteto}$. Os resultados de nosso trabalho foram compatíveis com a existência de duas espécies, as espécies MnN_3^+ e $\text{Mn(N}_3)_2$, na faixa de concentração de ligante livre estudada. A formação dessas espécies assim como o cálculo das constantes de estabilidade das mesmas foram investigados por diferentes métodos de cálculo^(10,11,12).

A seguir interessamo-nos por certas aplicações analíticas da técnica potenciométrica desenvolvidas mais recentemente⁽¹³⁻¹⁷⁾. Essas aplicações, graças aos novos métodos de determinação do ponto final das titulações potenciométricas,

tornaram possível ampliar o campo de aplicação desta técnica. Por exemplo, esses métodos são utilizados na titulação potenciométrica de ácidos ou bases muito fracos, e apresetam diversas vantagens sobre as titulações convencionais. Assim, um ácido ou base com constante de dissociação da ordem de 10^{-10} , pode ser titulado com ácido forte ou base forte, permitindo o cálculo do volume de equivalência e da sua constante de dissociação, simultaneamente⁽¹⁴⁾. Outra aplicação importante dessas titulações consiste na determinação de misturas de ácidos ou bases, onde para os vários componentes presentes, poderão ser determinados simultâneamente tanto o volume de equivalência como a constante de dissociação. A condição exigida para que essas titulações possam ser realizadas, com relação às diferenças entre os valores de pK dos componentes, é de que elas sejam da ordem de 0,5 unidade^(16, 17), portanto bem menor que nas titulações convencionais.

De início procuramos aplicar esse tipo de estudo na titulação potenciométrica de azoteto com ácido forte, uma vez que esse íon é uma base fraca com uma constante K_b da ordem de 10^{-10} , e portanto a determinação do ponto de equivalência não pode ser feita com precisão, de maneira convencional. Empregamos então para esse fim um método baseado no utilizado por Ivaska⁽¹⁴⁾, que mostrou ser bem sucedido na titulação de ácido bórico com base forte.

Realizamos esse estudo em força iônica 1,0 e 0,1, à 25°C, e determinamos em cada força iônica o volume de equivalência e a constante de equilíbrio simultaneamente, obtendo-se resultados bastante satisfatórios.

Na etapa seguinte, o nosso interesse se voltou para a possibilidade de aplicação desses novos métodos potenciométricos à titulações de proteínas, que poderiam apresentar vantagens sobre outros métodos potenciométricos existentes.

Nas titulações potenciométricas de proteínas relata

das na literatura, a curva de titulação refere-se à uma curva de dissociação, representada graficamente pelo número de moles de íons hidrogênio associados ou dissociados por mol de proteína em função do pH⁽¹⁸⁻²²⁾. A partir dessa curva de titulação procura-se determinar a quantidade de cada tipo de grupo titulável da proteína e seus valores de pK, dados esses particularmente importantes na elucidação da estrutura e interações da proteína⁽²³⁻²⁶⁾.

Por esta razão, procuramos desenvolver um método baseado no método de Seymour, Clayton e Q. Fernando⁽¹⁷⁾, a fim de tentar determinar o número de grupos tituláveis por mol de proteína, assim como seus valores de pK, através de uma simples curva de titulação. Esse método seria bem mais simples do ponto de vista experimental que os existentes, e portanto mais conveniente do ponto de vista analítico.

Para esse propósito escolhemos a ovalbumina, uma proteína solúvel em água e que ilustra muitos aspectos característicos de curvas de titulação de proteínas⁽²¹⁾. Embora a primeira titulação dessa proteína tenha sido publicada em 1898 por Bugarszky⁽²⁷⁾, o mais importante estudo potenciométrico da ovalbumina foi feito por Cannan e outros em 1941⁽²⁰⁾. Nesse estudo Cannan realizou titulações potenciométricas de ovalbumina com ácido forte e base forte, e determinou a quantidade e o pK de três tipos de grupos tituláveis, os grupos carboxílicos de ácido glutâmico e aspártico, os grupos imidazol da histidina e os grupos amino da lisina.

No uso de nosso método na titulação da ovalbumina, consideramos a solução de proteína como sendo constituída de uma mistura de ácidos monopróticos, admitindo que todos os grupos de um dado tipo possuíam o mesmo valor de pK. Os resultados que obtivemos nesse estudo também foram bastante satisfatórios. Para a realização dos cálculos necessários, esse método foi por nós tratado computacionalmente.

II - DISCUSSÃO DE ALGUNS MÉTODOS USADOS NOS CÁLCULOS DE CONSTANTES DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS

II.1 - MÉTODO DE PRONAEUS

Um dos métodos frequentemente empregados em cálculos de constante de formação de complexos, é o elaborado por Pronaeus⁽¹⁰⁾, que descreveremos a seguir.

Considerando-se um sistema constituído de um íon metálico M e um ligante A em solução, onde apenas complexos mononucleares $MA_1, MA_2, \dots, MA_n$ são formados, podemos escrever a seguinte equação de equilíbrio relacionada com a formação do complexo MA_n :



cujas constante de formação B_n é definida como:

$$B_n = |MA_n| / |M| \cdot a^n \quad (1)$$

onde $|M|$ e a são as concentrações do metal e ligante livre, respectivamente e $|MA_n|$, a concentração do complexo formado.

Definindo-se o número médio de ligante, $\bar{n}$, como:

$$\bar{n} = (A - H + h - a) / C_M \quad (2)$$

em que

$$A - H + h - a = |MA_1| + 2|MA_2| + \dots + n|MA_n| \quad (3)$$

expressa a concentração do ligante complexado, e

$$C_M = |M| + |MA| + |MA_2| + \dots + |MA_n| \quad (4)$$

Substituído-se 3, 4 e 1 em 2 vem:

$$\bar{n} = \frac{B_1 |M| a + 2B_2 |M| a^2 + \dots + nB_n |M| a^n}{|M| + B_1 |M| a + B_2 |M| a^2 + \dots + B_n |M| a^n} \quad (5)$$

donde:

$$\frac{\bar{n}}{a} = \frac{B_1 + 2B_2 a + \dots + nB_n a^{n-1}}{1 + B_1 a + B_2 a^2 + \dots + B_n a^n} \quad (6)$$

Chamando-se:

$$F_1 = C_M / |M| \quad (7)$$

Substituindo-se 1 e 4 em 7, chega-se a:

$$F_1 = B_1 + B_2 a + B_3 a^2 + \dots + B_n a^{n-1} = \sum_{l=1}^N B_l a^{l-1} \quad (8)$$

A integração dessa equação fornece:

$$F_1 = (\exp \int_0^a \frac{\bar{n}}{\bar{a}} da - 1) / a \quad (9)$$

Para valores muito baixos de $\underline{a}$, os primeiros dois complexos MA e MA_2 predominam e a função $F_1(a)$ tenderá a ser tornar uma reta, cuja extrapolação para $\underline{a} = 0$ dará o valor de B_1 (coeficiente linear), e cujo coeficiente angular fornecerá o valor de B_2 .

Conhecido o valor de B_1 , a função

$$\begin{aligned} F_2 &= (F_1 - B_1) / a = B_2 + B_3 a + \dots + B_n a^{n-2} = \\ &= \sum_{l=1}^N B_l a^{l-2} \end{aligned} \quad (10)$$

pode ser calculada, e traçando-se um gráfico de F_2 vs. $\underline{a}$, o valor de B_2 será obtido como coeficiente linear e o valor de B_3 como o coeficiente angular limite.

De um modo geral:

$$F_t = \frac{F_1 - \sum_{l=1}^{t-1} B_l a^{l-1}}{a^{t-1}} = B_t + B_{t+1} a + \sum_{l=t+2}^N B_l a^{l-t} \quad (11)$$

Se os valores de $B_1, \dots, B_{t-1}$ foram calculados, o termo

$$F_t \quad (0 < t < N)$$

é conhecido. O valor de B_t pode ser obtido como o coeficiente linear do gráfico de F_t em função de $\underline{a}$, e um valor aproximado de B_{t+1} pode ser obtido como o coeficiente angular limite.

A equação 8 é uma expressão polinomial em $\underline{a}$. Ela pode ser reescrita como uma expressão polinomial em $\underline{a}^{-1}$,

$$F_1 a^{1-N} = B_N + B_{N-1} a^{-1} + \sum_{l=1}^{N-2} B_l a^{l+N} \quad (12)$$

Portanto, se N é conhecido, pode ser traçado um gráfico de $F_1 a^{1-N}$ vs. a^{-1} , que fornecerá o valor de B_N como coeficiente linear e B_{N-1} como o coeficiente angular limite, quando a^{-1} tende a zero.

Do mesmo modo que anteriormente, se B_N é conhecido, valores de B_{N-1} e B_{N-2} podem ser obtidos através do coeficiente linear e coeficiente angular limite do gráfico de $F_1 a^{2-N} - B_N a$ vs a^{-1} .

O uso do método de Froneaus requer que a equação 9 seja integrada. Isso é feito construindo-se um gráfico de $\frac{\bar{n}}{a}$ em função de a a partir dos dados experimentais. A integral será a área sob a curva obtida, que permitirá calcular o valor de F_1 . Há diversos procedimentos para determinar a área sob a curva, sendo um deles o que emprega um planímetro.

II.2 - MÉTODOS LINEARES

Há diversos outros métodos que podem ser empregados para a determinação da constante de formação, a partir da função $\bar{n}(a)$. Entre esses métodos estão os que empregam gráficos lineares e interessa-nos particularmente aqueles aplicados à sistemas onde $N = 2$ (11).

As equações,

$$\frac{(1 - \bar{n})aB_1}{\bar{n}} + \frac{(2 - \bar{n})a^2}{\bar{n}} B_2 = 1 \quad (13)$$

$$\frac{\bar{n}}{(1 - \bar{n})a} \frac{1}{B_1} + \frac{(\bar{n} - 2)a}{(1 - \bar{n})} \frac{B_2}{B_1} = 1 \quad (14)$$

$$\frac{\bar{n}}{(2 - \bar{n})a^2} \frac{1}{B_2} + \frac{(\bar{n} - 1)}{(2 - \bar{n})a} \frac{B_1}{B_2} = 1 \quad (15)$$

são equações de retas, que permitirão a obtenção dos valores de B_1 e B_2 de uma maneira bastante cômoda.

Assim, a equação 13 permitirá obter o valor de $1/B_2$ como coeficiente linear e B_1/B_2 como coeficiente angular, a partir do gráfico linear de $(2 - \bar{n})a^2/\bar{n}$ Vs $(\bar{n} - 1)a/\bar{n}$.

Do mesmo modo, usando-se a equação 14, o gráfico de $\bar{n}/(1 - \bar{n})a$ vs $(\bar{n} - 2)a/(1 - \bar{n})$, fornecerá os valores de B_1 e B_2 como coeficiente linear e coeficiente angular respectivamente.

Para a equação 15, o gráfico de $(\bar{n} - 1)/(2\bar{n} - a)$ vs $\bar{n}/(2 - \bar{n})a^2$ dará o valor de B_2/B_1 como coeficiente linear e o de B_1 como coeficiente angular.

Esses métodos são mais adequados quando as medidas experimentais são feitas em uma faixa de concentração de ligante livre relativamente pequena.

II.3 - MÉTODO DA "PROJEÇÃO DE FAIXAS"

Esse método emprega uma família de curvas com uma variável normalizada, e é dos mais adequados para se calcular B_1 e B_2 , em sistemas onde $N = 2$ ⁽¹²⁾. A equação 2, nesse caso pode ser expressa do seguinte modo:

$$\bar{n} = \frac{B_1 a + 2B_2 a^2}{1 + B_1 a + B_2 a^2} \quad (16)$$

A partir dessa equação, pode-se obter:

$$\bar{n} = \frac{RA + 2A^2}{1 + RA + A^2} \quad (17)$$

onde $A = aB_2^{1/2}$ e $R = B_1 / B_2^{1/2}$.

Os valores de B_2 e R poderão ser facilmente obtidos comparando-se os dados experimentais $\bar{n}$, $\log a$, através de uma "projeção de faixas" com uma família de curvas teóricas $R(\log A)\bar{n}$.

A família de curvas $R(\log A)\bar{n}$, poderá ser calculada

usando-se uma forma apropriada da equação 17. Para um dado valor de $\bar{n}$ e um conjunto adequado de valores de A , calculam-se os valores de R , obtendo-se uma curva $R(\log A)\bar{n}$. Do mesmo modo, para diversos valores de $\bar{n}$, serão calculadas diversas curvas $R(\log A)\bar{n}$, cujos gráficos $\log R$ vs $\log A$ serão traçados (figura 9).

Em seguida, a partir dos dados experimentais $\bar{n}$ e a , traça-se um gráfico de $\bar{n}$ em função de $\log a$, usando-se a mesma escala da abcissa que foi usada para calcular a família de curvas $R(\log A)\bar{n}$, (figura 10).

Para cada valor de $\bar{n}$ usado para calcular a família de curvas teóricas, o correspondente valor de a juntamente com a incerteza experimental deste valor, é marcado no eixo $\log a$, em forma de "projeção de faixas" (figura 10).

A "projeção de faixas" $(\log a)_{\bar{n}}$ dos dados $\bar{n}$, $\log a$, é então sobreposta à família de curvas teóricas $R(\log A)\bar{n}$, paralela ao eixo $\log A$, de tal modo que se obtenha uma posição onde o melhor ajuste possível seja obtido para todos os valores de $\bar{n}$. O valor de R é obtido como a ordenada correspondente à melhor posição do ajuste. O limite de erro máximo neste valor pode ser estimada pela distância vertical que a "projeção de faixas" pode ser movida, enquanto os valores de $(\log a)_{\bar{n}}$ permanecerem dentro das incertezas experimentais.

Portanto, conhecendo-se o valor de R , estará determinada a razão $B_1/B_2^{1/2}$, e o valor de B_2 será obtido pela equação:

$$\log a_0 = -\frac{1}{2} \log B_2 \quad (18)$$

onde $\log a_0$ é lido no ponto de interseção do eixo $R(\log A = 0)$ com a "projeção de faixas". O erro máximo em $1/2 \log B_2$ é dado pelo deslocamento horizontal máximo permitido pelas "faixas".

Se os dados são adequados somente para uma estreita faixa de valores de $\bar{n}$, um número de curvas adicionais

$R(\log A)\bar{n}$ podem ser calculadas nessa faixa.

Esse método tem a vantagem de tratar um grande número de dados simultaneamente e pode dar uma estimativa realística dos limites de erro dos valores de B_2 e R .

Tendo-se pronto um conjunto adequado de curvas normalizadas $R(\log A)\bar{n}$, o método pode ser usado muito rapidamente e constitui um dos mais realísticos e conveniente para determinar o parâmetro R .

III - ESTUDO POTENCIOMÉTRICO DO SISTEMA Mn(II) - AZOTETO EM SOLUÇÃO AQUOSA

III.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Conforme já foi dito na introdução, o nosso objetivo era dar prosseguimento ao estudo desse sistema, feito anteriormente por via espectrofotométrica^(1,2), para verificar as espécies que se formariam em solução aquosa e determinar as suas constantes de formação.

O método potenciométrico que utilizamos se baseia na técnica de medida indireta da concentração de ligante livre, através da medida da concentração de íons hidrogênio.

No presente estudo, essa técnica pode ser empregada devido ao fato do ligante, o íon N_3^- , ser ânion do ácido fraco HN_3 .

O Estudo foi feito à temperatura de 25°C e à força iônica 1,0 M. As medidas experimentais foram feitas empregando-se um eletrodo de vidro como eletrodo indicador, e como eletrodo de referência um eletrodo de Ag/AgCl.

A cela usada para as medidas de f.e.m. foi a seguinte:

te:				
-Ag, AgCl	0,025 M NaCl	NaClO ₄	C _M M Mn(ClO ₄) ₂	Eletrodo de vidro +
	0,975 M NaClO ₄	1,00 M	H M HClO ₄	
			A M NaN ₃	
			NaClO ₄ para I = 1,00 M	

A f.e.m. da cela é dada pela equação:

$$E = E^{\circ'} + \frac{RT}{F} \ln h + E_j \quad (19)$$

O termo $E^{\circ'}$, o potencial formal da cela, permanecerá constante por várias horas e inclui o potencial da meia célula do eletrodo de referência, o potencial padrão e assimétri-

co do eletrodo de vidro e o termo $\frac{RT}{F} \ln h$, tido como constante.

O termo E_j representa o potencial total de difusão gerado na junção líquida dentro da cela e seu valor deve ser tão baixo quanto possível, evitando-se gradientes de concentração. O mesmo meio iônico deve ser usado para soluções das duas meia celas e para a ponte salina.

O sistema utilizado para as medidas de potenciais é mostrado na figura 1.

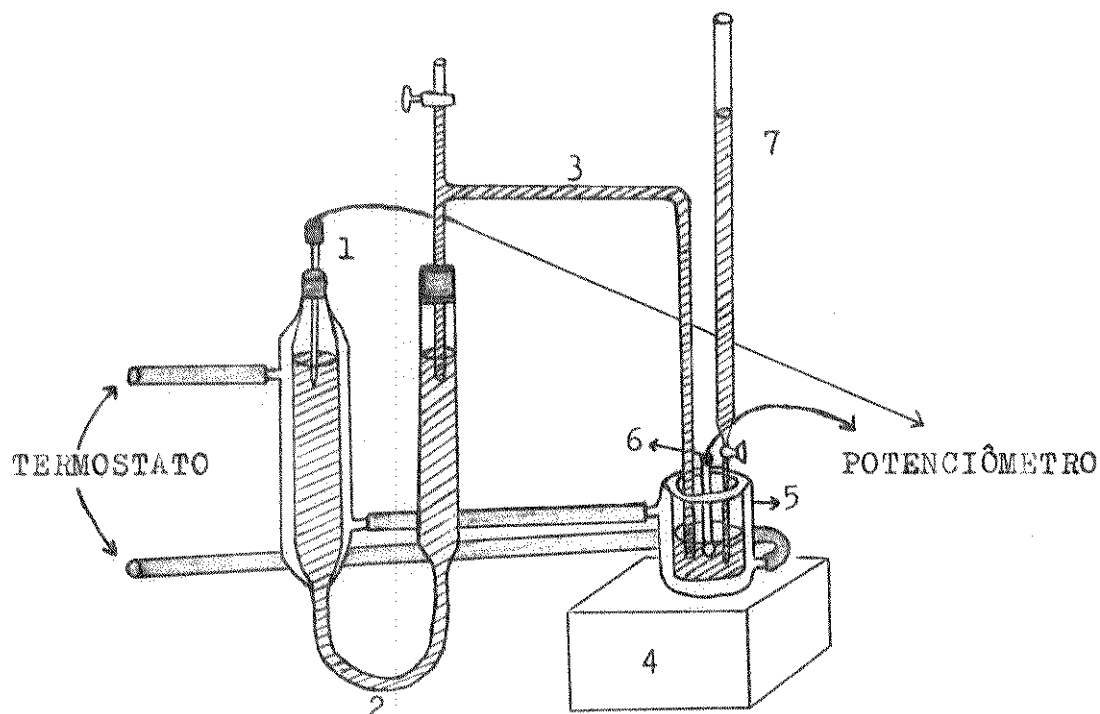
O vaso de titulação foi construído com vidro grosso, de fundo apropriado para agitador magnético, permitindo uma perfeita agitação. O vaso era tampado com rolha de borracha com furos, onde eram introduzidos termômetro, ponte salina, eletrodo de vidro e buretas. Tanto o vaso de titulação como o recipiente que continha a solução de cloreto de sódio/perclorato de sódio, eram envoltas por uma camisa de vidro, por onde circulava água proveniente de um banho termostatzado, de modo a manter a temperatura constante e controlada.

III.2 - DETERMINAÇÃO DE E_j

Quando queremos determinar o valor de h empregando-se a equação 19, temos que conhecer os valores de $E^{O'}$ e E_j para substituir nessa equação. Desde que o termo $E^{O'}$ inclui o potencial assimétrico variável do eletrodo de vidro, devemos determinar o seu valor para cada série de medidas. Toda vez que se inicia uma investigação, o valor de $(E^{O'} + E_j)$ deve ser determinado para uma série de soluções onde h é conhecido. O valor de $(E^{O'} + E_j)$ é constante somente quando uma pequena porção de Na^+ é substituída por H^+ , o que indica que E_j é desprezível. Para um alto grau de substituição $(E^{O'} + E_j)$ não será mais constante, entretanto a variação é linear e podemos escrever a equação 19 do seguinte modo:

$$E = E^{O'} + \frac{RT}{F} \ln h + kh \quad (20)$$

Figura 1. Sistema utilizado para as medidas de potencial.



- 1 - Eletrodo de prata-cloreto de prata (eletrodo de referência).
- 2 - Sistema contendo cloreto de sódio 0,025M/perclorato de sódio 0,975M.
- 3- Ponte salina - 1,00M em perclorato de sódio.
- 4- Agitador.
- 5- Vaso de titulação.
- 6- Eletrodo de vidro (eletrodo indicador).
- 7- Bureta.

donde

$$E_j = k h \quad (21)$$

$$k = E_j / h \quad (22)$$

Portanto, usando-se a equação 20, os valores de $E^{\circ'}$ e k podem ser obtidos como a interseção (coeficiente linear) e a declividade (coeficiente angular) da reta, respectivamente, obtida da curva quando se toma $E - \frac{RT}{F} \ln h$ vs h . O valor de k depende somente do meio iônico, isto é, do solvente, da natureza e concentração do eletrólito, não sendo afetado pela presença do íon metálico e ligante, desde que o eletrólito suporte esteja presente em grande excesso. Uma vez que tenha sido determinado o valor de k , o valor de $E^{\circ'}$ pode ser determinado para cada série de medidas, através da equação:

$$E^{\circ'} = E - \frac{RT}{F} \ln h - k h \quad (23)$$

Embora $E^{\circ'}$ varie alguns décimos de milivolts de um dia para o outro, grandes variações podem significar deterioração do eletrodo de vidro.

O valor de h na solução teste é obtido através da medida da f.e.m. e dos valores de $E^{\circ'}$ e k conhecidos através da equação 23. Nos casos onde as soluções possuem alta acidez e E_j não seja desprezível, obtém-se primeiro um valor aproximado de h , fazendo-se $k = 0$, refinando-se posteriormente por meio de aproximações sucessivas.

Desse modo, a fim de testar o sistema por nós montado, fizemos uma série de medidas usando-se soluções de ácido perclórico, com força iônica ajustada para 1,0 M com perclorato de sódio, à temperatura de 25°C, cujas concentrações e respectivos valores de f.e.m. encontrados acham-se na tabela 1.

De acordo com a equação 23, colocamos num gráfico $E - 59,16 \log h$ em função de h e obtivemos uma reta cujo coe-

ficiente angular forneceu o valor de k , conforme é mostrado na figura 2. Nesse caso, $h = H$.

Foi usada a seguinte cela para as medidas da força eletromotriz:

Ag/AgCl -	0,025 M NaCl	1,00 M NaClO ₄	H M HClO ₄	Eletrodo de + vidro
	0,0975 M		NaClO ₄ para	
	NaClO ₄		I = 1,00 M	

O valor de k obtido através do coeficiente angular da reta da figura 2 é de $62,7 \text{ mV.mol}^{-1}.$, que está bem concordante com o apresentado por Rossoti⁽²⁸⁾, que é de $63 \text{ mV.mol}^{-1}.$, e o valor de $E^{\circ'}$ obtido por extrapolação é de $333,0 \text{ mV}$. A partir desses dados, podemos obter o valor do potencial de junção através da equação 21.

Como as nossas medidas experimentais foram feitas à 25°C , e o valor de k está agora determinado, podemos escrever a equação 19 da seguinte maneira:

$$E = E^{\circ'} + 59,16 \log h + 62,7 \quad (24)$$

Do mesmo modo, a equação 23 torna-se:

$$E^{\circ'} = E - 59,16 \log h - 62,7 h \quad (25)$$

Tabela 1. Dados referentes à determinação da relação entre E_j e concentração de ácido perclórico

E/mV	H/mM	59,16 log h	($E^{\circ'}$ - E_j)/mV
238,8	501,0	17,8	301,6
279,0	200,4	41,3	320,3
267,4	100,2	59,1	326,5
253,7	52,10	75,9	329,6
229,8	20,04	100,5	330,3
214,1	10,02	118,3	332,4

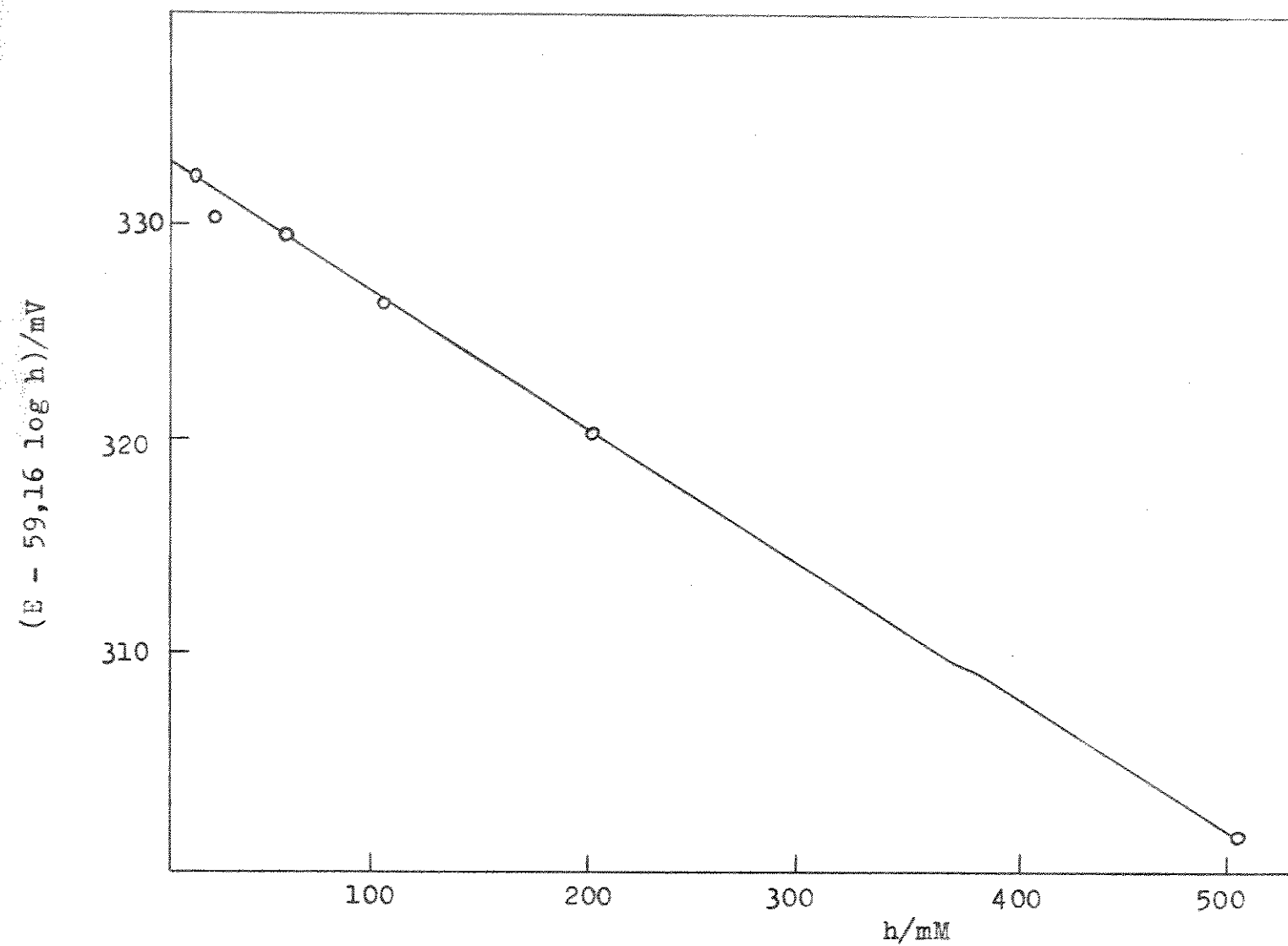


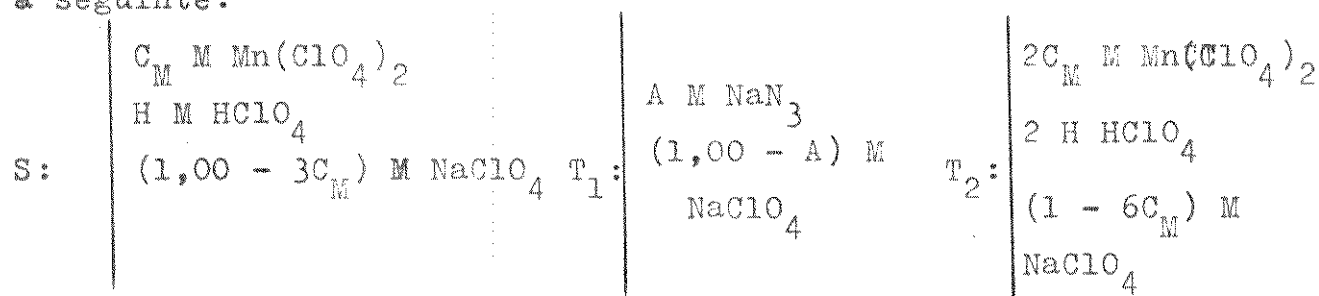
Figura 2. Gráfico $E-59,16 \log h$ em função de h , utilizado na determinação de k .

III.3 - MEDIDAS EXPERIMENTAIS

As medidas experimentais para a determinação da f.e.m., referentes às soluções em que foi feita a determinação das constantes de formação dos complexos do sistema Mn(II)-Azoteto, foram feitas empregando-se a técnica da titulação potenciométrica. Por este procedimento, foram obtidos vários pontos da titulação, onde a concentração hidrogeniônica era determinada, permitindo a partir daí calcular-se a concentração do ligante livre, para então se proceder à aplicação dos métodos adequados de cálculo, que nos levaram a determinar os valores das constantes de formação.

Antes de iniciar uma titulação, o eletrodo de vidro era calibrado, usando-se uma solução de HClO_4 de força iônica 1,00, cujo valor de h era conhecido. A f.e.m. da cela constituída dessa solução, do eletrodo de vidro, do eletrodo de referência e da ponte salina, era então medida e o valor de E^0 determinado através da equação 25.

Em seguida, uma titulação era feita empregando-se duas buretas que continham as soluções T_1 e T_2 , de onde eram adicionados volumes iguais à V_0 ml da solução S, e o potencial era medido à cada adição. A composição dessas soluções é a seguinte:



Diversas titulações foram feitas, e a cela galvânica envolvida está representada pelo esquema da página 10.

As medidas foram ajustadas de tal modo que a concentração do metal foi mantida constante no transcorrer da titulação. As titulações foram repetidas até que uma concordância

de 0,2 mV foi obtida.

A temperatura da cela era controlada e mantida à $25,00 \pm 0,05$ °C, através de circulação de água de um termostato. Com os valores de E^0 e E obtidos, o valor de h para cada ponto da titulação foi calculado usando-se a equação 24.

Nas medidas de potencial referentes às soluções cujos dados foram empregados na determinação das constantes de formação, não há necessidade de correção devido ao potencial de junção, por ser o mesmo desprezível. Isso é fácil de ser visto levando-se em conta que a concentração hidrogeniônica está no intervalo de 10^{-4} e 10^{-6} M, e considerando-se o cálculo de E_j pela equação 21. Por outro lado, o potencial de junção devido à substituição de perclorato de sódio por azoteto de sódio, também não precisa ser levado em conta, desde que o perclorato de sódio esteja presente em grande excesso.

III.4 - CÁLCULOS E RESULTADOS

Os dados experimentais e alguns cálculos encontram-se nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. A partir dos dados experimentais, calculamos $\bar{n}$ para cada ponto de cada titulação, empregando-se a equação 2, permitindo-nos então traçar o gráfico $\bar{n}/a$ em função de a , conforme é mostrado na figura 3. O cálculo do valor da concentração do ligante livre, a , é feito utilizando-se a equação:

$$a = K_a(H - h)h^{-1} \quad (26)$$

onde K_a é a constante de dissociação do HN_3 , cujo valor usado é de $3,61 \cdot 10^{-5}$ M, determinado nas nossas condições experimentais ⁽⁸⁾. Esse valor é bem concordante com o valor encontrado por Arland ⁽⁴⁾, nessas mesmas condições.

Os cálculos para a obtenção dos valores das constantes de formação foram inicialmente feitos empregando-se o método de Froneaus (equações 1 a 12), de modo semelhante ao usa

do por Ahrlund⁽⁴⁾.

A área sob a curva representada na figura 3 ($\bar{n}/a$ vs a), permitiu-nos calcular a função F_1 através da equação 9.

Para facilitar o procedimento desse cálculo, pode ser definida a seguinte função:

$$\ln F = \int_0^a \frac{\bar{n}}{a} da \quad (27)$$

portanto:

$$F = \exp \int_0^a \frac{\bar{n}}{a} da \quad (28)$$

Substituindo-se essa expressão na equação 9 fica:

$$F_1 = \frac{F - 1}{a} = B_1 + B_2 a + B_3 a^2 + \dots = \sum_{n=1}^N B_n a^{n-1} \quad (29)$$

Conforme nos mostra a equação 27, a área sob a curva $\bar{n}/a$ vs a nos dá o valor de $\ln F$. Dispondo-se então do valor de F , será possível calcular a função F_1 através da equação 29.

Com os valores calculados de F_1 (tabela 9), traçamos um gráfico de F_1 em função dos respectivos valores de a , que é mostrado na figura 4. Extrapolando-se a curva obtida para $a = 0$, obtivemos o valor de B_1 como coeficiente linear e o valor de B_2 como a inclinação limite. Esses valores foram respectivamente 4,3 e 1,8.

Como podemos observar na figura 4, praticamente uma reta é obtida ao longo de todos os pontos experimentais, significando que podemos supor que nas nossas condições experimentais, o sistema $Mn(II)$ - Azoteto apresenta apenas a formação de duas espécies, as espécies MnN_3^+ e $Mn(N_3)_2$.

Conhecendo-se o valor de B_1 , o valor de B_2 pode ser obtido mais precisamente através da equação 10, que foi usada para o cálculo da função F_2 (tabela 9). Fizemos então um gráfico de F_2 em função de a , que é mostrado na figura 5. Extrapolando-se a curva obtida para $a = 0$, obtivemos um valor de B_2 igual a 1,8, como coeficiente linear da reta.

Observando-se a figura 5, vemos que a curva obtida tende a se tornar uma reta paralela à abcissa, o que nos indica que não há formação detetável de qualquer outra espécie em nosso sistema, confirmando a observação feita sobre o gráfico da figura 4.

Como erros nos valores de $B_1, \dots, B_{t-1}$ se acumularão no valor de B_t (equação 11), é interessante também empregar o método de Froneaus usando expressões polinomiais em a^{-1} (equação 12), para se verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Se as constantes obtidas não concordarem satisfatoriamente, elas poderão ser refinadas por meio de aproximações sucessivas⁽¹⁰⁾.

Como os nossos cálculos usando polinomiais em a apresentaram resultados compatíveis com a formação de apenas dois complexos, a equação 12, com $N = 2$, se torna:

$$F_1 a^{-1} = B_2 + B_1 a^{-1} \quad (30)$$

Fazendo-se então um gráfico de $F_1 a^{-1}$ em função de a^{-1} , obtém-se uma reta, cuja extrapolação para $a^{-1} = 0$ nos dá o valor de B_2 como coeficiente linear, e cujo coeficiente angular limite nos dá o valor de B_1 .

O valor de B_1 poderá ser mais precisamente obtido empregando-se a equação:

$$F_1 - B_2 a = B_1 \quad (31)$$

obtida a partir da equação 30.

Traçando-se um gráfico de $F_1 - B_2 a$ em função de a^{-1} , obtém-se uma reta paralela ao eixo das abcissas, cuja extrapolação para $a^{-1} = 0$ nos dará o valor de B_1 .

Na figura 6 têm-se o gráfico referente à equação 30, onde o valor de B_2 obtido é igual a 2,0, e o de B_1 igual a 4,3.

Na figura 7 têm-se o gráfico relativo à equação 31, onde o valor de B_1 encontrado é igual à 4,3.

Os dados necessários aos cálculos relativos ao uso

das equações 30 e 31, assim como os valores de $F_1 a^{-1}$ e $F_1 - B_2 a$, se encontram na tabela 10.

Também foram feitos cálculos empregando-se métodos específicos para sistemas onde $N = 2$, para se obter uma maior segurança quanto à reprodutibilidade dos resultados, permitindo uma melhor verificação da precisão obtida.

Utilizamos então a equação 13, relativa a um método linear, e construímos um gráfico de $(2 - \bar{n})a^2 / \bar{n}$ em função de $(\bar{n} - 1)a / \bar{n}$, que nos permitiu obter o valor de 2,9 para B_2 a partir do coeficiente linear ($1/B_2$) da reta, e o valor de 4,2 para B_1 a partir do coeficiente angular ($-B_1/B_2$).

Na tabela 11 estão os dados necessários aos cálculos referentes ao uso da equação 13 e na figura 8 temos o gráfico $(2 - \bar{n})a^2 / \bar{n}$ vs. $(\bar{n} - 1)a / \bar{n}$.

Finalmente empregamos o método da "projeção de faixas", para obter os valores das constantes B_1 e B_2 . Esse método está discutido na seção II.3 e envolve o uso das equações 16, 17 e 18.

Na figura 9 têm-se o gráfico da família de curvas teóricas $R(\log A)\bar{n}$. Cada curva teórica foi calculada para um particular valor de $\bar{n}$, de onde foram obtidos diversos valores de R , usando-se uma forma apropriada da equação 17. Com esses valores, foi feito o gráfico da família de curvas, tomando-se $\log R$ em função de $\log A$, para cada valor de $\bar{n}$ empregado.

Na figura 10, temos o gráfico $\bar{n}$ em função de $\log a$, feito a partir dos dados experimentais $\bar{n}$ e a , que estão na tabela 12, usando-se a mesma escala de abcissa do gráfico da figura 9. Para valores de $\bar{n}$ relativos às curvas teóricas da figura 9, dentro da faixa de valores de $\bar{n}$ de nossos dados experimentais, realizamos a "projeção de faixas", marcando-se esses valores aos correspondentes valores de a , no eixo $\log a$.

Em seguida fizemos a sobreposição das projeções de faixas $(\log a)\bar{n}$ da figura 10 com a família de curvas teóricas da figura 9, para obtermos o melhor ajuste possível de to-

dos os valores de $\bar{n}$ na região de nossos dados experimentais (linha pontilhada da figura 9) . Assim, obtivemos o valor de $\log R$ como a ordenada correspondente a esse ajuste, sendo es se valor igual a 0,44, através do qual determinamos a razão $B_1/B_2^{1/2}$.

A constante B_2 foi calculada através da equação 18, onde o valor de 0,20 para $\log a_0$ foi lido no ponto de interseção do eixo $\log R$ ($\log A = 0$) da figura 9 com a "projeção de faixas" da figura 10.

Os valores das constantes de formação B_1 e B_2 obtidos a partir desses valores de R e $\log a_0$, foram respectivamente de 4,4 e 2,5.

Na tabela 13 estão reunidos os valores de B_1 e B_2 calculados pelos métodos que empregamos.

Tomando-se valores de 4,3 para B_1 e 1,8 para B_2 , construímos o diagrama de distribuição para o sistema Mn(II)-Azoteto, cujo gráfico é mostrado na figura 11. Os valores de α_c , que são apresentados na tabela 14, foram calculados através da equação $\alpha_c = B_c a^c / \sum_0^N B_n a^n$, onde c nesse caso, varia de 0 a 2.

Finalmente, na figura 12 apresentamos o gráfico de $\bar{n}$ em função de $\log a$, onde os pontos correspondem aos valores de $\bar{n}$ obtidos a partir dos dados experimentais, que se en contram na tabela 12, e a curva traçada corresponde aos valores de $\bar{n}$ calculados através da equação 16, onde também foram usados os valores de 4,3 e 1,8 para B_1 e B_2 respectivamente. Podemos verificar na figura que a curva traçada se ajusta bem aos pontos experimentais.

Convém ressaltar que mesmo que tenhamos valores de B_n que concordam apreciavelmente com pontos experimentais $\bar{n}$ vs. $\log a$, poderemos não ter certeza da existência de um dado complexo MA_n , especialmente se apenas uma pequena fra-

ção desse complexo fosse esperada de se formar, mesmo à uma concentração ótima de ligante livre, em virtude de se ter uma condição de constantes por etapas do tipo $K_n \leq K_{n+1}$. Entretanto, para sistemas contendo dois complexos, há métodos gráficos que poderão dar uma indicação mais realística dos prováveis limites de erros dos valores de B_n obtidos^(11,12).

Tabela 2. Dados referentes às medidas potenciométricas do sistema Mn(II)-Azoteto. O símbolo se refere à tabela 8 e à figura 2.

▲ $E^{0'} = 333,2 \text{ mV}$ $V_0 = 50,15 \text{ ml}$							
* V/ml	E/mV	h/mM	H /mM	A/mM	a/mM	$\bar{n}$	$(\bar{n}/a)/M^{-1}$
54,15	74,9	0,0430	14,65	29,52	12,25	0,0496	4,05
55,15	65,0	0,0293	14,57	36,22	17,92	0,0703	3,92
56,15	58,1	0,0224	14,48	42,70	23,33	0,0917	3,93
57,15	52,6	0,0181	14,41	48,94	28,75	0,108	3,77
58,15	48,4	0,0153	14,33	54,97	33,68	0,130	3,87
59,15	44,8	0,0133	14,26	60,80	38,55	0,149	3,88
60,15	42,0	0,0120	14,19	66,43	42,78	0,177	4,14
61,15	39,3	0,0108	14,12	71,88	47,30	0,196	4,14
62,15	36,6	0,00969	14,05	71,15	52,30	0,202	3,86
63,15	34,3	0,00886	13,99	82,26	56,93	0,212	3,72
64,15	32,2	0,00817	13,93	87,20	61,51	0,220	3,57
66,15	29,1	0,00724	13,81	96,65	68,81	0,262	3,81
68,15	26,0	0,00642	13,70	105,54	77,02	0,277	3,60
70,15	23,6	0,00584	13,59	113,92	83,91	0,307	3,66

$$* V = (V_0 + 2v) \text{ ml}$$

Tabela 3. Dados referentes às medidas potenciométricas do sistema Mn(II)-Azoteto. O símbolo se refere à tabela 8 e à figura 2

Δ $E^{\circ'} = 333,4 \text{ mV}$ $V_0 = 25,08 \text{ ml}$							
*V/ml	E/mV	h/mM	H/mM	A/mM	a/mM	$\bar{n}$	$(\bar{n}/a)/M^{-1}$
27,08	98,9	0,1086	25,10	36,78	8,30	0,033	3,92
29,08	64,9	0,0289	25,09	65,50	31,28	0,114	3,63
31,08	52,0	0,0175	25,09	96,14	51,70	0,181	3,50
33,08	44,2	0,0129	25,09	120,43	70,04	0,236	3,38
35,08	39,0	0,0106	25,09	142,0	87,75	0,292	3,39
37,08	35,0	0,00903	25,08	161,2	100,2	0,335	3,34
39,08	31,8	0,00798	25,08	178,4	113,5	0,372	3,28
41,08	29,1	0,00718	25,08	194,0	126,1	0,400	3,17
43,08	27,0	0,00662	25,08	208,1	136,8	0,431	3,15
45,08	25,0	0,00612	25,08	220,9	147,9	0,448	3,03
47,08	23,4	0,00575	25,08	232,7	157,4	0,469	2,98
49,08	22,0	0,00545	25,08	243,5	166,2	0,488	2,94
51,08	20,9	0,00522	25,07	253,5	173,4	0,513	2,96
53,08	19,6	0,00496	25,07	262,7	182,4	0,515	2,83
57,08	18,0	0,00466	25,07	279,2	194,1	0,560	2,88
61,08	16,3	0,00436	25,07	293,5	207,4	0,570	2,75
65,08	15,1	0,00416	25,07	306,1	217,3	0,595	2,74
69,08	14,0	0,00399	25,07	317,2	226,8	0,610	2,69
73,08	13,0	0,00384	25,07	327,1	235,8	0,618	2,62
75,08	12,6	0,00378	25,07	331,6	239,5	0,626	2,61

$$*V = (V_0 + 2v) \text{ ml}$$

Tabela 4. Dados referentes às medidas potenciométricas do sistema Mn(II)-Azoteto. O símbolo se refere à tabela 8 e à figura 2.

□ $E^{0'} = 333,2 \text{ mV}$ $V_0 = 25,08 \text{ ml}$							
$*V/\text{ml}$	E/mV	h/mM	H/mM	A/mM	a/mM	$\bar{n}$	$(\bar{n}/a)/\bar{M}^{-1}$
33,08	65,6	0,0300	50,12	120,4	60,4	0,186	3,08
35,08	58,6	0,0228	50,12	142,0	79,3	0,234	2,95
37,08	53,6	0,0188	50,12	161,2	96,4	0,275	2,85
39,08	49,8	0,0162	50,12	178,4	111,7	0,310	2,77
41,08	46,9	0,0145	50,12	194,0	125,1	0,351	2,81
43,08	44,2	0,0130	50,12	208,1	138,9	0,356	2,56
45,08	42,3	0,0121	50,12	220,9	149,6	0,397	2,65
47,08	40,7	0,0114	50,12	232,7	159,2	0,437	2,74
49,08	39,3	0,0108	50,12	243,5	168,1	0,472	2,81
53,08	36,8	0,00976	50,11	262,7	185,3	0,510	2,75
57,08	34,6	0,00896	50,11	279,2	201,9	0,508	2,52
61,08	33,0	0,00842	50,11	293,5	214,8	0,534	2,48
65,08	31,7	0,00800	50,11	306,1	226,0	0,560	2,48
69,08	30,6	0,00767	50,11	317,2	236,9	0,583	2,47
73,08	29,7	0,00513	50,11	327,1	244,3	0,611	2,50

$$*V = (V_0 + 2v) \text{ ml}$$

Tabela 5. Dados referentes às medidas potenciométricas do sistema Mn(II)-Azoteto. O símbolo se refere à tabela 8 e à figura 2.

● $E^{\circ'} = 333,2 \text{ mV}$ $V_o = 25,08 \text{ ml}$							
*V/ml	E/mV	h/mM	H/mM	A/mM	a/mM	$\bar{n}$	$(\bar{n}/a)/M^{-1}$
31,08	78,00	0,0486	50,12	96,53	37,23	0,132	3,54
33,08	66,7	0,0313	50,12	120,9	57,81	0,186	3,21
35,08	60,0	0,0241	50,12	142,5	75,04	0,249	3,31
37,08	55,1	0,0199	50,12	161,8	90,78	0,299	3,29
39,08	51,2	0,0171	50,12	179,1	105,7	0,333	3,15
41,08	48,3	0,0153	50,12	194,8	118,3	0,376	3,18
43,08	45,9	0,0139	50,12	208,9	129,9	0,413	3,18
45,08	44,1	0,0130	50,12	221,9	139,4	0,462	3,32
47,08	42,3	0,0121	50,12	233,4	149,5	0,487	3,25
49,08	40,8	0,0114	50,12	244,5	158,5	0,513	3,24
53,08	38,3	0,0104	50,11	263,8	174,7	0,557	3,19
57,08	36,3	0,00958	50,11	280,3	188,8	0,592	3,13
61,08	34,7	0,00900	50,11	294,7	200,9	0,623	3,11
65,08	33,4	0,00856	50,11	307,3	211,3	0,655	3,10
69,08	32,3	0,00820	50,11	318,5	220,6	0,683	3,09
73,08	31,4	0,00792	50,11	328,4	228,5	0,712	3,12
75,08	31,0	0,00780	50,11	333,0	232,0	0,726	3,13

$$*V = (V_o + 2v) \text{ ml}$$

Tabela 6. Dados referentes às medidas potenciométricas do sistema Mn(II)-Azoteto. O símbolo se refere à tabela 8 e à figura 2.

○							
$E^{\circ'} = 333,6$				$V_o = 20,01 \text{ ml}$			
$*V/\text{ml}$	E/mV	h/mM	H/mM	A/mM	a/mM	$\bar{n}$	$(\bar{n}/a)/M^{-1}$
24,01	84,2	0,0608	50,13	83,30	29,74	0,108	3,64
28,01	57,4	0,0214	50,12	142,8	84,46	0,256	3,02
30,01	51,6	0,0171	50,12	166,6	105,8	0,330	3,12
32,01	47,3	0,0145	50,12	187,4	125,1	0,377	3,02
34,01	44,0	0,0127	50,12	205,8	142,3	0,416	2,93
36,01	41,4	0,0150	50,12	222,2	157,4	0,453	2,88
38,01	39,3	0,0106	50,12	236,8	170,8	0,491	2,87
40,01	37,6	0,00991	50,12	249,9	182,5	0,536	2,94
44,01	34,8	0,00889	50,11	272,7	203,5	0,589	2,89
48,01	32,5	0,00813	50,11	291,6	222,6	0,586	2,63
52,01	30,9	0,00764	50,11	307,6	236,9	0,639	2,70
56,01	29,4	0,00720	50,11	321,4	251,1	0,624	2,48
60,01	28,4	0,00693	50,11	333,4	261,1	0,684	2,62

$$*V = (V_o + 2v) \text{ ml}$$

Tabela 7. Dados referentes às medidas potenciométricas do sistema Mn(II)-Azoteto. O símbolo se refere à tabela 8 e à figura 2.

$\odot$ $E^{\circ} = 333,3 \text{ mV}$ $V_0 = 40,02 \text{ ml}$							
$*V/\text{ml}$	E/mV	h/mM	H/mM	A/mM	a/mM	$\bar{n}$	$(\bar{n}/a)/M^{-1}$
43,02	65,4	0,0297	14,71	34,87	17,85	0,072	4,06
44,02	54,3	0,0193	14,60	45,43	27,32	0,110	4,01
45,02	46,8	0,0144	14,50	55,53	36,33	0,146	4,02
46,02	41,1	0,0115	14,40	65,19	45,05	0,178	3,95
47,02	36,6	0,00967	14,30	74,43	53,34	0,210	3,95
48,02	32,7	0,00831	14,21	83,30	61,69	0,229	3,71
49,02	29,5	0,00734	14,13	91,80	69,45	0,255	3,66
50,02	26,6	0,00656	14,04	99,96	77,30	0,267	3,45
52,02	22,1	0,00550	13,89	115,3	91,08	0,321	3,53
54,02	18,3	0,00475	13,74	129,6	104,5	0,351	3,36
56,02	15,2	0,00421	13,61	142,8	116,8	0,385	3,30
58,02	12,5	0,00379	13,48	155,1	128,5	0,407	3,16
60,02	10,4	0,00135	13,37	166,6	138,2	0,464	3,36

$$*V = (V_0 + 2v) \text{ ml}$$

Tabela 8. Composição das soluções referentes às tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

▲	$\begin{aligned} S: C_M &= 0,05355 \text{ M}, H = 0,01502 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,8344 \text{ M} \\ T_1: A &= 0,7992 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,8344 \text{ M} \\ T_2: C_M &= 0,1071 \text{ M}, H = 0,02001 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,6286 \text{ M} \end{aligned}$
△	$\begin{aligned} S: C_M &= 0,1071 \text{ M}, H = 0,02510 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,6286 \text{ M} \\ T_1: A &= 0,9959 \text{ M} \\ T_2: C_M &= 0,2142 \text{ M}, H = 0,05010 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,3073 \text{ M} \end{aligned}$
□	$\begin{aligned} S: C_M &= 0,05355 \text{ M}, H = 0,05013 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,7893 \text{ M} \\ T_1: A &= 0,9959 \text{ M} \\ T_2: C_M &= 0,1071 \text{ M}, H = 0,1002 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,5785 \text{ M} \end{aligned}$
●	$\begin{aligned} S: C_M &= 0,07003 \text{ M}, H = 0,05013 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,7398 \text{ M} \\ T_1: A &= 1,000 \text{ M} \\ T_2: C_M &= 0,1401 \text{ M}, H = 0,1002 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,4795 \text{ M} \end{aligned}$
○	$\begin{aligned} S: C_M &= 0,03232 \text{ M}, H = 0,05015 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,8529 \text{ M} \\ T_1: A &= 1,000 \text{ M} \\ T_2: C_M &= 0,6464 \text{ M}, H = 0,1002 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,7062 \text{ M} \end{aligned}$
✧	$\begin{aligned} S: C_M &= 0,03232 \text{ M}, H = 0,01506 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,9030 \text{ M} \\ T_1: A &= 1,000 \text{ M} \\ T_2: C_M &= 0,06464 \text{ M}, H = 0,01998 \text{ M}, C_{\text{NaClO}_4} = 0,7063 \text{ M} \end{aligned}$

Tabela 9. Método de Fronaeus. Valores de $\ln F$, F_1 , F_2 e a , referentes à figura 3 e às equações 1 a 12, 27, 28 e 29.

a/mm	$\ln F$	F	F_1	F_2
5,00	0,0213	1,022	4,31	2,16
10,00	0,0423	1,043	4,32	1,81
15,00	0,0629	1,065	4,32	1,63
20,00	0,0831	1,087	4,33	1,63
25,00	0,1031	1,109	4,34	1,76
30,00	0,1228	1,131	4,36	1,84
35,00	0,1422	1,153	4,37	1,86
40,00	0,1613	1,175	4,37	1,86
45,00	0,1800	1,197	4,38	1,87
50,00	0,1986	1,2120	4,39	1,89
60,00	0,2350	1,265	4,42	1,91
70,00	0,2700	1,310	4,43	1,82
80,00	0,3043	1,356	4,45	1,83
90,00	0,3379	1,402	4,47	1,85
100,00	0,3707	1,449	4,49	1,87
110,00	0,4038	1,496	4,51	1,90
120,00	0,4341	1,544	4,53	1,91
140,00	0,4952	1,641	4,58	1,98
160,00	0,5545	1,741	4,63	2,07
180,00	0,6124	1,845	4,69	2,19
200,00	0,6686	1,951	4,76	2,29
220,00	0,7227	2,060	4,82	2,36
240,00	0,7754	2,171	4,88	2,42
260,00	0,8272	2,287	4,95	2,50

Tabela 10.- Método de Fronæus. Valores de a^{-1} , $F_1 a^{-1}$ e $F_1 - B_2 a$, referentes à figura 3 e às equações 30 e 31.

a^{-1}/mm^{-1}	$F_1 a^{-1}$	$F_1 - B_2 a$
200,0	862,2	4,30
100,0	431,8	4,30
66,67	288,3	4,29
50,00	216,6	4,29
40,00	173,8	4,29
33,33	145,2	4,30
28,57	124,7	4,30
25,00	109,4	4,29
22,22	97,42	4,29
20,00	87,89	4,29
16,67	73,58	4,29
14,29	63,24	4,29
12,50	55,58	4,29
11,11	49,63	4,29
10,00	44,87	4,29
9,091	40,99	4,29
8,333	37,75	4,29
7,143	32,70	4,30
6,250	28,95	4,31
5,556	26,07	4,33
5,000	23,79	4,36
4,545	21,90	4,38
4,167	20,34	4,40
3,846	19,04	4,43

Tabela 11. Método linear, relativo ao uso da equação 13.
Os valores de $\bar{n}$ foram obtidos através da fi
gura 3.

$\bar{n}$	a/mm	$Y \cdot 10^3$	$X \cdot 10^{-2}$
0,0806	20,00	9,526	22,81
0,152	40,00	19,51	22,39
0,215	60,00	29,83	21,86
0,273	80,00	40,52	21,33
0,325	100,0	51,54	20,77
0,372	120,0	63,02	20,26
0,421	140,0	73,42	19,22
0,469	160,0	83,62	18,13
0,515	180,0	93,47	16,97
0,550	200,0	105,46	16,37
0,583	220,0	117,64	15,74
0,626	240,0	126,31	14,31

$$Y = (2 - \bar{n}) a^2 / \bar{n} \quad \text{e} \quad X = (\bar{n} - 1)a/\bar{n}$$

Tabela 12. Método de "projeção de faixas". Valores de $\underline{a}$, $\bar{n}/a$, $\bar{n}$ e $\log a$, obtidos a partir da figura 3.

a/mM	$(\bar{n}/a)/M^{-1}$	$\bar{n}$	$\log a$
5,00	4,18	0,0212	-2,301
10,00	4,13	0,0415	-2,000
15,00	4,08	0,0614	-1,824
20,00	4,02	0,0806	-1,699
25,00	3,96	0,0995	-1,620
30,00	3,90	0,117	-1,523
35,00	3,84	0,135	-1,456
40,00	3,78	0,152	-1,398
45,00	3,73	0,168	-1,347
50,00	3,69	0,184	-1,301
60,00	3,61	0,215	-1,222
80,00	3,44	0,273	-1,097
90,00	3,36	0,300	-1,046
100,0	3,29	0,325	-1,000
110,0	3,23	0,350	-0,959
120,0	3,16	0,372	-0,921
140,0	3,05	0,421	-0,854
160,0	2,95	0,469	-0,796
180,0	2,88	0,515	-0,745
200,0	2,80	0,550	-0,699
220,0	2,72	0,583	-0,658
240,0	2,65	0,626	-0,619
260,0	2,58	0,673	-0,585

Tabela 13.- Valores de B_1 e B_2 , obtidos pelos diversos métodos de cálculo empregados, para o sistema Mn(II)-Azoteto.

Método:	Fronaeus em a	Fronaeus em a ⁻¹	Linear	"Projeção de faixas"
B_1/M^{-1}	$4,3 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,5$
B_2/M^{-2}	$1,8 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,6$	$2,9 \pm 1,0$	$2,5 \pm 0,8$

Tabela 14. Valores de α_c e $\log a$, para o sistema Mn(II) - Azoteto.

$\log a$	α_0	α_1	α_2
-2,30	0,979	0,021	
-2,00	0,959	0,041	
-1,82	0,939	0,061	
-1,70	0,920	0,079	
-1,52	0,884	0,114	
-1,40	0,851	0,146	
-1,22	0,791	0,204	0,006
-1,10	0,738	0,253	0,011
-1,00	0,691	0,297	0,018
-0,92	0,649	0,335	0,026
-0,85	0,611	0,367	0,035
-0,80	0,577	0,397	0,045
-0,74	0,546	0,422	0,056
-0,70	0,518	0,445	0,068
-0,66	0,492	0,465	0,080
-0,62	0,468	0,483	0,094
-0,59	0,446	0,499	0,107
-0,52	0,408	0,526	0,134
-0,40	0,367	0,572	0,193
-0,30	0,278	0,597	0,229
-0,15	0,204	0,615	0,241
-0,097	0,179	0,615	0,232
-0,046	0,158	0,612	0,219
-0,022	0,149	0,608	0,213

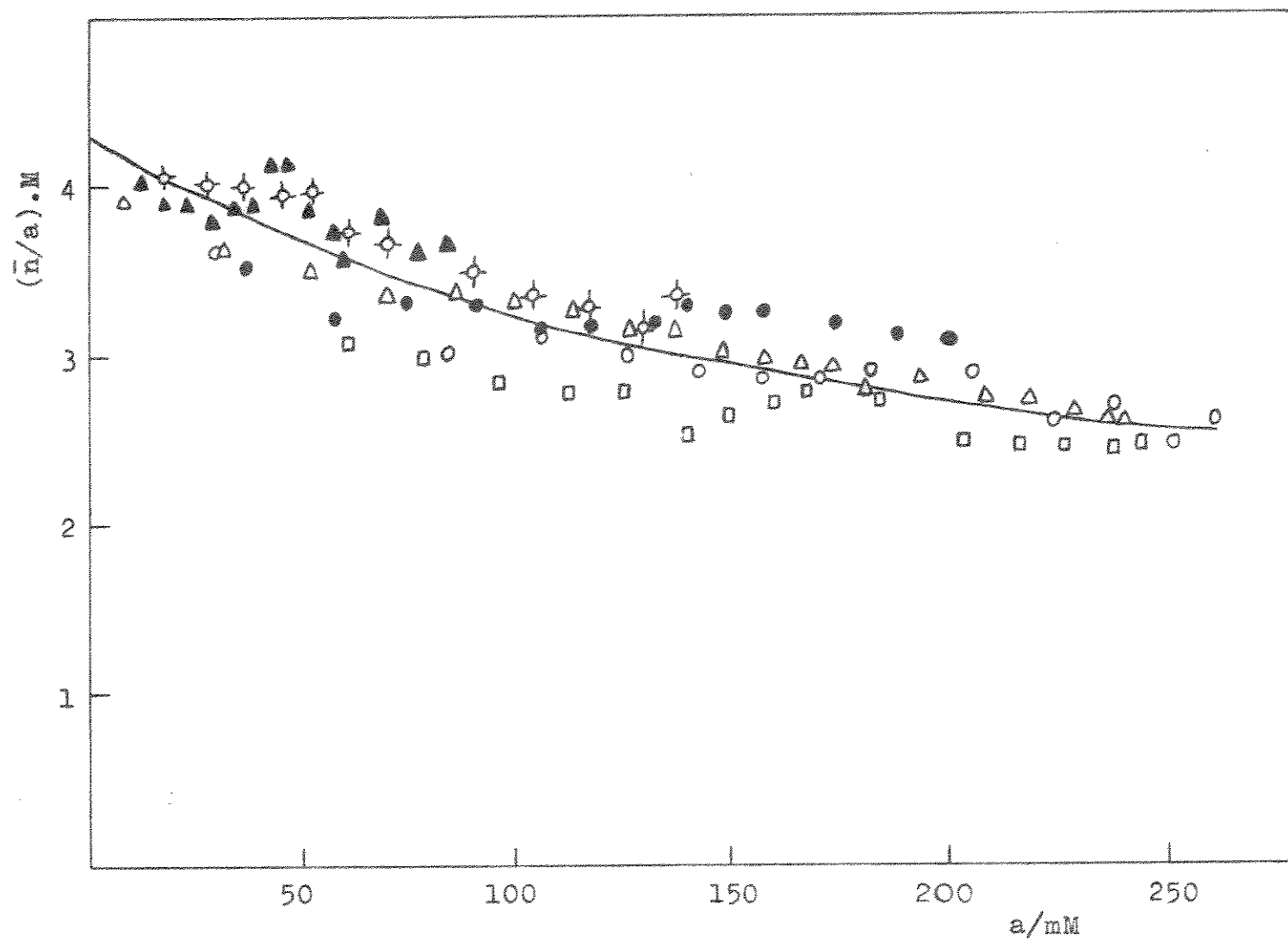


Figura 3. $\bar{n}/a$ em função de a , para o sistema Mn(II)-Azoteto

Figura 4. Método de Fronaeus. Aplicação da equação 29, F_1 em função de $\underline{a}$.

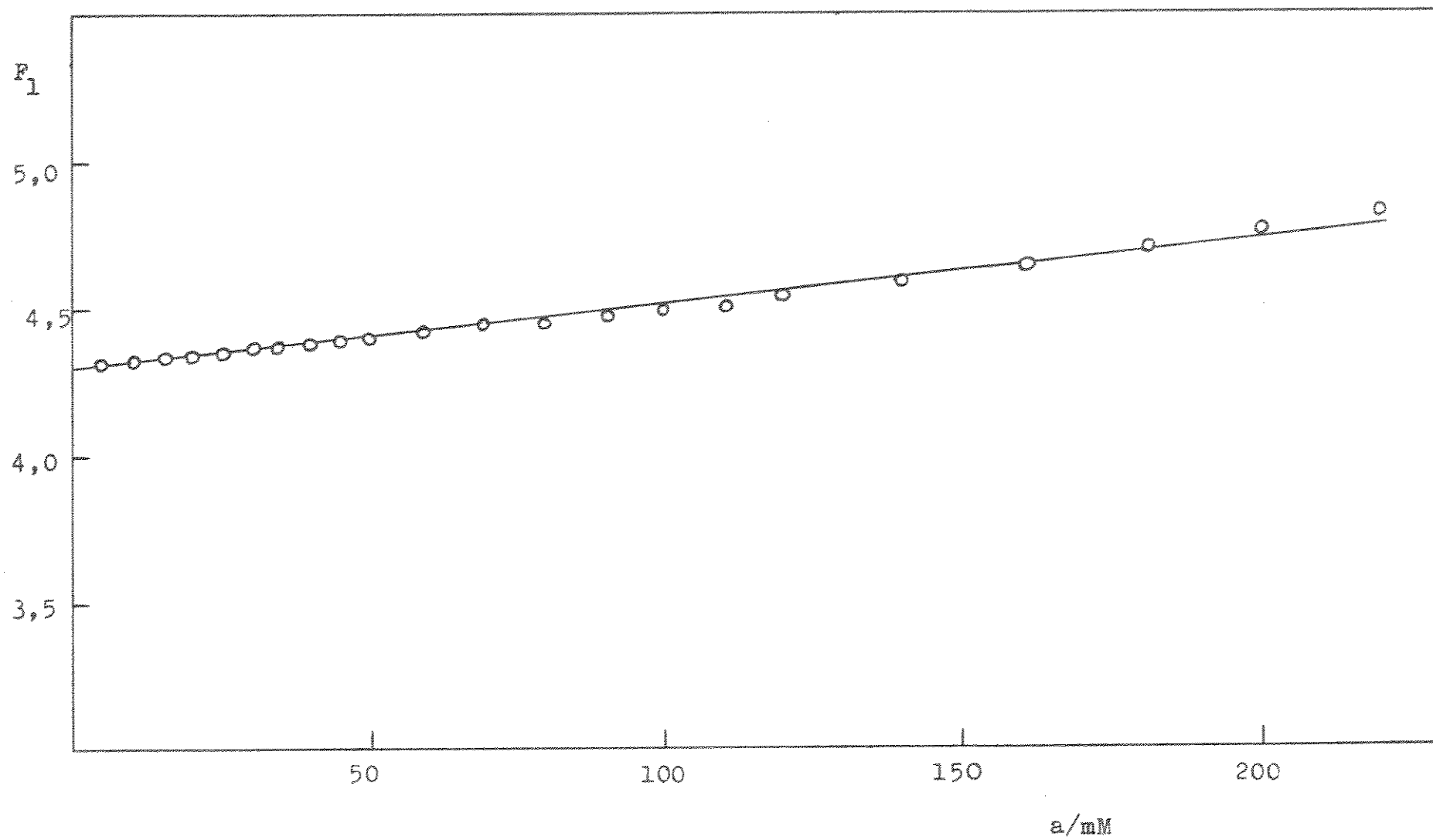


Figura 5. Método de Fronaeus. Aplicação da equação 10.

F_2 em função de $\underline{a}$.

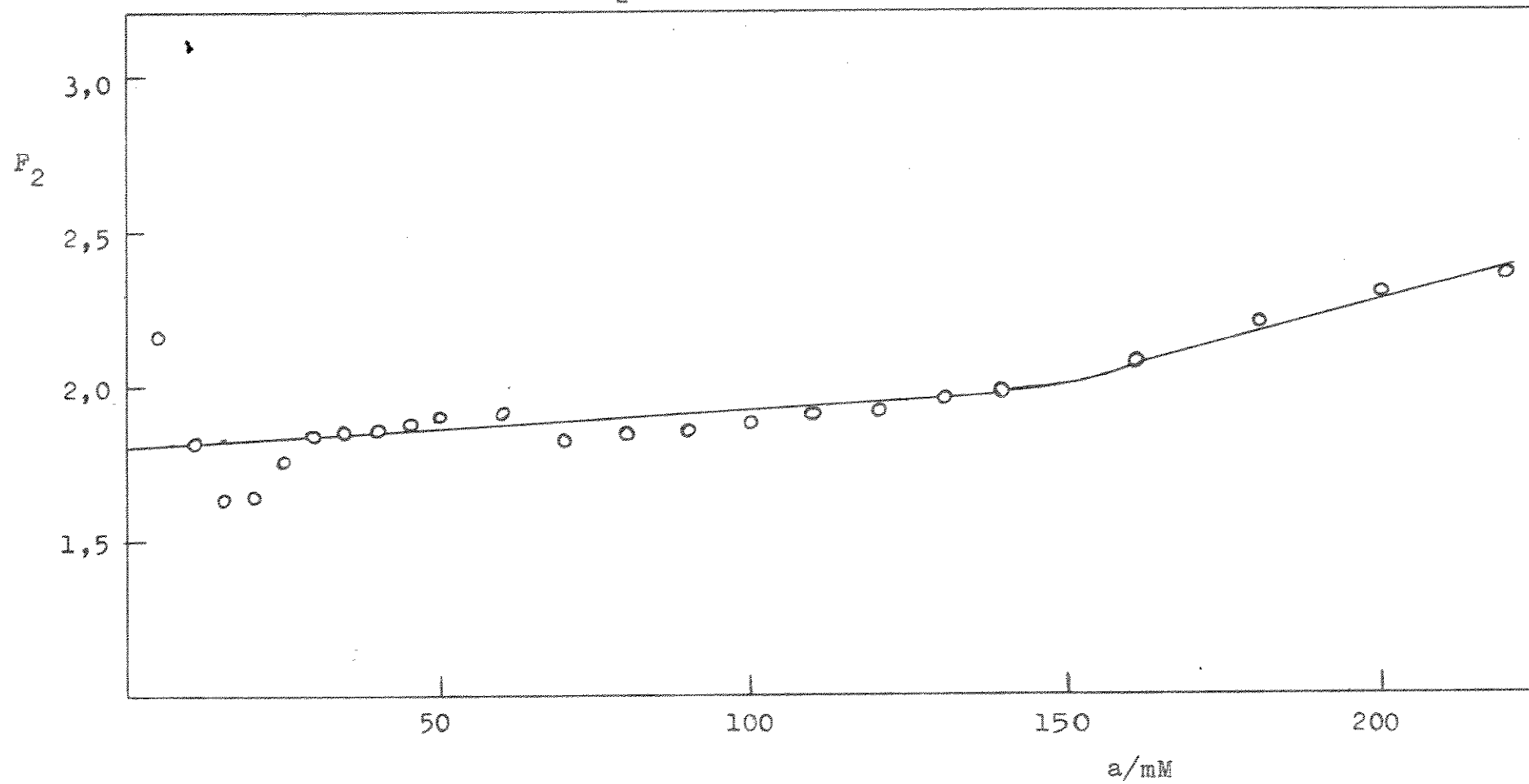


Figura 6. Método de Fronaeus. Aplicação da equação 30.

$F_1 a^{-1}$ em função de $\underline{a}^{-1}$

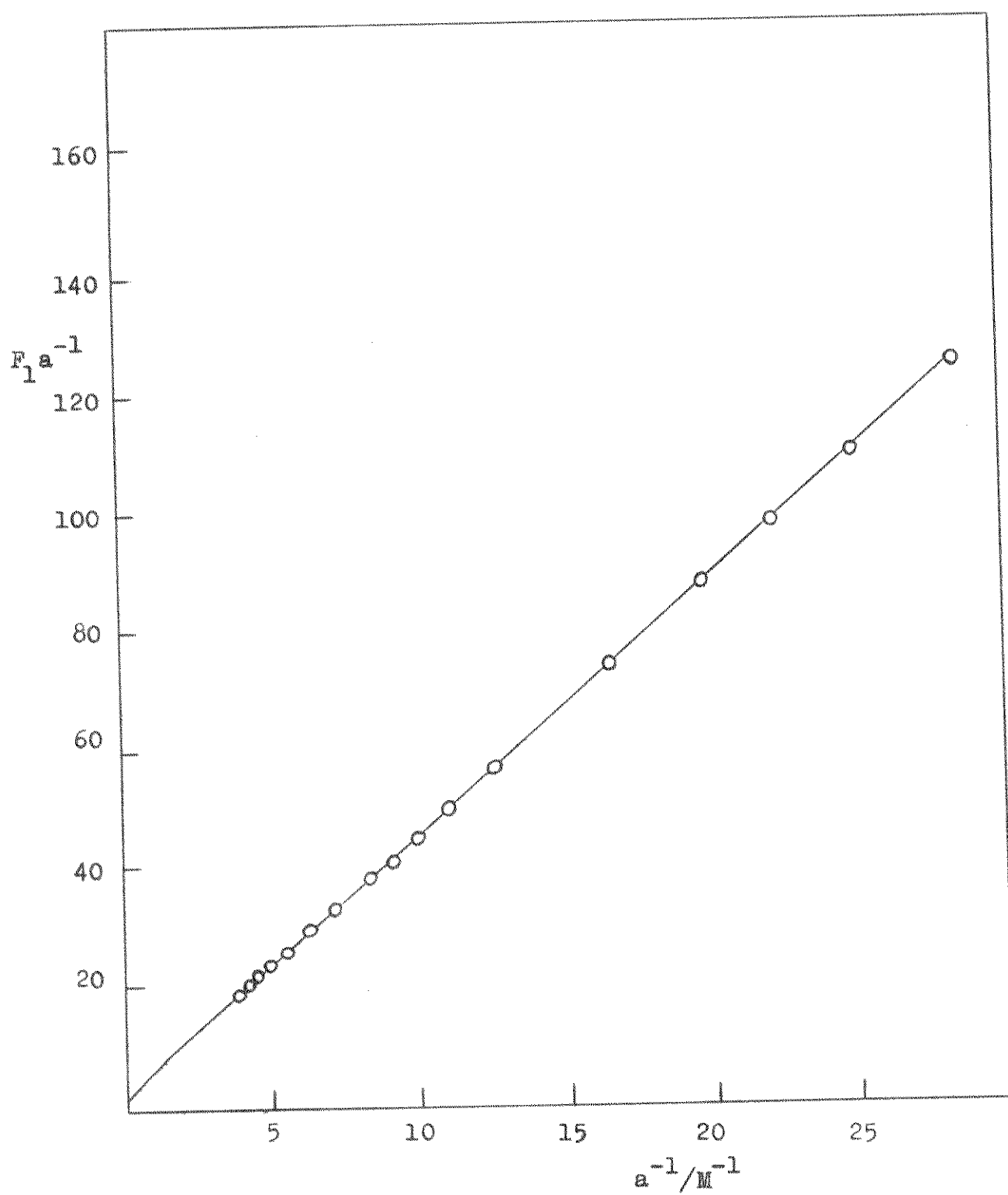


Figura 7. Método de Fronaeus. Aplicação da equação 31.

$F_1 - B_1 a$ em função de a^{-1}

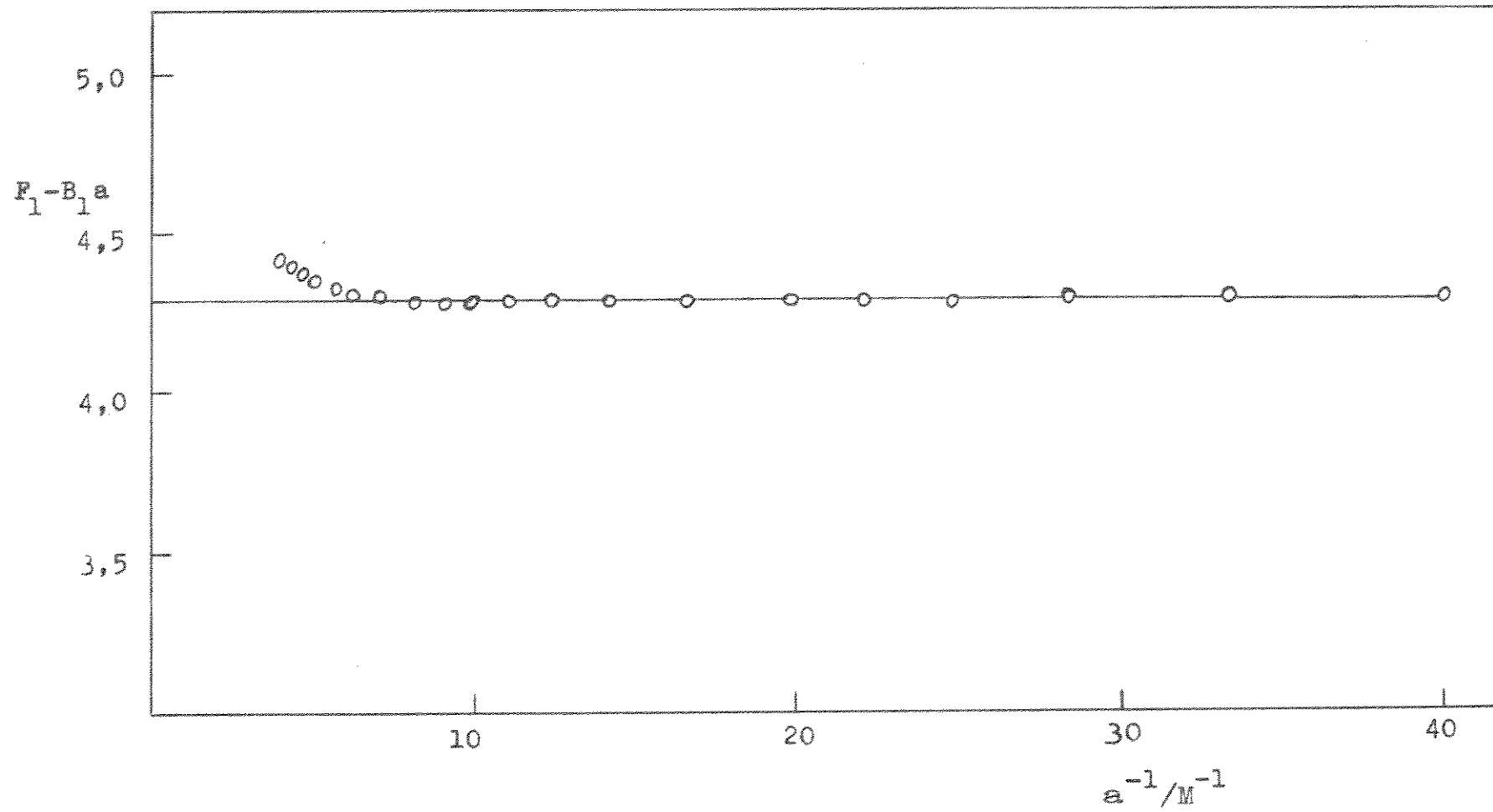
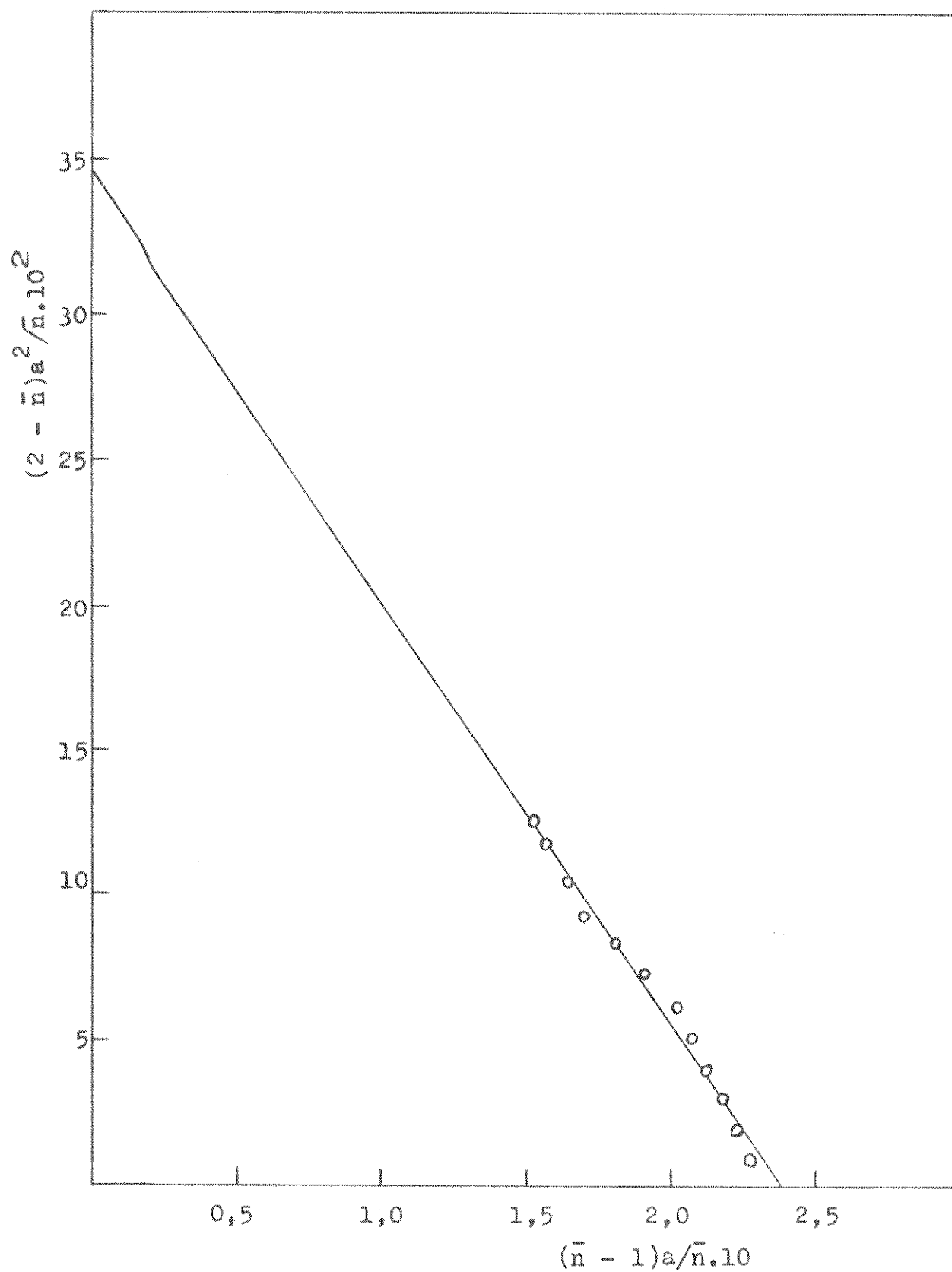


Figura 8. Método linear, aplicação da equação 13.

$$(2-\bar{n})a^2/\bar{n} \text{ vs. } (\bar{n} - 1)a/\bar{n}$$



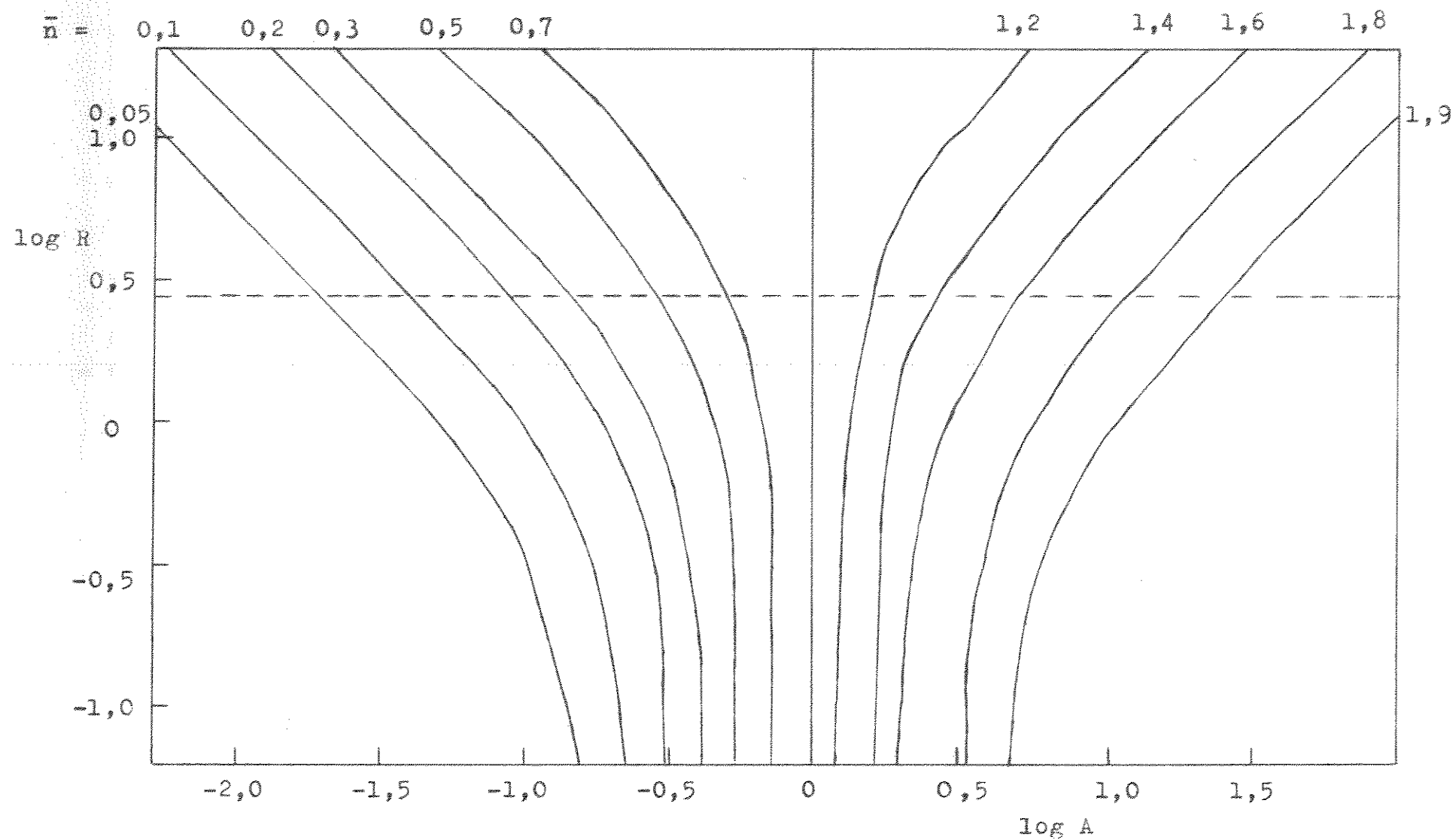


Figura 9. Método da "projeção de faixas". Famílias de curvas $\log R$ em função de $\log A$

Fig. 10. Método da "projeção de faixas". Gráfico de $\bar{n}$ em função de $\log a$.

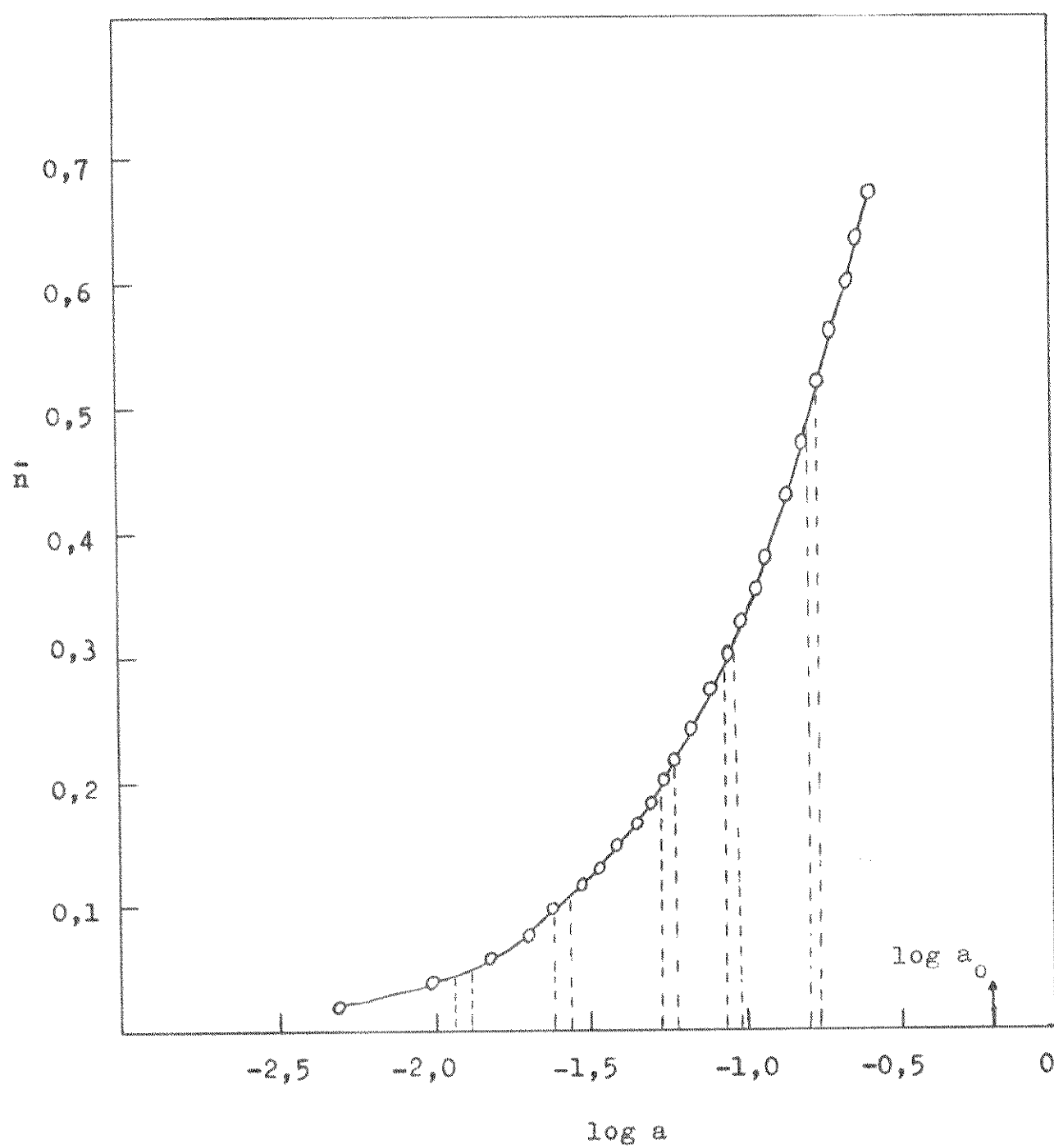


Figura 11. Fração de Mn(II) em suas várias formas como uma função da concentração de ligante livre.

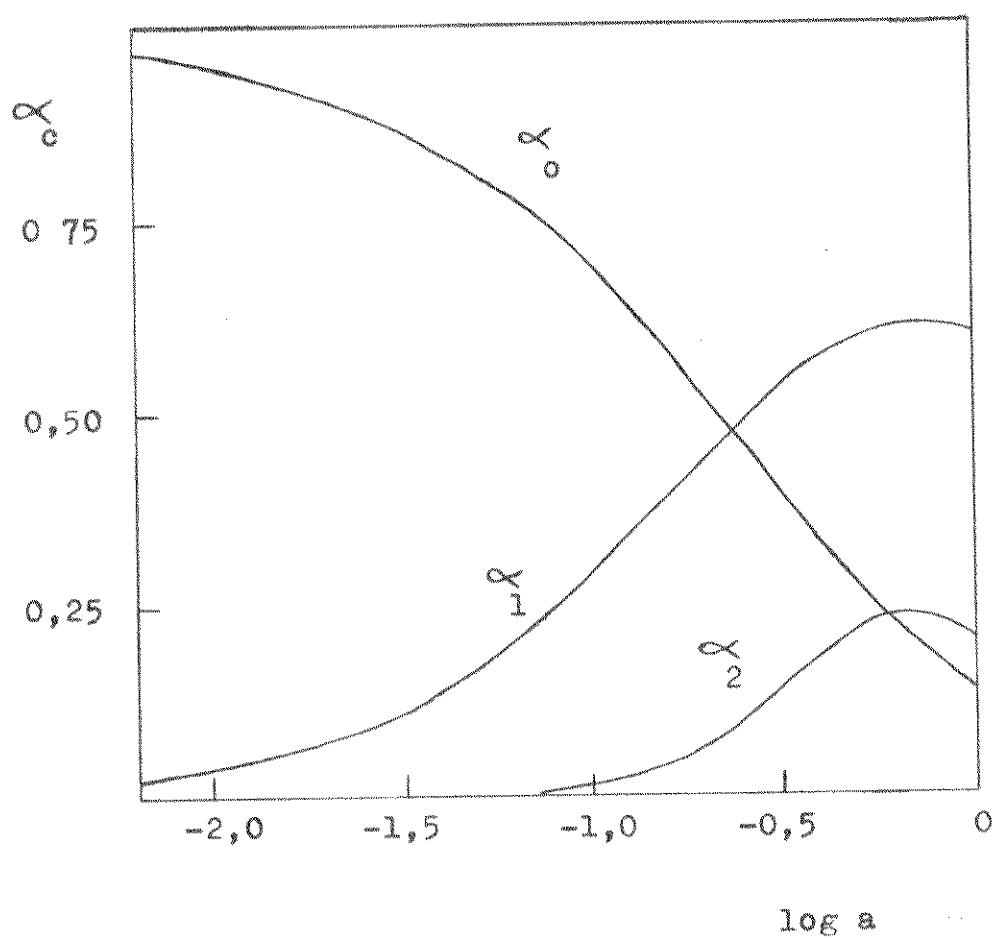
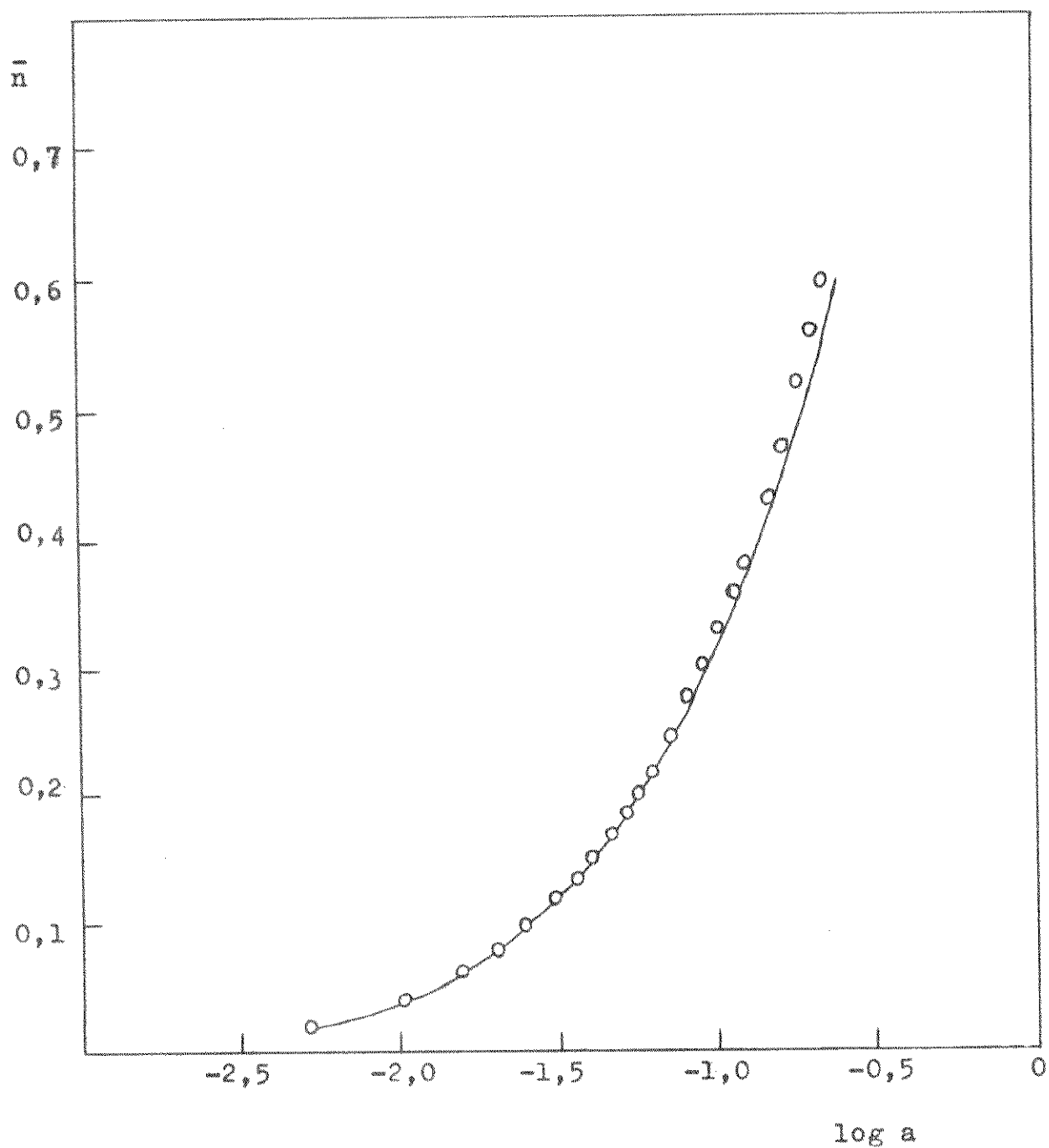


Figura 12. Gráfico $\bar{n}$ em função de $\log a$. Os pontos foram obtidos dos dados experimentais e a curva traçada foi obtida a partir dos valores de 4,3 para B_1 e 1,8 para B_2 .



III.5 - CONCLUSÃO

O estudo potenciométrico do sistema Mn(II) - Azoteto em força iônica 1,0 M e a 25°C, apresentou resultados compatíveis com a formação de duas espécies, as espécies MnN_3^+ e $\text{Mn}(\text{N}_3)_2$, conforme nos mostrou a análise dos dados obtidos quando da aplicação de pelo menos dois diferentes métodos de cálculo.

As constantes de formação dessas espécies, obtidas utilizando-se diferentes métodos de cálculos, apresentaram valores bem reprodutíveis, conforme nos mostra a tabela 13. A variação dos valores de B_1 quando se considera diferentes métodos de cálculo é menor que a variação dos valores de B_2 , que é o que geralmente acontece.

Considerando-se os resultados obtidos para B_1 na tabela 13 e o gráfico da figura 2, podemos assumir um valor de $4,3 \pm 0,4$ para essa constante. Para B_2 , a partir dos dados da mesma tabela, podemos assumir um valor de $1,8 \pm 1,0$.

Nas faixas de concentração de trabalho que nos foi possível realizar em força iônica 1,0 M, a formação de outras espécies não foi evidenciada pelos métodos de cálculos, pois estamos tratando, conforme nos indicam os resultados, de um sistema cujos complexos formados são muito fracos. Entretanto, podemos supor que trabalhando-se em forças iônicas mais elevadas, onde se poderá dispor de maior concentração do ligante, outras espécies poderão se formar.

O valor de $4,3 \pm 0,4$ obtido para a constante de formação da espécie MnN_3^+ , concorda bem com o valor de $4,6 \pm 0,3$, obtido por via espectrofotométrica^(1,2), o que nos assegura a validade do método potenciométrico presentemente empregado. Esses dados de B_1 estão de acordo com a ordem de Irving-Williams, como anteriormente já havia sido mostrado^(1,2,29).

IV - ESTUDO POTENCIOMÉTRICO SOBRE DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CONSTANTE DE EQUILÍBRIO E PONTO DE EQUIVALÊNCIA DE ÁCIDOS E BASES MUITO FRACOS.

Após o estudo potenciométrico do sistema $\text{Mn(II)} - \text{Azoteto}$, procuramos encontrar outros campos de aplicação da potenciometria. Um dos campos que julgamos interessante, é aquele no qual a técnica da titulação potenciométrica é aplicada em titulações ácido-base, onde ácidos e bases muito fracos são possíveis de serem determinados com boa precisão e exatidão.

Já em 1.952 Gran⁽³⁰⁾ desenvolveu métodos gráficos para a determinação precisa do ponto de equivalência de titulações potenciométricas, com excelentes resultados para ácidos moderadamente fracos, tal como ácido acético, quando são titulados com base forte. O método de Gran faz uso de duas funções, uma usada antes do ponto de equivalência, e outra usada depois do ponto de equivalência. Seus gráficos dão duas retas, cujo ponto de interseção corresponde ao volume de equivalência do titulante.

Posteriormente, Ingman e Still⁽¹³⁾ Refinaram o método de Gran, e desenvolveram uma equação mais exata para a determinação do ponto de equivalência da titulação. Este método apresenta a vantagem de poder ser aplicável à titulações de ácidos e bases muito mais fracos que ácido acético, onde o método de Gran não daria bons resultados.

Ivaska e Wanninen⁽¹⁴⁾ empregaram a equação de Ingman e Still na titulação potenciométrica de ácido bórico com base forte, onde determinaram simultaneamente o volume de equivalência e a constante de estabilidade do ácido. Para esse fim, os autores realizaram os cálculos usando um programa desenvolvido para uma calculadora de mesa programável.

Diversos outros estudos, usando gráficos de titula-

ções lineares foram feitos. As funções lineares envolvidas são denominadas às vezes de "funções de Gran modificadas", e diferem das funções originais de Gran por não apresentarem nenhuma de suas aproximações.

Entre esses estudos, podemos inicialmente citar o de I. Hansson e D. Jagner⁽³¹⁾, onde a exatidão dos gráficos de Gran é avaliada por meio de cálculos computacionais.

C. McCallum e D. Migley^(15,16), também fizeram uso de gráficos lineares no estudo de misturas de um ácido forte e um ácido fraco, e no de misturas de ácidos fracos, inclusive misturas de ácidos polibásicos.

Um método de aplicação geral, que usa funções lineares e que permite determinar simultaneamente as concentrações e as constantes de dissociação de componentes ácidos em uma mistura, foi desenvolvido por M.D. Seymour, J.W. Clayton e Q. Fernando⁽¹⁷⁾. O método pode ser tratado computacionalmente e segundo os autores, pode resolver misturas de ácidos cujos pK possam apresentar uma diferença da ordem de $\pm 0,5$ unidade, com boa exatidão.

Outros autores^(16,32) também chegaram a resultados semelhantes, quanto ao limite imposto pelas diferenças de pK, para que as titulações de misturas de ácidos possam ser feitas obtendo-se uma exatidão aceitável.

Podemos citar também outros trabalhos^(33 - 37), referentes a estudos que empregam um tratamento linear das curvas de titulações potenciométricas ácido-base, em diversos tipos de titulações e estudados sob diversos aspectos.

Ao lado desses métodos envolvendo funções lineares no tratamento de dados experimentais, foram desenvolvidos tam**ém** métodos de ajuste de curvas, não lineares^(32,38 - 42). Entre esses convém destacar o trabalho de G. Arena e outros⁽⁴²⁾, que desenvolveram um programa computacional de quadrados minimos não linear, que permite analisar as curvas de titulação potenciométrica ácido-base, refinando todos os parâmetros en

volvidos, mesmo no caso de misturas.

Os métodos não lineares em geral apresentam a vantagem de fornecerem maior quantidade de informações que os métodos gráficos tradicionais⁽⁴²⁾, mas os métodos lineares são mais simples de serem usados e bastante convenientes em muitos casos^(14,17,30), podendo também dar suficientes informações sobre os parâmetros envolvidos na titulação^(14,17).

Esses métodos tanto lineares como não lineares, têm sido aplicados no desenvolvimento de métodos rápidos e precisos, para a análise de ácidos fracos ou misturas de ácidos^(15,16,36,38,39,42); onde inclusive um deles usa uma calculadora de mesa programável, para conduzir automaticamente a titulação e tratar os dados experimentais simultaneamente⁽³⁹⁾.

IV.1 - TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE AZOTETO

O ácido azotídrico foi descoberto em 1890 por Curtius⁽⁴³⁾, iniciando-se a partir daí o seu estudo, bem como o de compostos contendo o íon azoteto. Esses compostos possuíam alto poder explosivo, o que inicialmente despertou o interesse dos pesquisadores.

Entre os diversos métodos para a determinação de azoteto existentes na literatura, podemos citar os métodos espectrofotométrico⁽⁴⁴⁾, polarográficos^(45,46,47,48), amperométrico⁽⁴⁹⁾, argentimétrico⁽⁵⁰⁾ e um método termométrico⁽⁵¹⁾ para a determinação de azotetos insolúveis. Também foi verificado que o azoteto de sódio pode ser usado como padrão primário⁽⁵²⁾.

Um método excelente e simples, possivelmente o mais empregado na determinação de azoteto é o apresentado por West⁽⁵³⁾. O método consiste no tratamento de um volume conhecido da solução de azoteto, com excesso de solução padrão de ácido sulfúrico ou perclórico, fervendo-se a seguir a solu-

ção para eliminar o HN_3 formado, titulando-se o excesso de ádo com base forte. Apesar de simples, o método tem a inconveniência de ser um método indireto, além de haver riscos de perdas durante a fervura do HN_3 e existir a possibilidade de se titular hidróxido livre, existente no azoteto em pequenas proporções, devido à secagem em condições inadequadas⁽⁵⁴⁾.

Quanto à métodos potenciométricos, há a determinação de azoteto através da técnica da potenciometria direta⁽⁵⁵⁾, onde é usado uma cela de concentração com dois eletrodos idênticos de $\text{Ag}/\text{AgN}_3, \text{N}_3^-$. Há também na literatura referências sobre eletrodos seletivos para o íon azoteto⁽⁵⁶⁾, o que poderá ser altamente promissor na sua determinação.

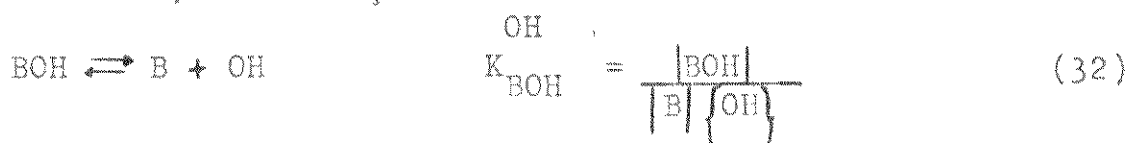
Dessa forma, entre os métodos existentes para a determinação de azoteto de sódio, nos pareceu útil poder desenvolver um método usando-se a técnica da titulação potenciométrica, que pode apresentar vantagens sobre outros métodos.

Uma titulação potenciométrica convencional de azoteto com ácido forte, não permitiria localizar com precisão o ponto de equivalência, uma vez que o íon azoteto é uma base fraca em meio aquoso, com um valor de K_b da ordem de 10^{-10} . No entanto, o uso de um método gráfico linear ou não linear, conforme discutimos anteriormente, pode tornar a titulação potenciométrica plenamente viável.

Procuramos então utilizar um método gráfico linear para a determinação de azoteto, através da técnica da titulação potenciométrica, semelhante ao utilizado por Ivaska⁽¹⁴⁾, na determinação de ácido bórico.

A equação empregada nesse método, pode ser obtida a partir das condições seguintes, que serão válidas quando uma base fraca é titulada com um ácido forte.

a) Lei da ação das massas:



Por conveniência, omitiremos os sinais das cargas dos íons envolvidos. A constante de associação K_{BOH} é uma constante mista, válida à uma certa força iônica. Constantes mistas, onde as atividades de íons hidrogênio e hidroxila, (representadas por $\{H\}$ e $\{OH\}$), são usadas juntamente com a concentração de todas as demais espécies, e são bem conveniente para cálculos de equilíbrio, uma vez que os valores de pH são quase sempre determinados potenciometricamente. A atividade do íon hidroxila é relacionada à sua concentração pela expressão:

$$\{OH\} = f_{OH} |OH| \quad (33)$$

onde f_{OH} é o coeficiente de atividade do íon hidroxila.

b) Considerando-se que a base fraca BOH está sendo titulada com um ácido forte HA, a condição de eletroneutralidade deverá ser satisfeita:

$$|A| + |OH| = |B| + |H| \quad (34)$$

c) A equação

$$V_{eq} C_H = V_o C_{BOH} \quad (35)$$

deve ser válida no ponto de equivalência, onde C_H e C_{BOH} são as concentrações analíticas de ácido forte e base fraca, respectivamente.

A concentração de íons A é dada por

$$|A| = \frac{V}{V_o + V} C_H \quad (36)$$

Essa equação, combinada com a equação 34, dá:

$$|B| = \frac{V}{V_o + V} C_H + |OH| - |H| \quad (37)$$

e

$$|BOH| = \frac{V_o}{V_o + V} C_{BOH} - |B| = \left(\frac{V_{eq} - V}{V_o + V} \right) C_H - |OH| + |H| \quad (38)$$

Substituindo-se as equações 37 e 38 na equação 32, e reorganizando-se subsequentemente os termos, chega-se a:

$$V_{eq} - V = V \{OH\} K_{BOH}^{OH} + \frac{V_o + V}{C_H} (|OH| - |H|) (1 + \{OH\} K_{BOH}^{OH}) \quad (39)$$

A equação 39 tem a mesma forma da equação usada por Ivaska⁽¹⁴⁾, na titulação de um ácido fraco com uma base forte. Quando traçamos o gráfico dessa equação, tomando-se $V_{eq} - V$ em função de V , obtém-se uma reta com uma inclinação de 45°.

A equação 39 pode ser reescrita na forma da equação da reta $y = ax + b$:

$$\frac{V_o + V}{C_H} (|OH| - |H|) + V = \frac{-1}{K_b} \left[V + \frac{(V_o + V)}{C_H} (|OH| - |H|) \right] \{OH\} + V_{eq} \quad (40)$$

Esta equação permite-nos obter os valores de K_b e V_{eq} , a partir dos valores do coeficiente angular e coeficiente linear, respectivamente, determinados a partir dos dados experimentais.

IV.2 - DADOS EXPERIMENTAIS E CÁLCULOS

Inicialmente o nosso estudo foi feito em força iônica 1,0 M e a 25°C, com o objetivo de aproveitarmos a aparelhagem usada no estudo do sistema Mn(II) - Azoteto, que permite medir a f.e.m. com boa precisão, e testarmos o método, comparando-se o valor do K_a do HN_3 , obtido a partir do valor de K_b da equação 40, com o valor da literatura, determinado nessas mesmas condições⁽⁴⁾.

Para as medidas experimentais, usamos uma solução padrão de ácido perclórico e uma solução de azoteto de sódio, de título conhecido, obtido por pesagem, uma vez que o azoteto de sódio pode ser usado como padrão primário⁽⁵²⁾. A força iônica dessas soluções foi ajustada com perclorato de sódio.

O mesmo conjunto de eletrodos usado no estudo do sistema Mn(II) - Azoteto foi empregado. A calibração dos eletrodos foi feita da mesma maneira que a feita nesse estudo, e o valor de E^0 foi determinado pela equação 25.

As titulações foram realizadas adicionando-se ácido perclórico padronizado de uma bureta, à um volume V_0 da solução de azoteto, medindo-se a f.e.m. à cada adição. A temperatura foi mantida constante pela circulação de água de um termostato, através da camisa do vaso de titulação. Como as soluções de ácido perclórico e azoteto de sódio usadas eram 1,00 M em NaClO_4 , a força iônica permaneceu constante durante toda a titulação. A partir dos valores da f.e.m. a concentração hidrogeniônica foi calculada pela equação 24.

Examinando-se a equação 40, verifica-se que é necessário conhecer os valores da concentração hidrogeniônica e de íons hidroxila, para se fazer os cálculos, além dos valores do volume inicial antes da adição de titulante V_0 , do volume de titulante à cada adição V e da concentração analítica do titulante C_H . A partir da concentração de íons hidrogênio determinada experimentalmente, calculamos a concentração de íons hidroxila através da expressão de K_w , cujo valor assumido foi de $1,00 \cdot 10^{-14}$ (57).

Na tabela 15 estão os dados experimentais de uma titulação de azoteto de sódio com ácido perclórico, feita em força iônica 1,0 M e a 25°C, bem como os resultados dos cálculos.

Os cálculos foram feitos por um programa de quadrados mínimos, desenvolvido para a calculadora de mesa HP 20, usando-se a equação 40. Este programa também foi escrito em linguagem BASIC, para o computador PDP-10 do centro de computação da UNICAMP, cuja representação esquemática encontra-se na figura 13, e sua listagem encontra-se no apêndice I.

O resultado obtido para a localização do volume de equivalência, comparado com o valor teórico do volume de e-

Tabela 15. Titulação de NaN_3 com HClO_4 0,09500 M

$$T = (25 - 0,1)^\circ\text{C}$$

$$I = 1,00 \text{ M}$$

$$V_0 = 18,12 \text{ ml} \quad C_{\text{NaN}_3} = 0,1001 \text{ M}$$

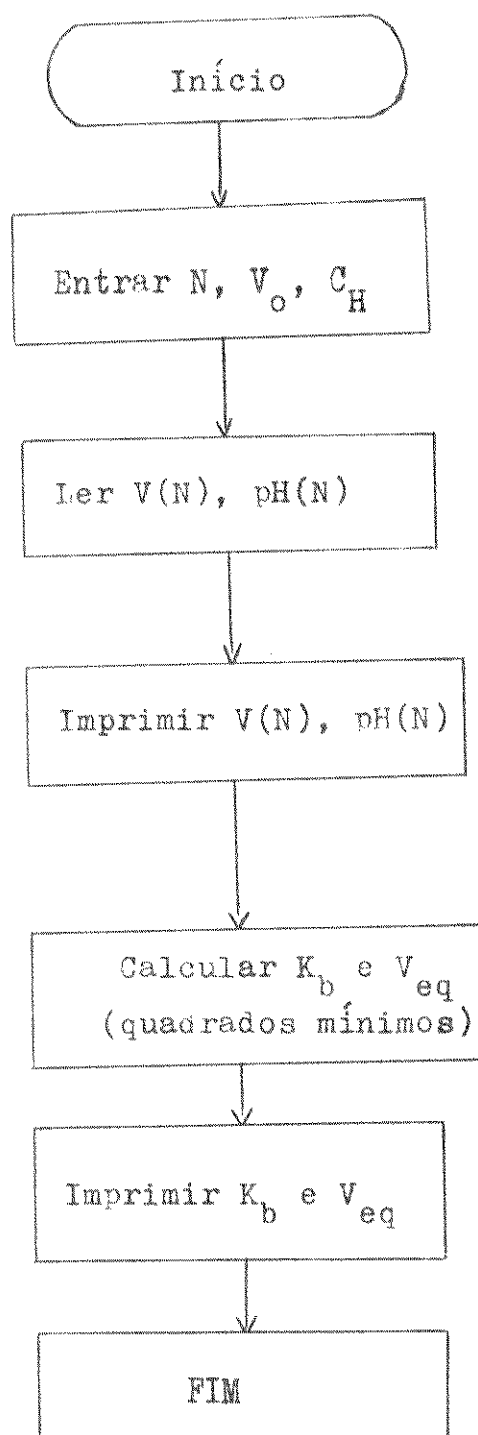
$$E^{0'} = 338,9 \text{ mV}$$

V/ml	E/mV	pH	pOH	(Veq - V)/ml
2,00	21,7	5,362	8,638	17,06
4,00	42,8	5,005	8,995	14,99
6,00	56,7	4,770	9,230	13,09
8,00	68,5	4,571	9,429	11,03
9,10	74,6	4,468	9,532	9,89
9,50	76,9	4,429	9,571	9,44
10,00	79,0	4,393	9,607	9,14
11,00	84,7	4,297	9,703	8,05
12,00	90,2	4,204	9,796	7,08
14,00	102,3	3,999	10,000	5,14
16,00	118,4	3,727	10,273	3,08
18,00	145,8	3,264	10,736	1,01
19,00	168,4	2,882	11,118	0,01
20,00	189,9	2,519	11,481	-0,98

Veq teórico = 19,09 ml	Veq calculado = 19,04 ml
------------------------	--------------------------

$K_a = 3,71 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$

Figura 13. Representação esquemática do programa de quadrados mínimos referente à equação 40.



quivalência, apresentou uma exatidão da ordem de 0,3%. O valor de V_{eq} teórico, assumido como sendo o valor verdadeiro, foi calculado a partir do título do azoteto de sódio obtido por pesagem.

A reprodutibilidade obtida ao se repetir a mesma titulação foi sempre melhor que 0,3%. Uma boa precisão nessas condições é facilmente obtida, desde que a força iônica e a temperatura sejam controladas, e as medidas de pH sejam bem precisas. Esses são requisitos necessários para uma aplicação bem sucedida desse método.

O valor do pK do HN_3 obtido por este método também apresentou boa concordância com o valor obtido por Ahrlund⁽⁴⁾, nessas mesmas condições experimentais.

Uma representação gráfica baseada na equação 39 pode ser feita facilmente, calculando-se valores de $V_{eq} - V$ para cada ponto da titulação, e colocando-os em um gráfico em função de valores de V . A reta obtida terá uma inclinação igual a -1 e interceptará o eixo V no ponto onde $V = V_{eq}$.

Na figura 14 têm-se um gráfico de $V_{eq} - V$ em função de V , onde os valores de $V_{eq} - V$ foram calculados pela equação 39, a partir dos dados da tabela 15.

Após termos verificado a validade do método, determinando-se o azoteto de sódio em força iônica 1,0 M, realizamos a sua determinação em baixa força iônica, usando-se eletrodos de vidro e Ag/AgCl, combinados em um só conjunto, onde a titulação pode ser feita de um modo mais simples e cômodo.

Para as titulações nessas novas condições, usamos solução de NaN_3 0,1 M em KCl e solução padrão de HCl também 0,1 M em KCl. Os eletrodos foram calibrados usando-se tampões NBS de pH 4,01 e 9,18. As titulações foram feitas da mesma maneira que anteriormente, apenas fazendo-se agora a leitura diretamente em valores de pH.

Na tabela 16 estão os dados experimentais de uma titulação de azoteto de sódio com ácido clorídrico, em força i

Figura 14. Titulação de NaN_3 com HClO_4 . $V_{\text{eq}} - V$ em função de V , conforme equação 39

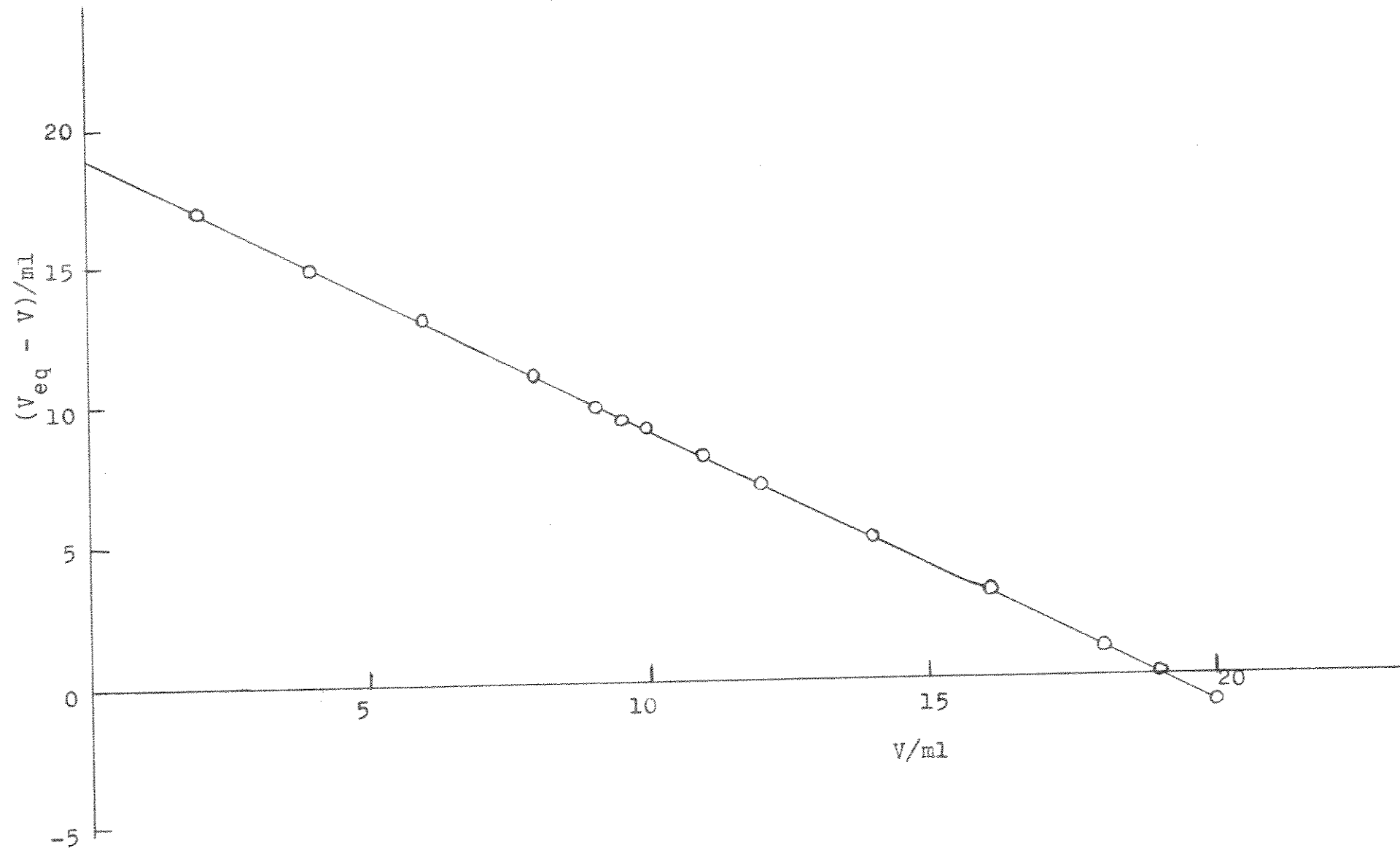


Tabela 16. Titulação de NaN_3 com HCl 0,09672 M

$$T = (25 - 0,1)^\circ\text{C}$$

$$I = 0,10 \text{ M}$$

$V_0 = 18,12 \text{ ml}$		$C_{\text{NaN}_3} = 0,1000 \text{ M}$	
V/ml	pH	pOH	$(V_{\text{eq}} - V)/\text{ml}$
2,00	5,447	8,553	16,86
4,00	5,088	8,912	14,75
5,00	4,957	9,043	13,63
6,00	4,846	9,154	12,67
7,00	4,743	9,257	11,66
8,00	4,649	9,351	10,73
8,50	4,602	9,398	10,23
9,00	4,557	9,443	9,76
9,50	4,510	9,490	9,24
10,00	4,470	9,530	8,87
11,00	4,374	9,626	7,82
12,00	4,278	9,722	6,83
13,00	4,173	9,827	5,80
14,00	4,059	9,941	4,79
15,00	3,936	10,064	3,84
16,00	3,778	10,222	2,81
17,00	3,568	10,432	1,76
18,00	3,257	10,743	0,72
19,00	2,833	11,167	-0,30
19,50	2,663	11,367	-0,85

$$V_{\text{eq}} \text{ teórico} = 18,73 \text{ ml}$$

$$V_{\text{eq}} \text{ calculado} = 18,75 \text{ ml}$$

$$K_a = 3,01 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$$

ônica 0,1 M e a 25°C, e os resultados dos cálculos. Os cálculos foram feitos do mesmo modo que anteriormente, pelo programa baseado na equação 40. Para usar essa equação em força iônica 0,1 M, é necessário transformar as atividades de íons hidrogênio e íons hidroxila em concentrações. Para esse fim, utilizamos os coeficientes de atividade de Kielland⁽⁵⁸⁾. O valor de K_w assumido nessa força iônica foi também de 1,00. $\cdot 10^{-14}$.

Na figura 15 tem-se um gráfico dos valores de $V_{eq}-V$ em função de V , relativos aos dados da tabela 16, cuja reta intercepta o eixo V no ponto correspondente ao volume de equivalência, V_{eq} .

O valor de pK do HN_3 obtido nessa força iônica, também concorda satisfatoriamente com valores encontrados na literatura^(59,60). A exatidão e a precisão obtidas nessas condições, para a determinação do volume de equivalência, foram da mesma ordem que as obtidas em força iônica 1,0 M.

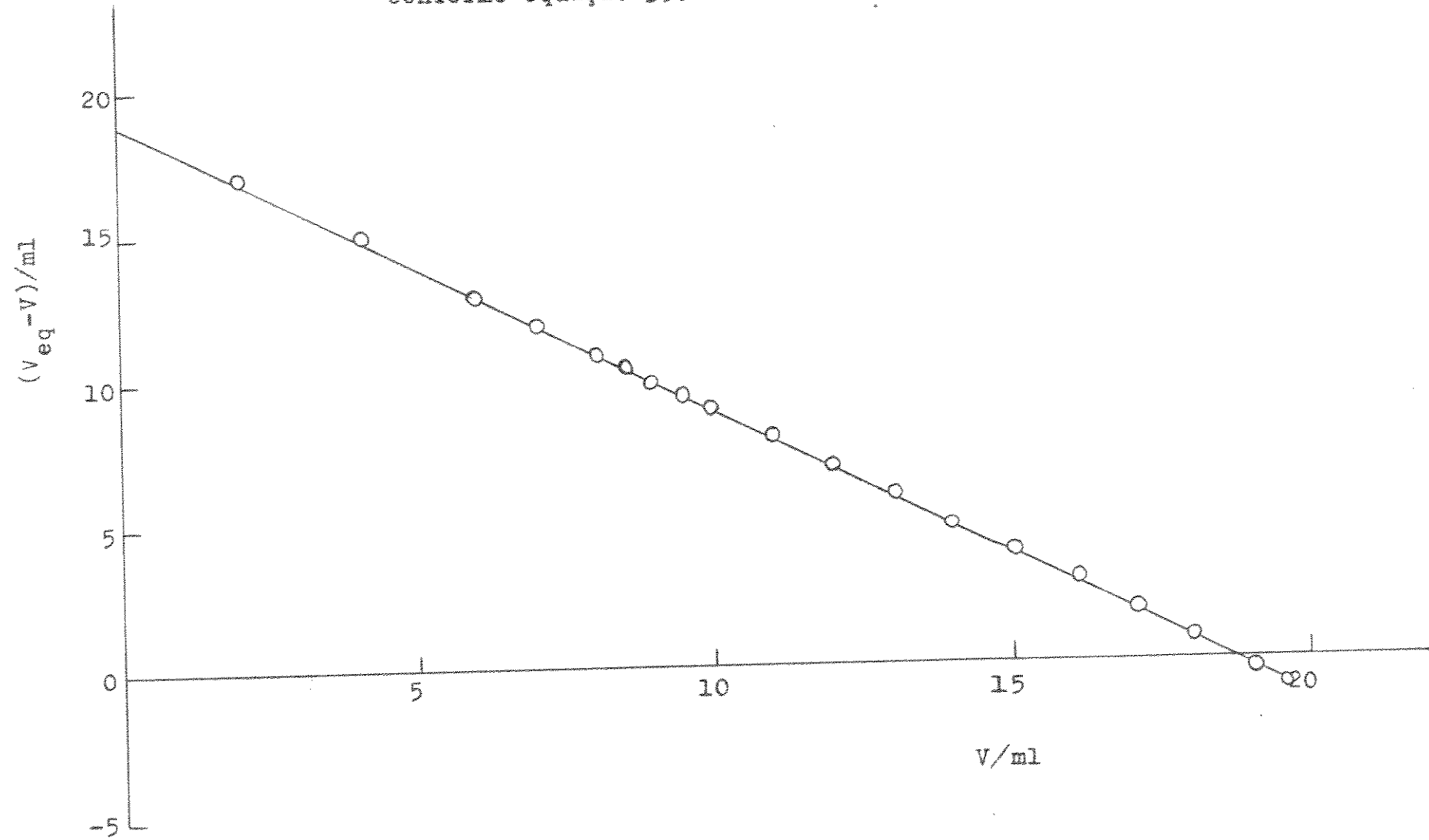
IV.3 - CONCLUSÃO

O método que usamos na determinação analítica de azoteto de sódio, deu resultados que consideramos plenamente satisfatórios, tanto em força iônica 1,0 M como em força iônica 0,1 M.

A equação 40, usada nesse estudo, é uma equação mais refinada que as equações originais de Gran. Além dessa equação ter um uso mais amplo quanto à localização precisa do volume de equivalência, em relação às equações de Gran, ela permite-nos obter o valor do K_a do ácido ou K_b da base, dado este que é muito útil na identificação da substância que está sendo determinada.

As expressões de Gran para ácido ou base fracos são

Figura 15. Titulação de NaN_3 com HCl . $V_{\text{eq}} - V$ em função de V , conforme equação 39.



válidas para titulações de substâncias com constante de dissociação entre 10^{-3} e 10^{-7} , de concentrações até da ordem de 10^{-2} - 10^{-3} M, enquanto que a equação 39 ou 40 inclui substâncias com constante de dissociação menor que 10^{-10} (61).

Ao se processar os cálculos pelo nosso programa, observamos que quanto maior for o número de medidas experimentais, da região do início da curva de titulação até ao redor do volume de equivalência, usadas nos cálculos, melhor serão os resultados quanto à precisão e exatidão obtidas. Verificamos que um conjunto típico de 20 pontos nessa região da curva dá resultados plenamente satisfatórios. Ivaska⁽¹⁴⁾ recomenda incluir pontos até 5% além do volume de equivalência, e usa um maior número de pontos ao redor do volume de equivalência do que em outras regiões da curva. Verificamos também que no uso de nosso programa, pontos muito próximos do início da titulação não são muito favoráveis, obtendo-se melhores resultados não incluindo pontos abaixo de um volume correspondente à 15-20% do volume de equivalência. Em resumo, para a obtenção de melhores resultados empregando-se a equação 40, devemos usar um conjunto típico de 20 pontos, a partir de um volume correspondente à 15-20% do volume de equivalência, até 5% além do volume de equivalência.

Quanto às condições experimentais para a realização de titulações bem sucedidas, pelo presente método ou outro que usa expressões mais refinadas que as de Gran, é necessário efetuar o controle de força iônica e temperatura. Também é bem vantajoso dispor de um pH-metro digital, com leituras de pH de duas, ou ainda melhor, três casas decimais.

No caso de não ser possível ou conveniente manter a força iônica constante durante a titulação, pode ser incluído no programa utilizado para efetuar os cálculos expressões de Debye-Huckell, que permitirão calcular os coeficientes de atividade de íons hidrogênio e hidroxila em cada ponto da titulação.

V - ESTUDO POTENCIOMÉTRICO SOBRE SEGMENTAÇÃO E LINEARIZAÇÃO DE CURVAS DE TITULAÇÃO DE PROTEÍNAS

V.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estudo potenciométrico de azoteto de sódio, permitiu-nos tomar contato com métodos potenciométricos em que os dados são tratados computacionalmente, e podem ser usados na determinação precisa de ácidos fracos, bases fracas, mistura de ácidos fracos ou de bases fracas, não possíveis de serem determinados pelos métodos convencionais.

Uma aplicação desses métodos potenciométricos que julgamos interessante, seria na titulação de proteínas com ácidos e bases fortes, uma vez que a investigação de grupos tituláveis de proteínas (ácidos e bases de Bronsted), é de vital importância na elucidação da estrutura e interações da proteína^(23,24,25). Por outro lado esse tipo de estudo poderia apresentar interesse no que se refere à aplicações analíticas. Esses grupos tituláveis podem ser subdivididos de acordo com a natureza química de cada um; assim podemos ter em uma proteína grupos carboxílicos, amino, imidazol, etc.

Nos estudos de titulações potenciométricas de proteínas, uma série de suposições podem ser feitas, em relação aos valores de pK esperados para seus diferentes tipos de grupos tituláveis⁽¹⁸⁾. Vamos considerar, por exemplo, o grupo carboxílico titulável de ácido glutâmico de cadeia lateral. Podemos assumir, em primeira aproximação, que o valor do pK desse grupo seja próximo do valor do pK do ácido acético (4,76), ou do ácido propiônico (4,87). Para se obter uma melhor estimativa, pode-se levar em conta o fato de que o ácido glutâmico de cadeia lateral nas proteínas, está sob a influência de grupos polares NH e CO, ligados ao terceiro átomo de carbono próximo do grupo -COOH. Nesse caso o pK esperado pode

ser igual ao pK de um composto contendo grupos polares similarmente localizados, tal como monoalquil glutarato, cujo pK é 4,55. Dentro de uma incerteza de 0,1 ou 0,2 unidade, o pK esperado é usualmente obtido dessa maneira, estimado através de diversos modelos alternativos de compostos. Com uma incerteza dessa ordem, o efeito da contribuição da proteína à força iônica é desprezível, dentro de razoáveis limites, mas isso deve ser verificado experimentalmente.

Dessa maneira, se as moléculas de proteínas não apresentam nenhuma interação que não aquelas que estejam presentes em moléculas pequenas, o pK de seus grupos tituláveis deve ser igual ao esperado, obtido através de estimativas feitas como explicado atraz. A presença de forças eletrostáticas pode fazer com que haja desvios do valor de pK esperado da ordem de 1,5 unidades, mais ainda aqui correções podem ser feitas.

A suposição de que as moléculas de proteínas não apresentam interações que não estejam presentes em moléculas pequenas, evidentemente não é correta. Interações próprias da proteína podem ocorrer, e a obtenção de resultados diferentes de resultados esperados são de interesse e importantes no estudo de curvas de titulação de proteínas.

Para a realização de titulações de proteínas, com o objetivo de se determinar o número e o tipo de seus grupos tituláveis, podemos assumir em primeira aproximação, que todos os grupos de um dado tipo possuem o mesmo pK intrínseco, "não perturbado", e que cada grupo apresenta o mesmo valor de pK em qualquer pH. A solução de proteína pode ser tratada como uma mistura de ácidos ou bases de Bronsted.

Em uma curva completa de titulação de proteínas, a contribuição de cada tipo de grupo titulável é atribuída à uma região da curva^(18,19,20). Assim, a titulação na região de pH de 1,5 a 6,0 é atribuída à contribuição de grupos carboxílicos de cadeia lateral, exceto os presentes como amidas.

A titulação entre pH 6,0 e 8,5 é atribuída à histidina (imi-dazol) e grupos α -aminoácidos presentes em quantidades muito pequenas. A titulação de pH 8,5 até o final da curva, nem sempre bem definido, em pH 11 - 12, é atribuída a grupos ϵ -amino da lisina, grupos hidroxila fenólicos da tirosina e grupos sulfúricos da cisteína. A arginina não é diretamente estimada por titulação, porque o grupo guanidina é uma base suficientemente forte e não é convertida em uma forma não ioninizada em quantidade significativa, à um pH onde medidas precisas sejam possíveis.

No caso particular da ovalbumina, os grupos estimáveis por titulação são os carboxílicos na região ácida, os i-midazol da histidina na região neutra, e os grupos amino da lisina na região alcalina, não sendo detetáveis os grupos fenólicos, que são inacessíveis à titulação⁽²⁰⁾. A curva completa de titulação de ovalbumina, envolvendo todos os seus grupos tituláveis, pode ser obtida entre pH 2 e 11.

Uma simples curva de titulação potenciométrica de proteínas, não permite determinar o número de grupos tituláveis de cada tipo, devido à ausência de pontos de inflexão a-dequados, em razão da limitação imposta pelos valores das constantes de dissociação desses grupos^(20,62).

Dessa maneira, o método mais comum empregado para a obtenção da curva de titulação potenciométrica de proteínas^(18,19,20,21), consiste no uso de uma solução de proteína de concentração conhecida, à um pH de referência arbitrário, on-de é adicionado à essa solução quantidades variáveis de ácido forte ou base forte, medindo-se entao o novo pH obtido. Em uma experiência separada, usando-se uma solução sem a presen-ça da proteína, mas de mesmo pH inicial, mesma força iônica, mesmo volume, etc, determina-se a quantidade de ácido ou base necessária para conduzir a solução ao mesmo pH final da

solução de proteína. A quantidade de ácido ou base requerida para a solução de proteína será sempre maior que a quantidade requerida para a solução correspondente sem a presença da proteína. A diferença entre as duas quantidades nos dará o número de íons hidrogênio ligados ou dissociados da proteína, indo do pH de referência ao pH final. Um gráfico dessa quantidade versus o pH final, de diversas experiências desse tipo, dá a desejada curva de titulação. Posteriormente a análise da curva de titulação permitirá estabelecer as relações estequiométricas dos grupos e determinar seus valores de pK (18,20,21).

Portanto, as titulações potenciométricas usuais de proteínas, embora sejam de grande utilidade na caracterização das mesmas, são bastante trabalhosas e inconvenientes do ponto de vista analítico. Em razão disso, um método que permitisse determinar a quantidade de cada grupo titulável e seus valores de pK, a partir de uma simples curva de titulação, seria de grande utilidade no estudo de proteínas.

Um método que atende em parte à essas exigências é o termométrico. Esse método foi usado por N.D. Jespersen e J. Jordam⁽⁶²⁾, onde através de uma simples curva de titulação termométrica, determinaram por simples extrapolação gráfica os grupos tituláveis da ovalbumina. No entanto, o pK desses grupos não podem ser determinados por este método. Por outro lado a precisão com que são determinados alguns dos grupos funcionais, assim como o fato de não se poder usar um titulador termométrico convencional, são desvantagens do uso deste método para fins analíticos.

Procuramos então desenvolver um método potenciométrico, que pudesse apresentar vantagens sobre os métodos potenciométricos comuns e também sobre os termométricos. Para esse fim, tentamos usar um método baseado no método de cálculo de Seymour, Clayton e Q. Fernando⁽¹⁷⁾. Conforme já vimos no início do capítulo IV, esse método é baseado no uso de fun

ções lineares e pode ser tratado computacionalmente, permitindo determinar simultaneamente as concentrações e as constantes de dissociação de ácidos e bases, em misturas de ácidos ou bases. O método aplicado à titulações de proteínas, apresentaria vantagens sobre as titulações potenciométricas convencionais de proteínas, pois permitiria a partir de uma simples curva de titulação, determinar simultaneamente a quantidade de grupos tituláveis de cada tipo e seus valores de pK, podendo distinguir grupos com diferenças de pK de até $\pm 0,5$ unidade, e também seria mais simples do ponto de vista experimental. Sobre o método de titulação termométrica, teria a vantagem de permitir obter os valores de pK para cada tipo de grupo titulável, e a vantagem de usar aparelhagem convencional.

Para realizar esse estudo escolhemos a ovalbumina, que apresenta certas vantagens do ponto de vista experimental, como o fato de ser uma proteína solúvel em água e suas soluções apresentarem boa reprodutibilidade de medidas de pH⁽²⁰⁾.

Trabalhos sobre a ovalbumina têm mostrado que a sua molécula pode ser representada como tendo três tipos de grupos tituláveis, carboxílicos, imidazol e amino, contendo 46-51, 5-7 e 19-22 grupos respectivamente^(20,62).

Cannan e outros⁽²⁰⁾ ao estudarem potenciometricamente a ovalbumina, obtiveram os valores de pK para cada tipo de seus grupos tituláveis, sendo esses valores de 4,3 para os grupos carboxílicos, 6,7 para os grupos imidazol e 10,1 para os grupos amino. Esses valores de pK nos asseguram, em princípio, a possibilidade de aplicação de nosso método na titulação de ovalbumina, uma vez que uma diferença de valores de pK de 0,5 unidade, teóricamente já seria adequado aos nossos propósitos.

V.2 - MÉTODO DE CÁLCULO

O método de cálculo utilizado no nosso trabalho, em que se usa funções de Gran modificadas nas titulações de proteínas, se baseia, como já mencionamos, no método de cálculo desenvolvido por Q. Fernando⁽¹⁷⁾.

De início, devemos considerar que em uma solução de proteína, estabelecem-se equilíbrios devido à ionização de seus grupos ácidos e básicos, e em razão de suas diferentes natureza, esses grupos poderão estar parcial ou totalmente dissociados. Assim, para realizarmos uma titulação que determine os diversos tipos de grupos tituláveis da proteína, temos que levar em conta o pH inicial da solução. Um meio adequado de solucionarmos o problema é adicionar ácido forte em excesso, por exemplo, HCl. Dessa maneira, todos os grupos estarão na forma ácida, e então a titulação poderá ser feita com base forte.

O número de funções de Gran modificadas que serão utilizadas nos cálculos, dependerá da quantidade ~~de~~ **dos vários** tipos de grupos tituláveis presentes. No caso da ovalbumina, deveríamos esperar utilizar quantro funções de Gran modificadas, na titulação em presença de HCl em excesso. No entanto, conforme será melhor discutido oportunamente, foi necessário o uso de cinco funções, em razão de termos verificado a presença de dois tipos de grupos carboxílicos.

Por simplicidade, admitimos que a solução de ovalbumina a ser titulada era constituída de uma mistura de ácidos, onde o HCl era o ácido forte e as espécies de grupos tiituláveis da ovalbumina, os dois tipos de grupos carboxílicos, os grupos imidazol e os grupos amino, eram os ácidos fracos, com cada espécie apresentando um simples valor de pK.

Ainda por simplicidade, representaremos os dois tipos de grupos carboxílicos por HA_1 e HA_2 . Os grupos imidazol

por B_1H^+ e os grupos amino por B_2H^+ . O volume total de base forte (NaOH por exemplo), adicionado para a neutralização de cada um dos componentes, HCl, HA_1 , HA_2 , B_1H^+ e B_2H^+ , chamaremos respectivamente de V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , V_{B_1H} e V_{B_2H} . Portanto, os volumes de solução padrão de NaOH necessários para neutralizar cada um desses componentes ácidos, serão dados respectivamente por V_{HCl} , $(V_{HA_1} - V_{HCl})$, $(V_{HA_2} - V_{HA_1})$, $(V_{B_1H} - V_{HA_2})$ e $(V_{B_2H} - V_{B_1H})$.

As concentrações analíticas, (em moles/l) de cada componente ácido, C_{HCl} , C_{HA_1} , C_{HA_2} , C_{B_1H} e C_{B_2H} serão dadas pelas seguintes equações de balanceamento de massa :

$$C_{HCl} = \frac{V_{HCl} C_B}{(V_o + V)} = |Cl^-| \quad (41)$$

$$C_{HA_1} = \frac{(V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B}{(V_o + V)} = |HA_1| + |A_1^-| \quad (42)$$

$$C_{HA_2} = \frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B}{(V_o + V)} = |HA_2| + |A_2^-| \quad (43)$$

$$C_{B_1H} = \frac{(V_{B_1H} - V_{HA_2}) C_B}{(V_o + V)} = |B_1H^+| + |B_1| \quad (44)$$

$$C_{B_2H} = \frac{(V_{B_2H} - V_{B_1H}) C_B}{(V_o + V)} = |B_2H^+| + |B_2| \quad (45)$$

Como os grupos imidazol e amino estão representados por B_1H^+ e B_2H^+ e apresentam cargas, vamos admitir que essas cargas são neutralizadas pelas cargas dos íons X^- e Y^- , respectivamente. Assim, podemos escrever:

$$C_{B_1H} = |X^-| \quad (46)$$

e

$$C_{B_2H} = |Y^-| \quad (47)$$

Os termos nos colchetes representam concentrações molares, C_B representa a concentração molar de NaOH e V o volume de NaOH adicionado. O volume inicial da solução é V_0 e a concentração de íons sódio na solução é dada por:

$$|Na^+| = \frac{V C_B}{(V_0 + V)} \quad (48)$$

O volume de NaOH necessário para neutralizar o ácido forte em excesso (HCl) é V_{HCl} , e pode ser determinado experimentalmente. Nesse caso, a condição de eletroneutralidade é expressa por:

$$|Na^+| + |H^+| + |B_1H^+| + |B_2H^+| = |A_1^-| + |A_2^-| + |OH^-| + |Cl^-| + |X^-| + |Y^-| \quad (49)$$

Substituindo-se as equações de balanceamento de massa 41 a 48 na equação 49, introduzindo-se expressões de K_a para os diversos tipos de grupos ácidos presentes, e rearranjando-se os termos, chega-se à:

$$\begin{aligned} V_{HCl} C_B - V C_B &= (|H^+| - |OH^-|)(V_0 + V) - (V_{HA_1} - V_{HCl}) \\ C_B A_1 - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B A_2 - (V_{B_1H} - V_{HA_2}) C_B A_3 - \\ - (V_{B_2H} - V_{B_1H}) C_B A_4 & \quad (50) \end{aligned}$$

ou seja:

$$V_{HCl} C_B - V C_B = F_{HCl} \quad (51)$$

onde:

$$A_1 = \frac{K_{HA_1}}{(K_{HA_1} + [H^+])} \quad (52)$$

$$A_2 = \frac{K_{HA_2}}{(K_{HA_2} + [H^+])} \quad (53)$$

$$A_3 = \frac{K_{B_1H}}{(K_{B_1H} + [H^+])} \quad (54)$$

$$A_4 = \frac{K_{B_2H}}{(K_{B_2H} + [H^+])} \quad (55)$$

Os termos onde aparece o símbolo K representam as constantes de dissociação das espécies em questão. A função F_{HCl} é uma função de Gran modificada e um gráfico de F_{HCl} vs. V dá uma reta, cujo coeficiente angular é $-C_B$, e o ponto de interseção dessa reta com a abcissa é $(V_{HCl}, 0)$, permitindo-nos determinar o volume de NaOH necessário para neutralizar o HCl presente em excesso.

O volume de NaOH necessário para neutralizar o primeiro tipo de grupos carboxílicos, HA_1 , é $(V_{HA_1} - V_{HCl})$ e é determinado experimentalmente usando-se a função de Gran modificada F_{HA_1} , que é obtida de modo semelhante à anterior, substituindo-se as equações 41 a 48 na equação 49, introduzindo-se as necessárias expressões de Ka e rearranjando-se adequadamente os termos. Assim, chega-se à equação:

$$\begin{aligned} V_{HA_1} K_{HA_1} - V K_{HA_1} &= ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)(K_{HA_1} + [H^+]) / C_B + \\ &+ (V - V_{HCl}) [H^+] - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) A_2 (K_{HA_1} + [H^+]) - \end{aligned}$$

$$- (V_{B_1H} - V_{HA_2}) A_3 (K_{HA_1} + |H^+|) - (V_{B_2H} - V_{B_1H}) A_4 (K_{HA_1} + |H^+|) \quad (56)$$

ou

$$V_{HA_1} K_{HA_1} - V K_{HA_1} = F_{HA_1} \quad (57)$$

O gráfico de F_{HA_1} em função de V dá uma linha reta, de coeficiente angular igual a $-K_{HA_1}$, e o ponto de interseção com o eixo x é igual a $(V_{HA_1}, 0)$.

O volume de NaOH necessário para neutralizar o ácido fraco HA_2 , com uma constante de dissociação K_{HA_2} , pode ser determinado a partir da extrapolação da reta obtida, ao se fazer o gráfico da função de Gran modificada F_{HA_2} em função de V e K_{HA_2} é determinado através do coeficiente angular dessa **reta**. Para a obtenção de F_{HA_2} , desprezando-se a hidrólise de A_1^- , a equação 42 se torna:

$$C_{HA_1} = |A_1^-| = (V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B / (V_0 + V) \quad (58)$$

Assim, substituindo-se as equações 41 a 48 na equação 49, introduzindo-se as expressões de K_a , levando-se em conta a equação 58 e rearranjando-se os termos, chega-se a:

$$\begin{aligned} V_{HA_2} K_{HA_2} - V K_{HA_2} &= (|H^+| - |OH^-|)(V_0 + V)(K_{HA_2} + |H^+|) / C_B + \\ &+ (V - V_{HA_1})|H^+| - (V_{B_1H} - V_{HA_2}) A_3 (K_{HA_2} + |H^+|) - \\ &- (V_{B_2H} - V_{B_1H}) A_4 (K_{HA_2} + |H^+|) \end{aligned} \quad (59)$$

ou seja:

$$V_{HA_2} K_{HA_2} - V K_{HA_2} = F_{HA_2} \quad (60)$$

O volume de NaOH necessário para neutralizar o ácido fraco B_1H , com constante de dissociação K_{B_1H} , pode ser determinado como nos casos anteriores, a partir da extrapolação da reta obtida ao se fazer o gráfico da função de Gran modificada F_{B_1H} vs V , e cujo coeficiente angular nos permi
ti
ra obter o valor de K_{B_1H} . Para a obtenção de F_{B_1H} , procedendo
do-se da mesma maneira que na obtenção das funções anteriores, chega-se à:

$$V_{B_1H} K_{B_1H} - V K_{B_1H} = (|H^+| - |OH^-|)(V_0 + V)(K_{B_1H} + |H^+|) / C_B + \\ + (V - V_{HA_2})|H^+| - (V_{B_2H} - V_{B_1H}) A_4 (K_{B_1H} + |H^+|) \quad (61)$$

isto é:

$$V_{B_1H} K_{B_1H} - V K_{B_1H} = F_{B_2H} \quad (62)$$

Finalmente, poderemos obter a função F_{B_2H} , que nos permitirá determinar V_{B_2H} e K_{B_2H} , através da reta obtida ao se fazer o gráfico F_{B_2H} vs. V , como nos casos anteriores. O procedimento para a obtenção de F_{B_2H} também é feito de manei
ra análoga aos procedimentos anteriores, chegando-se às equações:

$$V_{B_2H} K_{B_2H} - V K_{B_2H} = (|H^+| - |OH^-|)(V_0 + V)(K_{B_2H} + |H^+|) / C_B +$$

$$+ (V - V_{B_1H}) |H^+| \quad (63)$$

ou:

$$V_{B_2H} K_{B_2H} - V K_{B_2H} = F_{B_2H} \quad (64)$$

Os cálculos das funções de Gran podem ser feitos em dois estágios, no primeiro as funções são calculadas aproximadamente e no segundo os cálculos são refinados.

Os dados experimentais necessários aos cálculos, consistem de uma série de valores medidos de pH e os valores correspondentes de V, o volume de NaOH adicionado. A concentração de íons hidrogênio pode ser calculada diretamente dos valores de pH medidos. Os dois ou três primeiros valores de $|H^+|$ e V são suficientes para se obter uma reta aproximada da pela equação 51, onde os valores de F_{HCl} são calculados usando-se apenas o primeiro termo do lado direito da equação 50. A interseção dessa reta com o eixo x, permite obter um primeiro valor aproximado de V_{HCl} . Os primeiros dois ou três valores de $V > V_{HCl}$, são usados a seguir para a obtenção da reta aproximada dada pela equação 57. Os primeiro e segundo termos do lado direito da equação 56 são suficientes para calcular os valores aproximados de F_{HA_1} . O valor de K_{HA_1} nesses termos pode ser desprezado, desde que $K_{HA_1} < H$ nesta região da curva de titulação, ou uma estimativa razoável de K_{HA_1} pode ser usada. Os valores aproximados de F_{HA_1} e V são empregados para se obter uma reta que intercepta o eixo x no ponto $(V_{HA_1}, 0)$. O coeficiente angular dessa reta permite obter um valor aproximado de K_{HA_1} . Valores de $V > V_{HA_1}$ serão usados para se obter

a reta descrita pela equação 60 e valores aproximados de F_{HA_2} serão calculados como anteriormente, usando-se os primeiros dois termos do lado direito da equação 59. Com esses valores aproximados de F_{HA_2} , a reta obtida ao se fazer o gráfico de F_{HA_2} em função de V interceptará o eixo x no ponto $(V_{HA_2}, 0)$, e seu coeficiente angular permitirá obter um valor aproximado de K_{HA_2} . Os próximos dois ou três valores de $V > V_{HA_2}$, permitirão, pelo mesmo procedimento seguido nos casos anteriores, obter uma reta aproximada dada pela equação 62, onde valores aproximados de V_{B_1H} e K_{B_1H} serão obtidos. Assim também a reta aproximada descrita pela equação 64 poderá ser obtida, usando-se valores de $V > V_{B_1H}$, permitindo determinar valores aproximados de V_{B_2H} e K_{B_2H} .

Deste modo, a curva de titulação é aproximadamente dividida em cinco segmentos, a partir dos quais valores aproximados de V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , V_{B_1H} , V_{B_2H} , K_{HA_1} , K_{HA_2} , K_{B_1H} e K_{B_2H} são obtidos e serão usados para refinar as funções de Gran modificadas F_{HCl} , F_{HA_1} , F_{HA_2} , F_{B_1H} e F_{B_2H} , do modo descrito a seguir.

Na região da curva de titulação $0 < V < V_{HCl}$ calcula-se a função F_{HCl} pela equação 50. A contribuição dos cinco termos do lado direito da equação 50 pode ser estimada, e se necessário, um valor mais exato de F_{HCl} pode ser calculado para cada valor de V . A reta do gráfico de F_{HCl} vs. V fornecerá um valor mais exato de V_{HCl} , que pode ser usado na equação 56.

Para valores de V na região $V_{HCl} < V < V_{HA_1}$, a função F_{HA_1} será calculada empregando-se o novo valor de V_{HCl} , atra

vés da equação 56, e naturalmente incluindo-se os valores dos demais termos calculados aproximadamente no primeiro estágio. A reta do gráfico de F_{HA_1} em função de V nessa região, dará valores mais exatos de V_{HA_1} e K_{HA_1} , que serão usados para posteriores refinamentos de F_{HA_1} e F_{HA_2} (equações 57 e 59).

Na região $V_{HA_1} < V < V_{HA_2}$, a função F_{HA_2} poderá ser calculada pela equação 59, usando os novos valores de V_{HCl} , V_{HA_1} e K_{HA_1} , além dos valores de outros termos calculados aproximadamente no primeiro estágio e necessários aos presentes cálculos. A reta de F_{HA_2} em função de V permitirá obter valores mais exatos de V_{HA_2} e F_{HA_2} , que serão utilizados nos refinamentos de F_{HA_2} e F_{B_1H} , através das equações 60 e 61.

Da mesma maneira que nos casos anteriores, na região $V_{HA_2} < V < V_{B_1H}$, poderemos refinar a função F_{B_1H} pelo uso da equação 61, e obter valores mais exatos de V_{B_1H} e K_{B_1H} .

E na região $V_{B_1H} < V < V_{B_2H}$ a função F_{B_2H} será refinada através da equação 63, obtendo-se valores mais exatos de V_{B_2H} e K_{B_2H} .

Com os valores mais exatos de V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , V_{B_1H} , V_{B_2H} , K_{HA_1} , K_{HA_2} , K_{B_1H} e K_{B_2H} , poderemos repetir esse processo de refinamento, e realizar quantas interações forem necessárias, até se atingir um limite imposto para a variação dos valores calculados, entre um e outro cálculo.

Baseados nesse procedimento de cálculo, para resolver o sistema de equações envolvido, escrevemos um programa em linguagem BASIC, que denominamos de PROTE, para o computador digital PDE-10, do centro de computação da Unicamp, cuja

representação esquemática encontra-se na figura 16.

Nesse programa, os dados conhecidos necessários para se processar os cálculos são V_0 , C_B , $V(N)$, $pH(N)$, onde N representa o número de dados. O programa envolve o uso do método dos quadrados mínimos, para a obtenção da melhor reta correspondente à cada função de Gran modificada envolvida. Os cálculos processados por este programa fornecerão os valores refinados de F_{HCl} , F_{HA_1} , F_{HA_2} , F_{B_1H} , F_{B_2H} , V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , V_{B_1H} , V_{B_2H} , K_{HA_1} , K_{HA_2} , K_{B_1H} e K_{B_2H} . A listagem desse programa encontra-se no apêndice II.

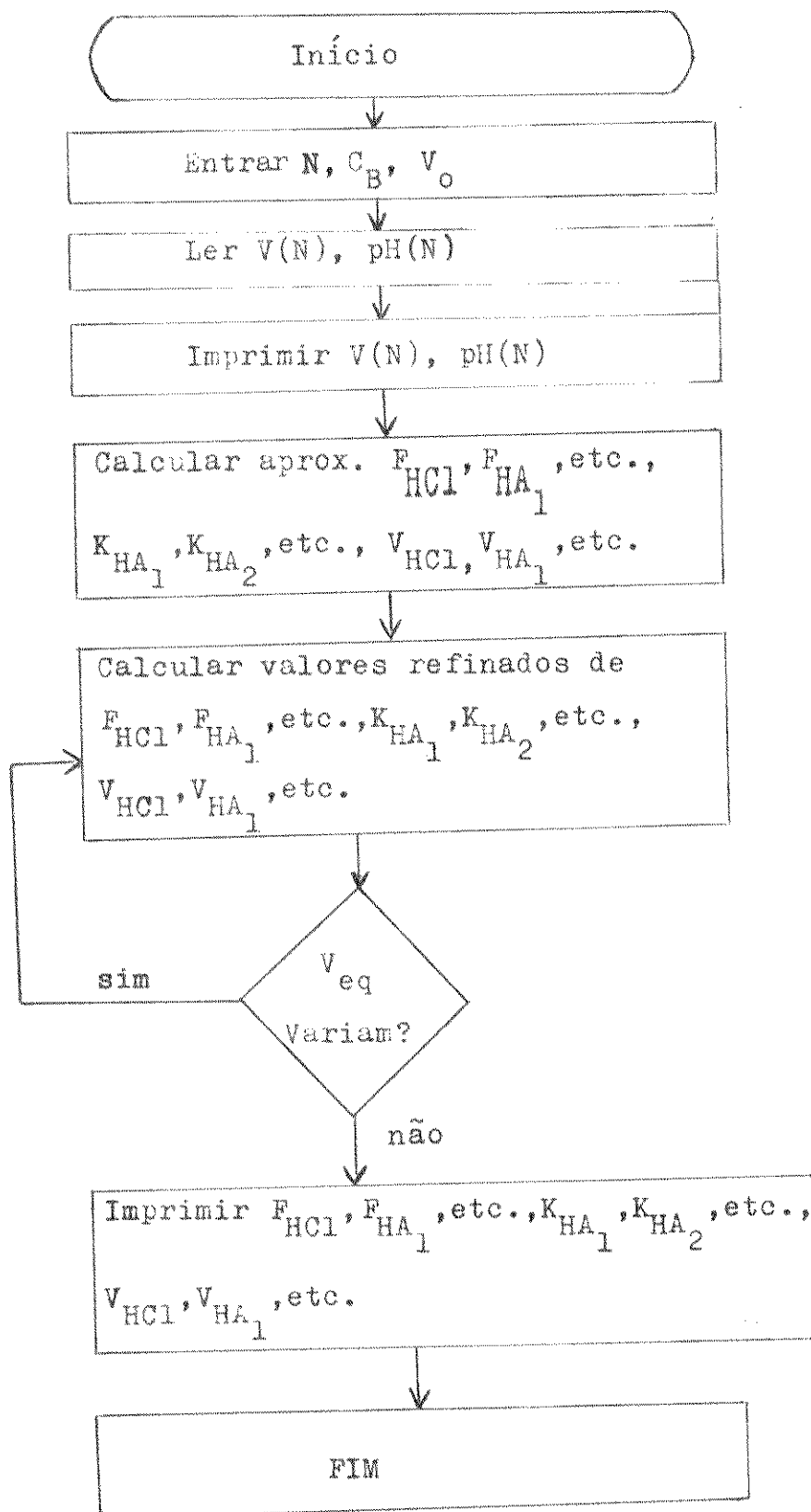
V.3. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE OVALBUMINA COM NaOH

Como as titulações potenciométricas de ovalbumina foram realizadas através de medidas de pH, os eletrodos usados foram um eletrodo indicador de íons H^+ e um eletrodo de referência. Um eletrodo de vidro e um eletrodo de calomelano saturado foram então empregados para esse fim.

O uso do eletrodo de vidro em soluções de proteínas requer certos cuidados, uma vez que as proteínas podem interferir com o funcionamento do mesmo, pois podem penetrar na membrana de vidro. Kenchington⁽⁶³⁾ sugere estocar o eletrodo de vidro em HCl 0,1 M, que mostrou ser eficiente em limpar a membrana. No caso da ovalbumina, que é uma proteína solúvel em água, tais interferências são menos drásticas. Não verificamos qualquer problema nesse sentido com o eletrodo de vidro methron EA 109 que utilizamos em nosso estudo, mesmo estocando-o em água destilada, conforme recomenda o fabricante.

Quanto ao eletrodo de calomelano saturado, que é o eletrodo de referência normalmente usado em titulações de proteínas, um dos tipos recomendado é o "sleeve type"⁽⁶⁴⁾,

Figura 16. Representação esquemática do programa PROTE, referente às equações 50 a 64.



que permite que o KCl fluxe livremente para a solução, apresentando menos problemas no que se refere à obstrução do fluxo devido à presença de proteína, e também no que se refere a alguma eventual contaminação mais séria, o mesmo é fácil de ser limpo. Entretanto, Nozaki e Tanford⁽²²⁾ recomendam o uso de um eletrodo de calomelano saturado, onde o contato com a solução é feito através de um capilar com ponta em forma de U. Eletrodos de calomelano que fazem a junção líquida entre o KCl e a solução, através de pavios ou placas porosas, não são em geral recomendados para esses propósitos, pois podem ficar obstruídos mais facilmente pela proteína, e apresentarem distúrbios durante as medidas. Em nosso estudo, usamos o eletrodo compacto de calomelano saturado Methron EA 404, que faz a junção líquida através de um diafragma de amianto, e o mesmo não apresentou problemas durante as medidas. Testamos ainda o uso de um eletrodo de vidro combinado Methron modelo EA 121, que também não apresentou nenhum inconveniente durante o seu emprego.

Usualmente nas medidas de pH em titulações de proteínas, uma precisão de $\pm 0,01$ ou $\pm 0,02$ unidades é adequada⁽⁶⁵⁾. Um pH-metro digital é preferido, pois em geral são aparelhos estáveis e permitem leituras mais rápidas, o que é desejável em titulações de proteínas. Em nosso estudo, utilizamos um pH-metro digital Orion modelo 701, que permite leituras rápidas de pH, com precisão de $\pm 0,01$ unidade.

Antes de realizarmos qualquer titulação, a calibração dos eletrodos era feita utilizando-se tampão Beckman pH 7,41, tampão biftalato pH 4,01 e tampão borato pH 9,18. Após cada ~~titulação~~ titulação a calibração era verificada, não observando-se desvios nos valores de pH dos tampões maiores que $\pm 0,01$ unidade de pH.

A força iônica utilizada em todas as titulações foi de 0,1 M, mantida constante mediante o emprego de KCl, tal como feito anteriormente na titulação de azoteto de sódio.

Nós assumimos que os coeficientes de atividade de íons H^+ e OH^- usados em nossos cálculos, não são afetados pela presença da proteína, e que a mesma não contribui significativamente para a força iônica da solução. Também consideramos desprezível o potencial de junção líquida, na região da curva de titulação onde foram feitas as medidas, entre pH 2 e 11. Essas suposições, evidentemente, podem ser limitações impostas ao método utilizado.

As soluções padrão de hidróxido de sódio empregadas, foram preparadas isentas de CO_2 ⁽⁶⁶⁾, estocadas em frascos de polietileno e manuseadas adequadamente, sem contato com a atmosfera. A concentração dessas soluções era ao redor de 0,1 N, e as soluções de proteínas utilizadas foram preparadas com concentrações ao redor de 0,5% e 1,0%.

As titulações foram feitas adicionando-se um volume conhecido da solução de proteína ao vaso de titulação, e em seguida um volume conhecido de solução padrão de HCl, de tal modo a se obter uma quantidade adequada de ácido em excesso. A soma desses dois volumes constituía o volume inicial da titulação, V_0 . A seguir, de uma microbureta eram adicionados os volumes adequados de solução de hidróxido de sódio, e o pH medido à cada adição. A temperatura foi mantida à 25°C, e um fluxo de nitrogênio, isento de CO_2 , foi mantido durante a titulação, logo acima da superfície da solução de proteína. O vaso de titulação permaneceu fechado, ficando em contato com a atmosfera apenas pelo orifício destinado ao escape de N_2 . O nitrogênio não foi borbulhado diretamente na solução, para evitar a ocorrência de denaturação superficial da ovalbumina. Para cobrir toda a curva de titulação, entre pH 2 e 11, realizamos para cada titulação cerca de 50-70 medidas de V e pH.

As soluções de proteínas foram preparadas a partir

de produtos comerciais. Foram então usadas a ovalbumina grau V da Sigma e Co., e a ovalbumina A-388, da Fisher Scientific Company. A ovalbumina grau V da Sigma apresenta elevado grau de pureza e é isenta de sais. Nós a utilizamos como padrão, para determinar a concentração das soluções preparadas a par tir da ovalbumina da Fischer.

Empregamos o método do biureto, conforme o procedimento descrito por Rabat e Mayer⁽⁶⁷⁾, para a determinação da concentração de soluções de ovalbumina, preparadas com a ovalbumina da Fisher, usando-se a ovalbumina grau V da Sigma como padrão. Na figura 17, temos a curva de calibração utilizada para esse fim, de absorbância vs. concentração, obtida a par tir de diversas soluções padrões de proteína, através do uso deste método. As leituras de absorbância foram feitas em 555 nm.

Durante nossas medidas experimentais, não observamos indícios de alguma denaturação com as soluções de ovalbumina da Sigma. Quanto à ovalbumina da Fischer, ao preparar as suas soluções, havia sempre uma fração insolúvel presente, que fil trávamos. Essa fração pode ser devido à impurezas presentes, tal como metaproteínas, ou devido à alguma denaturação.

Nas tabelas 17, 18 e 19 estão os dados experimentais de três titulações feitas, bem como as concentrações dos rea gentes utilizados. Cada titulação foi feita em duplicata, e os valores de pH concordaram dentro de $\pm 0,01$ unidade. Se es sa concordância não era obtida, a titulação era repetida uma terceira vez. Apenas na região de pH de 7,5 - 9,5 a concordân cia obtida foi menor que $\pm 0,01$ pH, devido ao fato dessa re gião corresponder a um ponto de inflexão da curva de titula ção, e ser não tamponada.

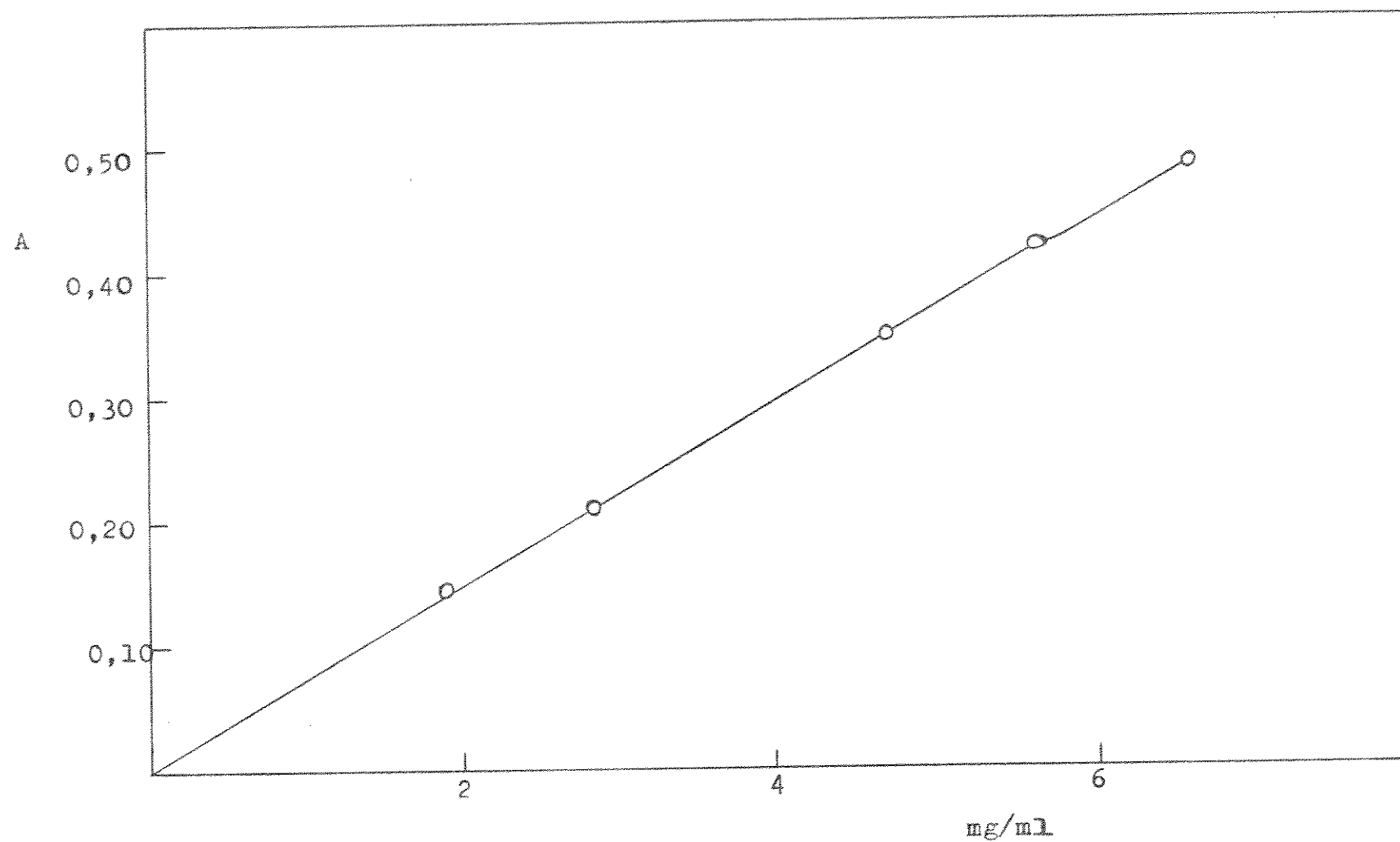


Figura 17. Curva de calibração de ovalbumina - método do biureto.
Absorbância em função de concentração (mg proteína/ml)
 $\lambda = 555 \text{ nm}$

Tabela 17. Titulação potenciométrica de ovalbumina com NaOH. Dados experimentais.

$V_0 = 45,00 \text{ ml}$
 concentração de proteína = 0,5243 g/100 ml

$C_B = 0,1050 \text{ M}$

$I = 0,1 \text{ M}$

V/ml	pH	V/ml	pH	V/ml	pH	V/ml	pH
0,00	2,31	2,50	3,17	4,48	5,95	5,40	10,45
0,20	2,35	2,60	3,23	4,50	6,05	5,50	10,57
0,30	2,37	2,70	3,31	4,54	6,21	5,60	10,66
0,40	2,39	2,80	3,39	4,58	6,40	5,70	10,76
0,50	2,41	2,90	3,47	4,62	6,65	5,80	10,82
0,60	2,43	3,00	3,56	4,66	6,92	5,90	10,89
0,70	2,45	3,10	3,67	4,70	7,24	6,00	10,95
0,80	2,47	3,20	3,77	4,74	7,87	6,10	11,00
1,00	2,53	3,30	3,88	4,78	8,40	6,20	11,05
1,20	2,58	3,40	3,98	4,80	8,54	6,30	11,09
1,40	2,64	3,50	4,10	4,84	8,92	6,40	11,13
1,60	2,71	3,60	4,23	4,88	9,18	6,50	11,17
1,70	2,75	3,70	4,35	4,90	9,28	6,60	11,21
1,80	2,79	3,80	4,48	4,94	9,46	6,70	11,24
1,90	2,84	3,90	4,62	5,00	9,67	6,80	11,27
2,00	2,88	4,00	4,81	5,04	9,80	6,90	11,30
2,10	2,93	4,10	4,96	5,10	9,96	7,00	11,33
2,20	2,98	4,20	5,15	5,14	10,04	7,10	11,35
2,30	3,04	4,30	5,39	5,20	10,16	7,52	11,45
2,40	3,09	4,40	5,66	5,30	10,31		

Tabela 18. Titulação potenciométrica de ovalbumina
com NaOH. Dados experimentais.

$V_o = 30,00 \text{ ml}$		$C_B = 0,1083 \text{ M}$		$I = 0,1 \text{ M}$			
Concentração de proteína = 0,7881 g/100 ml							
V/ml	pH	V/ml	pH	V/ml	pH	V/ml	pH
0,00	2,16	2,80	3,41	4,42	6,21	4,94	9,96
0,20	2,21	2,90	3,51	4,46	6,39	4,98	10,07
0,30	2,22	3,00	3,62	4,50	6,60	5,02	10,16
0,40	2,24	3,10	3,74	4,52	6,75	5,06	10,24
0,50	2,26	3,20	3,85	4,56	7,03	5,10	10,31
0,70	2,32	3,30	3,97	4,58	7,18	5,16	10,41
0,90	2,36	3,40	4,09	4,60	7,41	5,20	10,47
1,02	2,40	3,50	4,22	4,62	7,66	5,30	10,61
1,20	2,46	3,60	4,36	4,64	7,91	5,40	10,72
1,40	2,52	3,70	4,49	4,66	8,15	5,50	10,81
1,60	2,61	3,80	4,64	4,68	8,49	5,60	10,90
1,80	2,69	3,90	4,81	4,70	8,73	5,70	10,97
2,00	2,80	3,94	4,87	4,72	8,92	5,80	11,03
2,10	2,85	4,00	4,99	4,74	9,10	5,90	11,09
2,20	2,92	4,10	5,19	4,76	9,24	6,00	11,14
2,30	2,98	4,14	5,28	4,78	9,35	6,20	11,23
2,40	3,05	4,24	5,55	4,80	9,46	6,40	11,31
2,50	3,14	4,30	5,72	4,84	9,63	6,60	11,37
2,60	3,22	4,34	5,87	4,88	9,78	6,80	11,43
2,70	3,31	4,38	6,04	4,92	9,90	7,00	11,48

Tabela 19. Titulação potenciométrica de ovalbumina
com NaOH. Dados experimentais.

$V_0 = 29,00 \text{ ml}$

$C_B = 0,1080 \text{ M}$

$I = 0,1 \text{ M}$

Concentração de proteína = $0,8277 \text{ g/100 ml}$

V/ml	pH	V/ml	pH	V/ml	pH
0,30	2,35	3,50	5,00	4,50	10,64
0,50	2,41	3,55	5,13	4,60	10,72
0,75	2,49	3,60	5,27	4,70	10,87
1,00	2,59	3,67	5,54	4,80	10,95
1,25	2,71	3,70	5,68	4,90	11,03
1,40	2,79	3,75	5,93	5,00	11,10
1,50	2,84	3,80	6,25	5,10	11,14
1,75	3,02	3,85	6,66	5,20	11,19
1,85	3,09	3,90	7,24	5,40	11,28
1,90	3,12	3,95	8,10	5,60	11,35
2,00	3,20	4,00	8,91	5,80	11,41
2,20	3,38	4,05	9,28	6,00	11,47
2,30	3,46	4,10	9,59	6,50	11,57
2,50	3,65	4,15	9,83	7,00	11,66
2,60	3,75	4,20	10,02	8,00	11,80
2,70	3,85	4,25	10,17		
2,80	3,94	4,30	10,29		
3,00	4,18	4,35	10,40		
3,20	4,49	4,41	10,52		
3,40	4,78	4,45	10,58		

V.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 20, 21 e 22 estão os resultados dos cálculos, relativos aos dados das tabelas 17, 18 e 19, respectivamente, obtivos através do uso do programa PROTE, que nos forneceu os valores F_{HCl} , F_{HA_1} , F_{HA_2} , F_{B_1H} , F_{B_2H} , V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , V_{B_1H} , V_{B_2H} , K_{HA_1} , K_{HA_2} , K_{B_1H} e K_{B_2H} . Conforme já discutimos anteriormente, esses valores são refinados pelo programa através de um cálculo iterativo, até que um dado limite seja atingido. Nos nossos cálculos, os valores foram refinados até que os volumes de equivalência apresentassem uma concordância dentro de 0,0002 ml, entre uma e outra interação.

Na figura 18 apresentamos um gráfico onde podemos observar a segmentação e a linearização da curva de titulação. A curva de titulação representada nessa figura, foi feita colocando-se o pH em função do volume de NaOH, a partir dos dados da tabela 17. As cinco retas correspondentes aos segmentos nos quais a curva de titulação foi dividida, foram traçadas a partir dos dados da tabela 20, e são obtidas ao se colocar no gráfico as funções de Gran calculadas, em função do volume de titulante adicionado. Designamos essas retas por AB, CD, EF, GH e IJ. A reta AB corresponde à reta de F_{HCl} vs. V, dada pela equação 51, e intercepta o eixo x no ponto $(V_{HCl}, 0)$, onde V_{HCl} corresponde à 2,46 ml. A reta CD corresponde à reta dada pela equação 57, e é obtida ao se colocar no gráfico F_{HA_1} em função de V. Essa reta intercepta o eixo x no ponto $(V_{HA_1}, 0)$, onde $V_{HA_1} = 3,80$ ml, e o valor $(V_{HA_1} - V_{HCl}) = 1,34$ ml de NaOH. O coeficiente angular da reta CD nos dá o valor de K_{HA_1} , igual a $3,39 \cdot 10^{-4}$, que corresponde

Tabela 20. Titulação potenciométrica de ovalbumina com NaOH. Valores de F Gran modificadas, Ka e Veq, relativos aos dados da tabela 17.

V/ml	F _{HCl}	V/ml	F _{HA1} ·10 ⁴	V/ml	F _{HA₂} ·10 ⁶
0,20	0,2348	2,60	4,268	4,00	3,985
0,30	0,2240	2,70	3,806	4,10	4,104
0,40	0,2136	2,80	3,417	4,20	3,476
0,50	0,2037	2,90	3,075	4,30	2,470
0,60	0,1941	3,00	2,687	4,40	1,566
0,70	0,1849	3,10	2,214	4,48	0,872
0,80	0,1761	3,20	1,868	4,50	0,691
1,00	0,1512	3,30	1,516	4,54	0,463
1,20	0,1327	3,40	1,246	4,58	0,245
1,40	0,1125	3,50	0,933	4,62	0,010
1,60	0,0915	3,60	0,629		
1,70	0,0806	3,70	0,380	V _{HA₂}	= 4,61 ml
1,80	0,0704	3,80	0,124	K _{HA₂}	= 7,38·10 ⁻⁶
1,90	0,0585	3,90	-0,143		
2,00	0,0496			(V _{HA₂} - V _{HA₁})	= 0,81 ml
2,10	0,0391	V _{HA₁}	= 3,80 ml		
2,20	0,0293	K _{HA₁}	= 3,39·10 ⁻⁴		
2,30	0,0181				
2,40	0,0097	(V _{HA₁} - V _{HCl})	= 1,34 ml		
	V _{HCl}	= 2,46 ml			

(continua)

Tabela 20. Continuação.

V/ml	$F_{B_1H} \cdot 10^9$	V/ml	$F_{B_2H} \cdot 10^{11}$
4,66	6,525	4,94	5,249
4,70	5,821	5,00	4,318
4,74	1,768	5,04	3,598
4,78	0,037	5,10	2,763
4,80	-0,369	5,14	2,407
4,84	-1,941	5,20	1,774
		5,30	1,011
$V_{B_1H} = 4,79 \text{ ml}$		5,40	0,143
$K_{B_1H} = 5,09 \cdot 10^{-8}$		5,50	-0,704
		5,60	-1,391
		5,70	-2,341
$(V_{B_1H} - V_{HA_2}) = 0,18 \text{ ml}$		$V_{B_2H} = 5,43 \text{ ml}$	
		$K_{B_2H} = 9,44 \cdot 10^{-11}$	
		$(V_{B_2H} - V_{B_1H}) = 0,64 \text{ ml}$	

Tabela 21. Titulação potenciométrica de ovalbumina com NaOH. Valores de F Gran modificadas, Ka e V_{eq}, relativos aos dados da tabela 18.

V/ml	F _{HCl}	V/ml	FHA ₁ .10 ⁴	V/ml	F _{HA₂} .10 ⁶
0,20	0,2160	2,50	5,198	3,94	5,877
0,30	0,2115	2,60	4,704	4,00	5,173
0,40	0,2019	2,70	4,136	4,10	4,012
0,50	0,1927	2,80	3,534	4,14	3,499
0,70	0,1666	2,90	3,013	4,24	2,173
0,90	0,1511	3,00	2,480	4,30	1,561
1,02	0,1364	3,10	1,954	4,34	1,115
1,20	0,1163	3,20	1,550	4,38	0,713
1,40	0,0983	3,30	1,140	4,42	0,393
1,60	0,0743	3,40	0,780	4,46	0,105
1,80	0,0581	3,50	0,393	4,50	-0,205
2,00	0,0335	3,60	0,006	4,52	-0,428
2,10	0,0243	3,70	-0,340		
2,20	0,0123	3,80	-0,744		V _{HA₂} = 4,46 ml
2,30	0,0026				K _{HA₂} = 1,10.10 ⁻⁵
2,40	-0,0081	V _{HA₁} = 3,59 ml			(V _{HA₂} - V _{HA₁})=0,87 ml
	V _{HCl} = 2,29 ml	K _{HA₁} = 4,56.10 ⁻⁴			
		(V _{HA₁} - V _{HCl}) =2,30 ml			

(continua)

Tabela 21. Continuação.

V/ml	$F_{B_1H} \cdot 10^9$	V/ml	$F_{B_2H} \cdot 10^{11}$
4,58	9,448	4,92	2,760
4,60	6,436	4,94	2,540
4,62	4,041	4,98	2,316
4,64	2,398	5,02	1,835
4,66	1,276	5,06	1,566
4,68	-0,018	5,10	1,334
4,70	-0,932	5,16	0,967
4,72	-1,844	5,20	0,737
4,74	-3,006	5,30	0,139
4,76	-4,200	5,40	-0,372
		5,50	-0,838
$V_{B_1H} = 4,69 \text{ ml}$		$V_{B_2H} = 5,34 \text{ ml}$	
$K_{B_1H} = 6,96 \cdot 10^{-8}$		$K_{B_2H} = 6,52 \cdot 10^{-11}$	
$(V_{B_1H} - V_{HA_2}) = 0,23 \text{ ml}$		$(V_{B_2H} - V_{B_1H}) = 0,65 \text{ ml}$	

Tabela 22. Titulação potenciométrica de ovalbumina com NaOH. Valores de F Gran modificadas, Ka e V_{eq}, relativos aos dados da tabela 19.

V/ml	F _{HCl}	V/ml	F _{HA₁} .10 ⁴	V/ml	F _{HA₂} .10 ⁶
0,30	0,1461	1,90	5,055	3,55	2,372
0,50	0,1271	2,00	4,623	3,60	2,030
0,75	0,1007	2,20	3,682	3,67	1,341
1,00	0,0765	2,30	3,362	3,70	1,033
1,25	0,0493	2,50	2,529	3,75	0,620
1,40	0,0341	2,60	2,194	3,80	0,273
1,50	0,0237	2,70	1,842	3,85	-0,026
1,75	-0,0046	2,80	1,559	3,90	-0,459
		3,00	0,922	3,95	-1,220
V _{HCl} = 1,70		3,20	0,348		
		3,40	-0,227	V _{HA₂} = 3,83 ml	
		3,50	-0,570	K _{HA₂} = 8,56.10 ⁻⁶	
			V _{HA₁} = 3,29 ml	(V _{HA₂} - V _{HA₁})=0,54 ml	
			K _{HA₁} = 3,45.10 ⁻⁴		
			(V _{HA₁} - V _{HCl}) = 1,59 ml		

(continua)

Tabela 22. Continuação.

V/ml	$F_{B_1H} \cdot 10^9$	V/ml	$F_{B_2H} \cdot 10^{11}$
3,90	4,844	4,20	1,536
3,95	1,031	4,25	1,230
4,00	-0,314	4,30	1,013
4,05	-1,128	4,35	0,746
4,10	-2,338	4,41	0,480
		4,45	0,362
$V_{B_1H} = 4,01 \text{ ml}$		4,50	0,202
$K_{B_1H} = 3,30 \cdot 10^{-8}$		4,60	0,083
		4,70	-0,456
		4,80	-0,716
$(V_{B_1H} - V_{HA_2}) = 0,18 \text{ ml}$		$V_{B_2H} = 4,58 \text{ ml}$	
		$K_{B_2H} = 3,60 \cdot 10^{-11}$	
		$(V_{B_2H} - V_{B_1H}) = 0,57 \text{ ml}$	

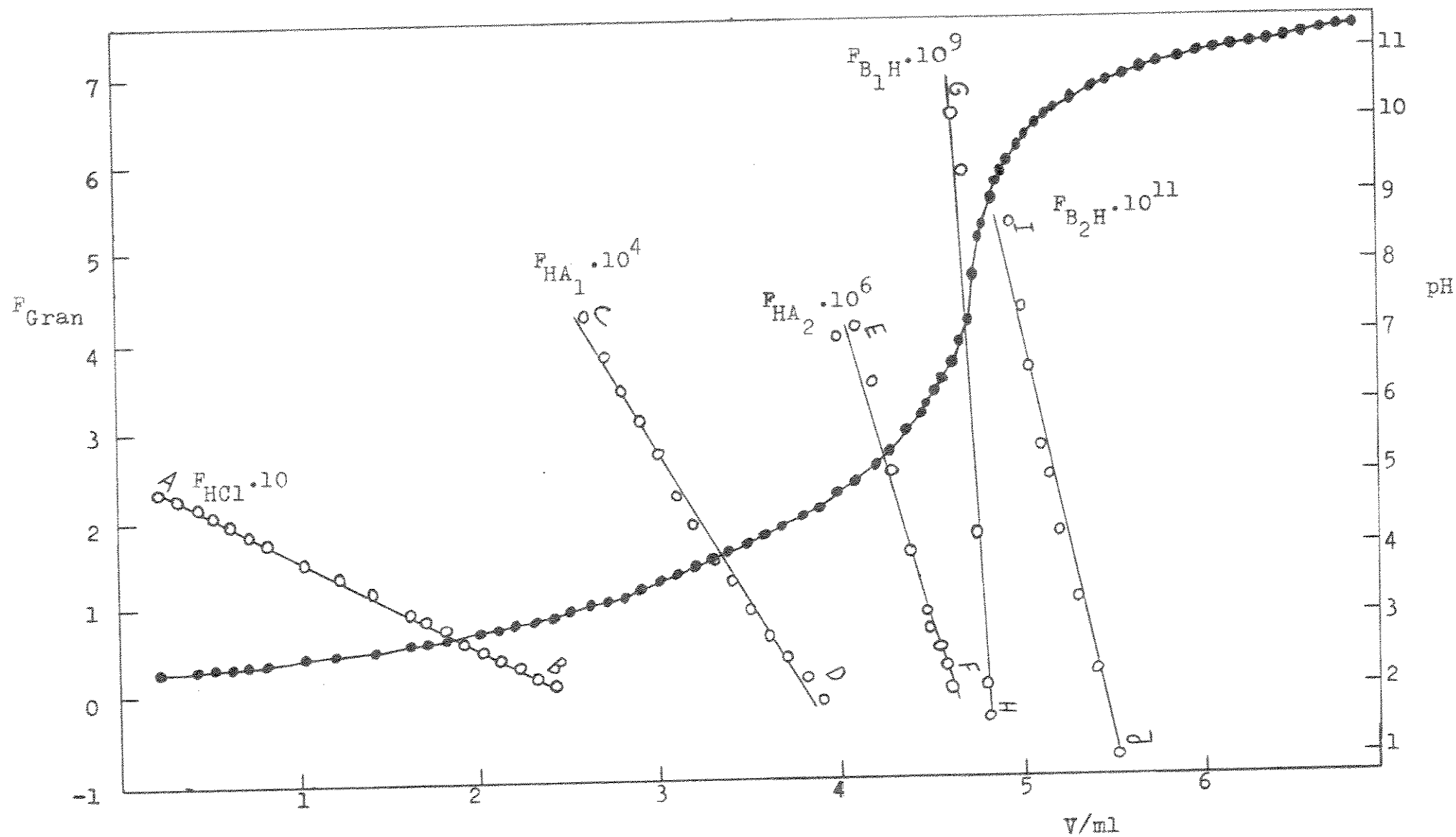


Figura 18. Titulação de ovalbumina com NaOH. Curva de titulação e funções de Gran modificadas, relativos aos dados das tabelas 17 e 20.

a um valor de pK igual a 3,47. De maneira análoga, as retas EF, GH e IJ correspondem às retas dadas respectivamente pelas equações 60, 62 e 64, permitindo-nos obter os valores de $(V_{HA_2} - V_{HA_1})$, $(V_{B_1H} - V_{HA_2})$ e $(V_{B_2H} - V_{B_1H})$, que são respectivamente de 0,81, 0,18 e 0,64 ml. As constantes K_{HA_2} , K_{B_1H} e K_{B_2H} , obtidas através dos coeficientes angulares das retas EF, GH e IJ, apresentaram respectivamente valores de $7,38 \cdot 10^{-6}$, $5,09 \cdot 10^{-8}$ e $9,44 \cdot 10^{-11}$, com respectivos valores de pK de 5,13, 7,29 e 10,03.

Como já comentamos precedentemente, esperávamos de início que a segmentação da curva de titulação de ovalbumina com hidróxido de sódio, apresentasse quatro retas, descritas por quatro funções de Gran modificadas, uma vez que na literatura há a indicação de que essa proteína apresenta três tipos de grupos tituláveis^(20,62), os grupos carboxílicos, com pK igual a 4,3, os grupos imidazol com pK igual a 6,7 e os grupos amino com pK igual a 10,1. Esses três tipos de grupos tituláveis, mais o HCl em excesso, fizeram-nos então supor que a solução de ovalbumina fosse constituída de quatro componentes ácidos, onde quatro funções de Gran modificadas seriam suficientes para descrever o sistema.

No entanto, ao realizarmos os nossos cálculos preliminares, observamos que havia um desdobramento na região dos grupos carboxílicos, indicando-nos a presença de dois tipos desses grupos, sendo necessário incluir mais uma função de Gran modificada para descrever corretamente a curva de titulação.

A indicação da presença de dois tipos de grupos carboxílicos, com valores de pK de 3,47 e 5,13, embora um tanto surpreendente, não é uma ocorrência incomum em titulações de proteínas. Dentro de cada conjunto, os pK dos grupos indivi

duais podem variar devido à efeitos eletrostáticos ou estéricos. Variações desse tipo são previstas por alguns modelos de proteínas, como por exemplo os modelos de Linderstrom - Lang⁽²³⁾, Laskowski-Sheraga⁽²⁴⁾ e Tanford-Kirkwood⁽²⁵⁾.

O mais completo estudo eletrométrico de ovalbumina existente na literatura, é o de Cannan⁽²⁰⁾, que já mencionamos na seção V.1, onde titulações dessa proteína foram realizadas e os valores de pK de seus grupos tituláveis foram determinados. Nesse estudo, Cannan determinou a curva de dissociação da ovalbumina em diversas forças iônicas, e usou o modelo de Linderstrom-Lang⁽²³⁾ para interpretar os resultados obtidos, o que permitiu calcular os já mencionados valores de pK de seus grupos tituláveis. Nesse estudo, não há nenhuma referência à uma possível existência de dois tipos de grupos carboxílicos.

As diferenças entre os resultados do nosso estudo e do estudo de Cannan, quanto os grupos carboxílicos, talvez possam ser explicadas levando-se em conta que o modelo de Linderstrom-Lang, que foi o modelo usado por esse investigador, possa apresentar limitações quanto às previsões em relação às variações de pK de grupos tituláveis, uma vez que é um modelo bastante simplificado, envolvendo aproximações^(18, 23).

A teoria de Linderstrom-Lang leva em conta que as interações entre os grupos tituláveis de uma proteína, são interações coulômbicas entre suas cargas. A suposição básica dessa teoria é de que a carga de uma molécula de proteína, é igualmente distribuída sobre a superfície de uma esfera. Também é assumido que essa esfera é impenetrável ao solvente. A equação de Linderstrom - Lang, obtida a partir dessas suposições, permite calcular o pK dos grupos tituláveis de uma proteína a partir dos dados de sua curva de dissociação. É admitido também que todos os grupos de um dado tipo

tem o mesmo pK , e que permanece constante no decorrer de toda a curva de titulação, se a força iônica permanecer constante. Como vemos, esse tratamento teórico é bem simplificado, pois não leva em conta interações não eletrostáticas e assume que todas as cargas são uniformemente distribuídas sobre a superfície da molécula de proteína. Por essa razão, esse modelo tem falhado em explicar quantitativamente resultados experimentais, semelhantes aos por nós obtidos⁽²⁶⁾.

Modelos mais refinados que o de Linderstrom-Lang tem sido empregados com mais sucesso na interpretação de curvas de titulação de proteínas, e variações de pK de alguns grupos tituláveis tem sido observado. Tanford e Roxby⁽²⁶⁾, por exemplo, realizaram um estudo desse tipo com a lisozima, onde um método computacional, baseado na teoria de Tanford e Kirkwood⁽²⁵⁾, foi empregado na interpretação da curva de titulação dessa proteína. O modelo de Tanford e Kirkwood é também um modelo eletrostático, mas mais refinado que o de Linderstrom-Lang, pois leva em conta o fato de que as cargas de uma molécula de proteína, são unidades discretas de cargas, distribuídas não uniformemente na superfície da molécula, em locais específicos. Nesse estudo, foi observado a presença de um grupo carboxílico anômalo com pK muito baixo, que tinha sido sugerido em estudos anteriores^(68,69), mas que não tinha sido detectado em anterior estudo de titulação⁽⁷⁰⁾. No estudo de Tanford e Roxby, também foi verificado o efeito de interações de cargas sobre o pK de grupos individuais de um dado tipo, em relação à variações de valores de pK estimados a partir de modelos moleculares. Assim, para diversos grupos $-COOH$ de ácido aspártico, foram calculados valores de pK , levando-se em conta suas posições na sequência de aminoácidos da molécula da proteína, em pH 2 e pH 6. Os resultados indicaram que há diferenças entre os valores de pK desses grupos $-COOH$, em um mesmo pH , e que esses valores

também variam quando se muda de um pH para outro. Essas diferenças, em um mesmo pH, chegaram a ser da ordem de 0,3-0,4 unidade, em força iônica 0,1 e 1,0 M. As diferenças de valores de pK , para um mesmo grupo, ao se passar de pH 2 para pH 6, chegaram a ser da ordem de 0,3 unidade em força iônica 1,0 M e de 0,7 em força iônica 0,1 M, sendo portanto mais pronunciadas as diferenças em força iônica 0,1M do que em força iônica 1,0 M.

O modelo de Tanford e Kirkwood apesar de mais refinado do que o de Linderstrom - Lang, envolve também aproximações, sendo uma delas a suposição de que os grupos superficiais de uma molécula de proteína, estão na mesma posição em solução que no estado cristalino. No estudo da lisozima⁽²⁶⁾, foi concluído que esse modelo, que mostrou ser capaz de dar resultados de boa exatidão para moléculas pequenas, não foi capaz de ter o mesmo sucesso aplicado à proteínas, não podendo prever o pK de um grupo particular com exatidão.

Como podemos ver, a interpretação de curvas de titulações de proteínas não é simples, uma vez que o comportamento das mesmas é bem mais complexo do que o de moléculas pequenas, e resultados inesperados são bastante frequentes. Com uma mesma proteína diferentes resultados podem ser obtidos, simplesmente por se empregar diferentes preparações dessa proteína⁽¹⁸⁾.

No nosso caso, os resultados obtidos com a ovalbumina não envolvem modelos dos tipos que discutimos. Eles são obtidos diretamente a partir dos dados experimentais, considerando-se a solução de proteína constituída de uma mistura de ácidos monopróticos. A discrepância entre os nossos resultados e os de Cannan, na região dos grupos carboxílicos, em vista do discutido, pode ser atribuída à diferença dos métodos empregados. Os dois tipos de grupos carboxílicos que caracterizamos, um tipo com pK de 3,47 e o outro com pK de

5,13, podem ser entendidos como cada qual sendo constituído de grupos -COOH de valores de pK constantes, dentro de pelo menos 0,5 unidade, que é o limite imposto pelo nosso método para distinguir entre diferentes grupos ácidos⁽¹⁷⁾. Entretanto, esse é um ponto que necessita ser melhor estudado.

Os grupos carboxílicos da ovalbumina são provenientes de ácido glutâmico e ácido aspártico. No estudo da lisozima⁽²⁶⁾, foram usados valores de pK intrínseco de 4,0 e 4,5⁽⁷¹⁾, para os ácidos aspártico e glutâmico, respectivamente. Admitimos por isso, que os nossos resultados são coerentes com o fato da molécula de ovalbumina apresentar dois tipos de grupos carboxílicos, e podemos interpretar que o valor de pK de 3,47 que obtivemos, refere-se a grupos -COOH de ácido aspártico, e o valor de pK de 5,13 refere-se aos grupos -COOH de ácido glutâmico. Os desvios observados dos valores esperados de pK para esses grupos, são pequenos e dentro dos limites usuais obtidos em titulações de proteínas, e talvez possam ser explicados em termos de interações eletrostáticas.

Ainda a respeito do fato de Cannan⁽²⁰⁾ ter calculado apenas um valor de pK para os grupos carboxílicos, já comentamos a respeito do método usado e suas limitações. Contudo, podemos acrescentar que Cannan aplicou a sua equação baseada no modelo de Linderstrom-Lang, no ponto médio da curva de titulação, simétrico com respeito à um ácido polivalente, na região dos grupos carboxílicos, admitindo um mesmo pK intrínseco para os dois tipos de grupos carboxílicos. Assim o pK obtido referiu-se à cálculos na região da curva entre pH 3,5 e 4,3. Embora Cannan descreva bem a sua curva de titulação nessa região, com um único valor de pK , tal valor envolve mais essas aproximações que não estão presentes nos valores que obtivemos.

Dessa maneira, podemos considerar que o valor úni-

co de pK para todos os grupos carboxílicos, obtido por Cannan, é o que satisfaz melhor o modelo por êle empregado. Entretanto, isso não implica obrigatoriamente que o valor obtido para este parâmetro esteja correto.

Quanto aos valores de pK dos grupos imidazol da histidina e amino da lisina, obtivemos os valores de 7,29 para os grupos imidazol e 10,03 para os grupos amino. Nessas regiões da curva não ocorreu nada semelhante ao ocorrido na região dos grupos carboxílicos. O valor de 7,29 obtido para os grupos imidazol, concorda bem com o valor de 6,8 obtido por Cannan⁽²⁰⁾, e está bem próximo do valor esperado de 7,5⁽⁶²⁾, de acordo com o previsto por modelos moleculares. O valor de pK de 10,03 obtido para os grupos amino, também é bem concorde com o valor de 10,1 obtido por Cannan⁽²⁰⁾, e próximo do valor esperado de 10,4 previsto por modelos moleculares⁽⁶²⁾.

Com os valores de volume de equivalência de NaOH para cada tipo de grupo titulável, ainda referentes à tabela 20 e figura 18, calculamos o número de moles de cada tipo de grupo por mol de ovalbumina, admitindo-se uma Massa Molar de 45.000 para essa proteína^(20,62).

Assim, para os grupos carboxílicos com pK calculado de 3,47, obtivemos 26,8 moles por mol de ovalbumina, e para os de pK igual a 5,13, 16,2 moles por mol de ovalbumina. Jordam⁽⁶²⁾ obteve um total de 46 moles de grupos/mol de ovalbumina e Cannan⁽²⁰⁾ 51 moles de grupos/mol. O nosso valor é mais próximo do valor obtido por Jordam. Com relação à diferença em relação ao valor obtido por Cannan, pode ser levado em conta que seu estudo se refere à uma preparação de ovalbumina diferente da que usamos, uma vez que êle preparou a sua própria proteína⁽⁷²⁾, enquanto que empregamos uma preparação comercial. Jordam usou a mesma ovalbumina comercial que usamos, a grau V da Sigma, o que pode justificar a maior concor

dância entre o nosso valor e o deste autor. Essa concordância pode ser considerada satisfatória em se tratando de titulações de proteínas, embora a diferença entre o nosso valor e o de Cannan, nos parece ser suficientemente significativa para ser explicada apenas em função do uso de diferentes preparações da proteína. A diferença pode ser também devido à diferença de métodos empregados, ou aos diferentes métodos de cálculos usados. No entanto, o valor de Cannan é bem concordante com o obtido pela análise de aminoácido da ovalbumina^(18,19).

Para os grupos imidazol, encontramos um valor de 3,6 moles por mol de proteína, valor bem concordante com o de 4-5 moles por mol de ovalbumina, encontrado por Cannan⁽²⁰⁾. Jordam⁽⁶²⁾ obteve 7 moles por mol de ovalbumina, um valor um tanto mais alto. Esses valores podem ser considerados em concordância satisfatória com os de análise de amino ácidos⁽¹⁹⁾.

No caso dosaminos grupos, obtivemos um valor de 12,8 moles por mol de ovalbumina. Cannan obteve 23 moles⁽²⁰⁾, e Jordam⁽⁶²⁾ 19 moles por mol de ovalbumina. Aqui há uma maior discordância entre os nossos resultados e esses da literatura. A análise de aminoácidos revela a presença de 15 moles de lisina por mol de ovalbumina⁽²⁰⁾, e em relação a esse valor, o valor por nós obtido concorda satisfatoriamente. Cannan atribui o fato de ter obtido um valor maior que o indicado pela análise de aminoácido, à possibilidade da existência de α -aminoácidos, presentes além da lisina. A diferença entre os nossos resultados e os de Cannan e Jordan não nos parece simples de ser explicada, pois se naqueles estudos foram titulados α -aminoácidos, juntamente com os ϵ -amino grupos da lisina, em nossas titulações o mesmo deveria ocorrer. De qualquer modo, o valor de pK que obtivemos para os grupos amino é bem concordante com o obtido por Cannan. Além

disso, Kekwick e Cannan⁽⁷³⁾, na titulação de ovalbumina em formaldeído, encontraram um valor de 16-18 moles de grupos amino por mol de ovalbumina, resultado este que está mais próximo da quantidade de lisina determinada pela análise de aminoácidos.

Esses últimos resultados sugeriram-nos que na região da curva de titulação correspondente aos grupos aminos, pudesse estar ocorrendo algo semelhante ao ocorrido na região dos grupos carboxílicos. Para verificar essa possibilidade, introduzimos uma nova função de Gran modificada. Com isso, pretendíamos ver se seria possível determinar outros tipos de grupos amino, além dos que determinamos nessa região final da curva de titulação. No entanto, não pudemos de_tetar a existência de novos grupos tituláveis, uma vez que a função de Gran modificada introduzida não apresentou um comportamento adequado nessa região da curva. Dessa maneira, os resultados que obtivemos sugerem que estamos titulando a penas os amino grupos da lisina, sendo esses os grupos finais titulados por hidróxido de sódio.

Os resultados da segunda titulação apresentada, relativos às tabelas 21 e 18, e à figura 19, referem-se à outra titulação de ovalbumina grau V, em concentração diferente da anterior. Também nessa titulação empregamos um eletrodo de vidro e um de Ag/AgCl, combinados em um só conjunto. Nessa titulação, os valores de pK obtidos para os grupos tituláveis foram de 3,34 e 4,96 para os dois tipos de grupos carboxílicos, de 7,16 para os grupos imidazol e 10,19 para os grupos amino. O número de moles desses grupos por mol de ovalbumina, foram de 26,6 e 18,1 para os dois tipos de grupos carboxílicos, dando um total de 44,7 moles de grupos -COOH por mol de proteína, de 4,7 para os grupos imidazol e 13,4 para os grupos amino, resultados esses que concordam satisfatoriamente com os da titulação anterior, sendo que

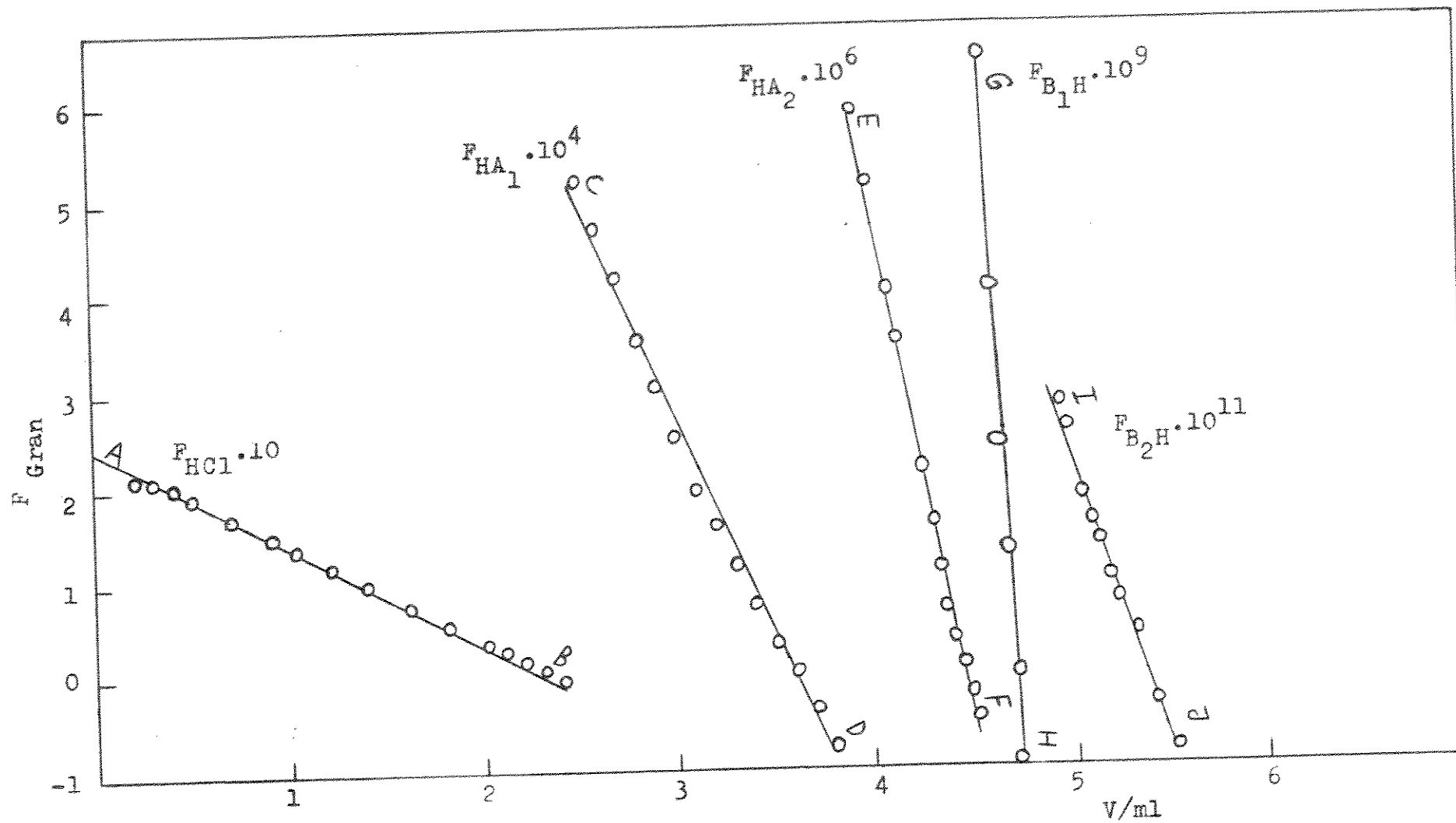


Figura 19. Titulação de ovalbumina com NaOH. Funções de Gran modificadas em função de V, referentes aos dados da tabela 21.

uma incerteza maior na determinação dos grupos imidazol é esperada, em virtude de sua quantidade relativa ser bem menor que a de outros grupos. Com relação às diferenças mais sensíveis entre os valores de pK dessa titulação e da anterior, temos que levar em conta que aqui empregamos um eletrodo de vidro combinado, e na anterior empregamos eletrodos de vidro e de calomelano separados.

Nas diversas titulações que fizemos, verificamos que houve maior concordância entre as realizadas com o emprego de eletrodos de vidro e calomelano, separados. Assim, para avaliar a reprodutibilidade do método, usamos resultados de diferentes titulações de ovalbumina grau V com NaOH, empregando-se eletrodos de vidro e calomelano. Na tabela 23, apresentamos os resultados do número de moles de cada grupo titulável por mol de ovalbumina e seus valores de pK, juntamente com as incertezas envolvidas. Esses valores se referem à média de resultados de quatro titulações, incluindo a discutida aqui, cujos dados estão nas tabelas 17, 20 e figura 18. Em função desses valores, consideramos a precisão obtida plenamente satisfatória.

A terceira titulação apresentada, cujos dados estão na tabela 19, e os resultados apresentados na tabela 22 e figura 20, refere-se à uma titulação feita com a ovalbumina da Fischer. Os resultados obtidos para os valores de pK dos grupos tituláveis, foram de 3,46 para o primeiro tipo de grupo carboxílico, de 5,07 para o segundo tipo de grupo carboxílico, de 7,48 para os grupos imidazol e de 10,44 para os grupos amino. O número de moles desses grupos tituláveis por mol ovalbumina, foram de 32,1 e 10,9 para os dois tipos de grupos carboxílicos, dando um total de 43 moles por mol de proteína, de 3,6 para os grupos imidazol e 11,5 para os grupos amino. Esses resultados são compatíveis com os obtidos para a ovalbumina grau V da Sigma, a não ser quando con

Tabela 23. Titulação potenciométrica de ovalbumina com NaOH. Valores médios de volume de neutralização, pK e número de moles / mol de proteína, para os grupos tituláveis da ovalbumina. Esses valores foram obtidos a partir de quatro titulações à diferentes concentrações de ovalbumina grau V da Sigma.

Grupo Titulável	V _{NaOH} /ml	pK	n ^o moles /mol de proteína
HA ₁ (Carboxílico)	1,37 ± 0,03	3,48 ± 0,04	27,3 ± 0,5
HA ₂ (Carboxílico)	0,79 ± 0,02	5,15 ± 0,05	15,9 ± 0,5
B ₁ H (Imidazol)	0,18 ± 0,02	7,33 ± 0,14	3,7 ± 0,3
B ₂ H (Amino)	0,64 ± 0,02	10,06 ± 0,03	12,8 ± 0,4

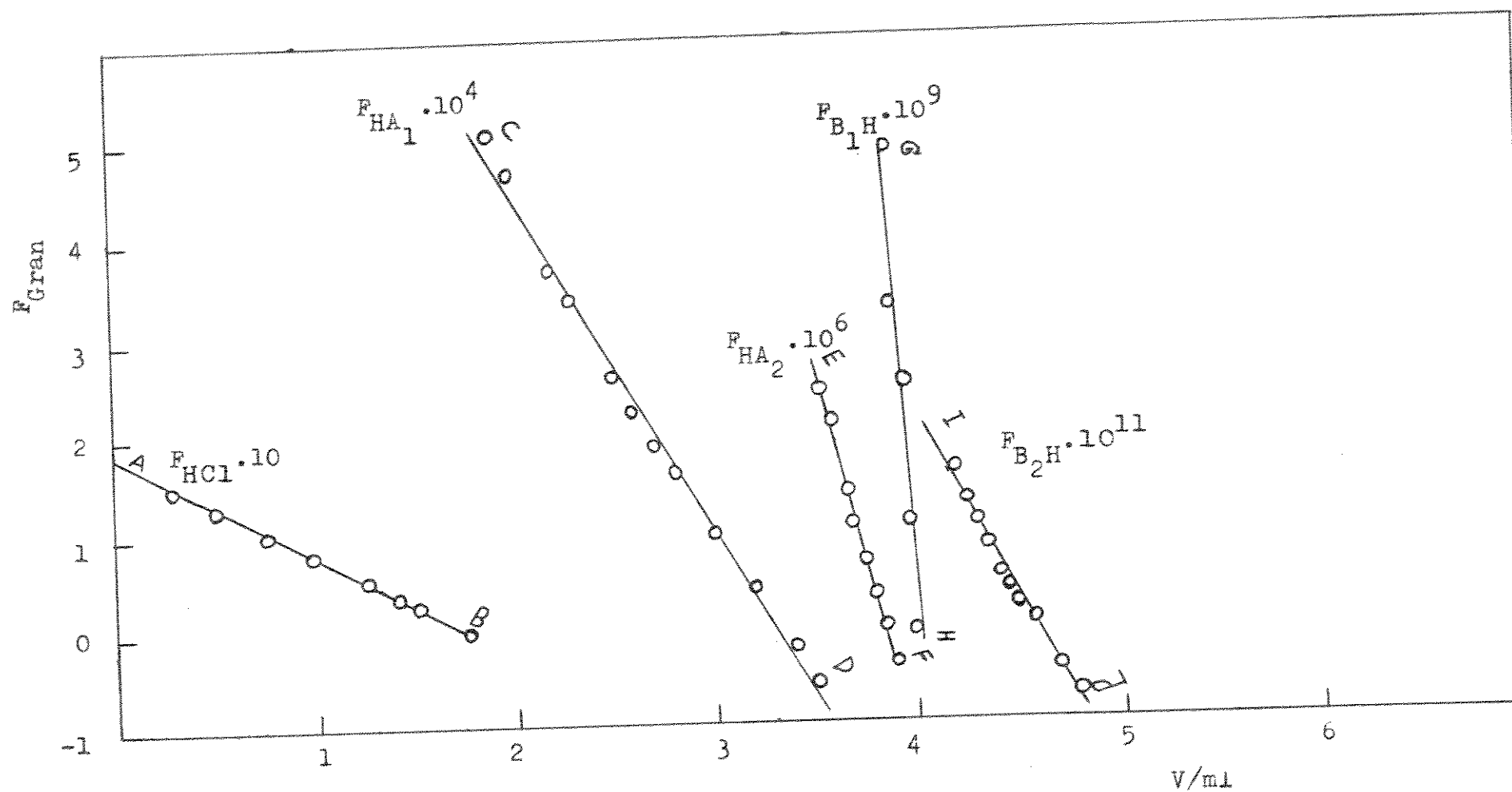


Figura 20. Titulação de ovalbumina com NaOH. Funções de Gran modificadas em função de V , referentes aos dados da tabela 22.

sideramos individualmente os grupos carboxílicos. O resultado obtido para o número total de moles dos grupos carboxílicos por mol de ovalbumina, apresentou boa concordância com os resultados obtidos anteriormente, mas o número de moles de cada um dos tipos de grupos carboxílicos, apresentou diferenças significativas em relação aos obtidos anteriormente. Isso nos parece difícil de ser explicado, a não ser o fato de que a proteína usada agora é de origem diferente, não apresentando as mesmas especificações da ovalbumina grau V da Sigma. Entretanto, os valores de pK desses grupos foram concordantes com os obtidos para a ovalbumina grau V da Sigma.

V.5. CONCLUSÃO

A sistemática que empregamos no estudo potenciométrico de ovalbumina, em razão dos resultados apresentados, parece-nos promissora no estudo de titulações de proteínas, quer sob o ponto de vista analítico quer sob o ponto de vista de estudos de estrutura e interações da proteína.

Examinando-se os resultados obtidos na região dos grupos carboxílicos, por exemplo, foram caracterizados dois tipos de grupos carboxílicos, por apresentarem diferentes valores de pK. Estes resultados diferem dos resultados de outros estudos potenciométricos⁽²⁰⁾ quanto à estequiometria, e também pelo fato de nesses trabalhos se referirem a todos os grupos carboxílicos com um mesmo valor de pK. Há diferenças também entre os resultados que obtivemos para os grupos carboxílicos, e os obtidos pelo estudo termométrico realizado por Jordan⁽⁶²⁾, que também identifica apenas um tipo de grupos carboxílicos. Entretanto, este tipo de estudo termométrico só detetaria diferentes tipos de grupos carboxílicos se certas exigências de diferença de pK ($K_1/K_2 \geq 2,5$)⁽⁶²⁾ e de ΔH ($\Delta H_1/\Delta H_2 \geq 1,2$)⁽⁶²⁾ fossem atendidas. Essa é uma das vantagens do método de cálculo que empregamos, que permite resolver grupos ácidos de um mesmo grupo funcional, desde que a diferença de pK seja da ordem de 0,5 unidade. Desta maneira, uma das limitações de nosso método, estaria no fato de que grupos funcionais com diferenças de pK menor que 0,5 unidade não podem ser distinguidos. Entretanto, o método foi capaz rejeitar a admissão feita a priori, de que os vários grupos tituláveis de um mesmo tipo apresentam o mesmo pK, como foi visto no caso dos grupos carboxílicos.

Comparando-se os resultados das titulações feitas, quanto à quantidade de cada tipo de grupo titulável por mol de proteína, conclui-se que o método apresenta uma precisão que pode ser considerada boa para o estudo de proteínas, demonstrando assim a viabilidade de sua aplicação analítica.

Quanto à comparação dos resultados do número de grupos tituláveis que obtivemos, com os de outros trabalhos da literatura^(20,62), há uma maior dificuldade em tirar-se uma conclusão. Contudo, em virtude de estar se tratando de comparações envolvendo o uso de diferentes métodos e diferentes preparações de proteína, tal discrepância de resultados é de se esperar.

Verificamos então que o método de estudo aqui proposto, apresenta vantagens em estudos de titulações de proteínas, uma vez que permite obter simultaneamente os valores de pK e o número de cada tipo de grupo titulável por mol de proteína. Com relação à titulações potenciométricas descritas⁽²⁰⁾, apresenta maior facilidade de execução e pode diferenciar melhor grupos tituláveis de um mesmo tipo, fornecendo mais dados de interesse em estudos de caracterização de proteínas. Apresenta ainda a vantagem de necessitar de uma menor quantidade de proteína para a obtenção da curva de titulação. Assim, além de vantagens para uma melhor caracterização de proteínas, o método descrito é mais adequado para aplicações com fins analíticos, na determinação da concentração de proteínas.

Em relação às titulações termométricas⁽⁶²⁾, apresenta a vantagem, conforme já discutimos, de fornecer os valores de pK dos grupos tituláveis, permitindo caracterizá-los, o que por esse método não é possível.

Entretanto, apesar da perspectiva favorável relativa à sistemática empregada no presente estudo, para que

se tenha uma maior segurança quanto à sua aplicação geral em titulações de proteínas, cremos que outros estudos com outras proteínas, deverão ser feitos futuramente. Uma disponibilidade de melhores aparelhos e instrumentos, como pH-metros, microburetas, eletrodos, etc, que permitissem obter dados experimentais mais precisos, seria bastante útil nesses estudos.

Outro tipo de estudo que também poderá ser feito, é o de titulações de proteína em condições de força iônica mais elevadas, uma vez que tem sido observado que um aumento de força iônica, diminui diferenças apresentadas entre curvas experimentais e curvas calculadas, com base em propriedades intrínsecas apenas de constituintes ácidos e básicos^(20,26).

VI. DETALHES EXPERIMENTAIS

VI.1. Perclorato de sódio.

O perclorato de sódio foi preparado pelo tratamento de carbonato de sódio com ácido perclórico conforme indicação da literatura⁽⁷⁴⁾. A solução estoque obtida foi padronizada por pesagem, pipetando-se 2,00 ml desta em cadinho de porcelana, secando-se à peso constante em estufa à 120°C.

VI.2. Azoteto de sódio

Foi feita a purificação do azoteto de sódio, visando eliminar impurezas devido ao ferro e hidróxido de sódio, usualmente presentes em baixo teor.

O sal foi dissolvido em água, à cerca de 90°C, até atingir a saturação. A solução foi filtrada e a seguir adicionou-se igual volume de álcool etílico. O sal separado após resfriamento, foi recolhido por filtração e lavado em álcool etílico, deixando-se em dessecador a vácuo com cloreto de cálcio. Posteriormente o sólido foi deixado em estufa a 110°C durante algumas horas. Preparou-se uma solução estoque desse sal, fazendo-se a sua padronização pelo tratamento de um volume conhecido da mesma, com uma solução padrão de ácido perclórico. A seguir a solução foi fervida visando-se eliminar o ácido azotídrico e o excesso de ácido perclórico foi titulado com solução padrão de hidróxido de sódio.

VI.3. Perclorato de manganês

O perclorato de manganês foi preparado a partir da reação de ácido perclórico 20% com carbonato de manganês, até

o ponto em que restava um pequeno resíduo de carbonato que não se dissolveu. Após a filtração, foi feita a cristalização por evaporação à pressão reduzida, à temperatura de cerca de 30°C em evaporador "Flasch", da Buchler Instruments. O sal recolhido por filtração foi em seguida recristalizado dessa mesma maneira.

Com o perclorato obtido foi preparada uma solução estoque, que foi padronizada com EDTA, segundo indicação de Shwarzembach e Flaschka⁽⁷⁵⁾.

VI.4. Aparelhagem

Para as medidas de f.e.m. relativas ao estudo do sistema Mn(II)-Azoteto e às titulações de NaN_3 com HClO_4 , foram utilizados um eletrodo de vidro Metrohm EA 109, um eletrodo de prata-cloreto de prata preparado de acordo com Brown⁽⁷⁶⁾, e um potenciômetro Metrohm "Compensator E 388". Nas titulações de NaN_3 com HCl foram empregados o mesmo compensador e eletrodos combinados de vidro e Ag/AgCl Metrohm EA 121.

Nas titulações de ovalbumina com NaOH, para as medidas de pH foram empregados eletrodos de vidro Metrohm EA 109, eletrodo de calomelano saturado Metrohm EA 404 e um pH-metro digital Orion 701. Em algumas dessas titulações também foi empregado eletrodo de vidro e Ag/AgCl combinados Metrohm EA 121.

APÊNDICE I - Listagem do programa de quadrados mínimos, relativo ao emprego da equação 40.

```
10 PRINT "DET. SIMULT. DE KA E VEQ DE ACIDOS E BASES"
15 PRINT "                MUITO FRACOS "
20 DIM V1(30), P(30), H(30), H1(30), F(30)
30 DIM V2(30), Y(30), X(30), X1(30), Y2(30)
60 PRINT
65 PRINT "VO"
80 INPUT V
85 PRINT "CH"
90 INPUT B
110 PRINT
120 PRINT "N. DE DADOS"
140 INPUT N
160 PRINT
180 PRINT "V                POH                OH"
200 FOR I = 1 TO N
220 READ V1(I), P(I)
240 LET H(I) = 10**(-P(I))
260 PRINT V1(I), P(I), H(I)
280 NEXT I
300 FOR I = 1 TO N
320 LET H1(I) = (H(I) - 1E-14/(H(I)))
340 LET V2(I) = (V + V1(I))/B
380 NEXT I
400 FOR I = 1 TO N
420 LET Y(I) = V2(I)*H1(I) + V1(I)
440 LET X(I) = H(I)*V1(I) + V2(I)*H1(I)*H(I)
460 NEXT I
480 LET X2 = 0
500 LET Y1 = 0
520 FOR I = 1 TO N
540 LET X1(I) = X(I)**2
```

```

560 LET X2 = X2 + X(I)
580 LET Y1 = Y1 + Y(I)
600 LET Y2(I) = X(I)*Y(I)
620 NEXT I
640 LET X3 = 0
660 LET Y3 = 0
680 FOR I = 1 TO N
700 LET X3 = X1(I) + X3
720 LET Y3 = Y2(I) + Y3
740 NEXT I
760 PRINT "KA          VEQ          PKA"
780 LET M = (N*Y3 - X2*Y1)/(N*X3 - X2**2)
800 LET B1 = (X3*Y1 - Y3*X2)/(N*X3 - X2**2)
810 LET M2 = -LOG10(1/(-M))
820 PRINT -M, B1, M2
825 PRINT "VEQ - V          V"
830 FOR I = 1 TO N
840 LET F(I) = V1(I)*H(I)*(-M) + V2(I)*H1(I)*(1 + H(I)*(-M))
850 PRINT F(I), V1(I)
855 NEXT I
951 DATA 6.00 ,9.233, 8.00,9.433, 9.10,9.536, 9.50,9.575
952 DATA 10.0,9.610, 12.00,9.799, 14.0,10.004, 16.0,10.276
953 DATA 18.0,10.739, 19.0,11.121, 20.0,11.485, 21.0,11.715
1000 END

```

APÊNDICE II. Listagem do programa PROTE, referente aos cálculos efetuados empregando-se as equações 50 a 64.

```

5 PRINT "CÁLCULOS DE KA E VEQ SIMULTANEOS - FUNÇÕES DE GRAN"
6 PRINT "MODIFICADAS - LINEARIZAÇÃO DE CURVAS DE TITULAÇÃO"
7 PRINT "POTENCIOMÉTRICAS"
10 DIM V1(90), P(90), H(90), H1(90), V2(90), F(90), V3(90)
11 DIM A1(90), A2(90), A3(90), Z(90), Z1(90), Z2(90), Z3(90)
12 DIM Z4(90), F3(90), F4(90), F5(90), F6(90), F7(90), H2(90)
15 DIM F8(90), A4(90), Z5(90), A5(90)
16 DIM T(90), T1(90), T2(90), T3(90), F1(90)
17 DIM F2(90), W(90), D4(90)
30 PRINT "VO"
35 INPUT V
50 PRINT "CB"
60 INPUT B
70 PRINT "N. DE DADOS"
80 INPUT N
100 FOR I = 1 TO N
102 READ V1(I), P(I)
110 LET H(I) = 10**(-P(I))
115 LET H2(I) = H(I)/0.83
120 LET H1(I) = (H(I)/0.83 - 1E-14/(H(I)*0.755))
130 LET V2(I) = (V + V1(I))
140 NEXT I
145 PRINT "CALCULO DE FGRAN APROX"
146 PRINT
147 PRINT "CALCULO DE F HCL APROX"
150 PRINT "N1"
155 INPUT J
160 PRINT "N2"
165 INPUT J1

```

```

170 PRINT " V                      F HCL APROX"
175 FOR I = J TO (J + J1)
180 LET F(I) = H1(I)*V2(I)
185 PRINT V1(I), F(I)
190 LET V3(I) = (F(I)/B + V1(I))
195 NEXT I
200 LET K = 0
215 FOR I = J TO (J + J1)
220 LET K = K + V3(I)
230 NEXT I
232 LET K1 = K/(J1 + 1)
235 PRINT "V HCL"
240 PRINT K1
241 PRINT "CALCULO DE F HA1 APROX"
245 PRINT "N1"
250 INPUT J
255 PRINT "N2"
260 INPUT J1
265 PRINT "K HA1"
270 INPUT K2
273 LET K9 = K1
275 PRINT "V                      F HA1          V HA1"
280 FOR I = J TO (J + J1)
285 LET F1(I) = H1(I)*V2(I)*(K2 + H2(I))/B
290 LET F2(I) = F1(I) + (V1(I) - K1) H2(I)
293 LET W(I) = F2(I)/K2 + V1(I)
295 PRINT V1(I), F2(I), W(I)
300 NEXT I
305 GOSUB 2000
310 LET K2 = X1/Y1
315 LET K3 = Y - K2*X
320 LET K3 = K3/(-K2)

```

```

325 PRINT "V HA1          K HA1"
330 PRINT K3, -K2
340 PRINT "CALCULO DE F HA2 APROX"
345 PRINT "N1"
350 INPUT J
355 PRINT "N2"
360 INPUT J1
365 PRINT "K HA2"
370 INPUT K4
372 PRINT "V          F HA2          V HA2"
375 FOR I = J TO (J+J1)
380 LET F1(I) = (H1(I)*V2(I)*(H2(I)+K4)/B)
385 LET F2(I) = F1(I) + (V1(I) - K3)*H2(I)
395 LET W(I) = F2(I)/K4 + V1(I)
400 PRINT V1(I), F2(I), W(I)
403 NEXT I
405 GOSUB 2000
410 LET K4 = X1/Y1
415 LET K5 = Y - K4*X
420 LET K5 = K5/(-K4)
425 PRINT "V HA2          K HA2"
430 PRINT K5, -K4
435 PRINT "CALCULO DE F BlH APROX"
445 PRINT "N1"
450 INPUT J
455 PRINT "N2"
460 INPUT J1
465 PRINT "K BlH"
470 INPUT K6
472 PRINT "V          F BlH          V BlH"
475 FOR I = J TO (J+J1)
480 LET F1(I) = (H1(I)*V2(I)*(H2(I)+K6)/B)
485 LET F2(I) = F1(I) + (V1(I) - K5)*H2(I)
490 LET W(I) = F2(I)/K6 + V1(I)

```

```

500 PRINT V1(I), F2(I), W(I)
503 NEXT I
505 GOSUB 2000
506 LET K6 = X1/Y1
508 LET K7 = Y - K6*X
510 LET K7 = K7/(-K6)
515 PRINT "V B1H APROX      K B1H APROX"
520 PRINT K7, -K6
525 PRINT "CALCULO DE F B2H APROX"
580 PRINT "N1"

585 INPUT J
590 PRINT "N2"
592 INPUT J1
600 PRINT "K B2H"
601 INPUT K8
602 PRINT "V          F B2H APR      V B2H  APROX"
610 FOR I = J TO (J + J1)
615 LET F1(I) = (H1(I)*V2(I)*(H2(I) + K8)/B)
620 LET F2(I) = F1(I) + (V1(I) - K7)*H2(I)
625 LET W(I) = F2(I)/K8 + V1(I)
630 PRINT V1(I), F2(I), W(I)
635 NEXT I
640 GOSUB 2000
645 LET K8 = X1/Y1
650 LET D1 = Y - K8*X
655 LET D1 = D1/(-K8)
660 PRINT "V B2H APROX      K B2H APROX"
665 PRINT D1, -K8
670 PRINT "CALCULO DE F GRAN MOD REFINADAS"
680 PRINT

700 PRINT "VALORES DE N P/ SEGMENTAÇÃO DA CURVA"
715 PRINT "N1"
717 INPUT N1
720 PRINT "N2"

```

```
721 INPUT N2
722 PRINT "N3"
723 INPUT N3
724 PRINT "N4"
725 INPUT N4
726 PRINT "N5"
727 INPUT N5
728 PRINT "N6"
729 INPUT N6
730 PRINT "N7"

731 INPUT N7
732 PRINT "N8"
733 INPUT N8
734 PRINT "N9"
735 INPUT J2
736 PRINT "N10"
737 INPUT J3
739 LET E = 0
741 LET S = Z7
785 FOR I = 1 TO N
790 LET A1(I) =  $-K2/(-K2 + H2(I))$ 
795 LET A2(I) =  $-K4/(-K4 + H2(I))$ 
800 LET A3(I) =  $-K6/(-K6 + H2(I))$ 
805 LET A4(I) =  $-K8/(-K8 + H2(I))$ 
806 LET A5(I) =  $-D2/(-D2 + H2(I))$ 
810 NEXT I
830 FOR I = N1 TO (N1 + N2)
835 LET F(I) = H1(I)*V2(I)
840 LET Z(I) = B*(K3 - K9)*A1(I)
845 LET Z1(I) = B*(K5 - K3)*A2(I)
850 LET Z2(I) = B*(K7 - K5)*A3(I)
855 LET Z3(I) = B*(D1 - K7)*A4(I)
858 LET Z4(I) = F(I) - Z(I) - Z1(I) - Z2(I) - Z3(I)
```

```
865 LET Z5(I) = (Z4(I) + V1(I)*B)/B
870 NEXT I
875 LET Z6 = 0
900 FOR I = N1 TO (N1 + N2)
905 LET Z6 = Z6 + Z5(I)
910 NEXT I
915 LET Z7 = Z6/(N2 + 1)
926 LET K9 = Z7
955 FOR I = N3 TO (N3 + N4)
960 LET F3(I) = H1(I)*V2(I)*(-K2 + H2(I))/B
965 LET F4(I) = (V1(I) - Z7)*H2(I)
970 LET F5(I) = (K5 - K3)*A2(I)*(-K2 + H2(I))
975 LET F6(I) = (K7 - K5)*A3(I)*(-K2 + H2(I))
980 LET F7(I) = (D1 - K7)*A4(I)*(-K2 + H2(I))
985 LET F8(I) = F3(I) + F4(I) - F5(I) - F6(I) - F7(I)
995 LET T(I) = F8(I)
998 NEXT I
999 LET J = N3
1000 LET J1 = N4
1003 GOSUB 2200
1005 LET K2 = X1/Y1
1010 LET K3 = Y - K2*X
1015 LET K3 = K3/(-K2)
1020 FOR I = N5 TO (N5 + N6)
1070 LET F3(I) = H1(I)*V2(I)*(-K4 + H2(I))/B
1075 LET F4(I) = (V1(I) - K3)*H2(I)
1080 LET F6(I) = (K7 - K5)*A3(I)*(-K4 + H2(I))
1085 LET F7(I) = (D1 - K7)*A4(I)*(-K4 + H2(I))
1090 LET F8(I) = F3(I) + F4(I) - F6(I) - F7(I)
1100 LET T1(I) = F8(I)
1105 NEXT I
1107 LET J = N5
1108 LET J1 = N6
1110 GOSUB 2200
```

```
1115 LET K4 = X1/Y1
1120 LET K5 = Y - K4*X
1125 LET K5 = K5/(-K4)
1180 FOR I = N7 TO (N7 + N8)
1185 LET F3(I) = H1(I)*V2(I)*(-K6 + H2(I))/B
1190 LET F4(I) = (V1(I) - K5)*H2(I)
1195 LET F5(I) = (D1 - K7)*A4(I)*(-K6 + H2(I))
1200 LET F8(I) = F3(I) + F4(I) - F5(I)
1210 LET T2(I) = F8(I)
1215 NEXT I

1216 LET J = N7
1217 LET J1 = N8
1220 GOSUB 2200
1225 LET K6 = X1/Y1
1230 LET K7 = Y - K6*X
1235 LET K7 = K7/(-K6)
1237 FOR I = J2 TO (J2 + J3)
1290 LET F3(I) = H1(I)*V2(I)*(-K8 + H2(I))/B
1295 LET F4(I) = (V1(I) - K7)*H2(I)
1305 LET F8(I) = F3(I) + F4(I)
1315 LET T3(I) = F8(I)
1320 NEXT I
1321 LET J = J2
1322 LET J1 = J3
1325 GOSUB 2200
1330 LET K8 = X1/Y1
1335 LET D1 = Y - K8*X
1340 LET D1 = D1/(-K8)
1378 FOR I = E2 TO (E2 + E3)
1380 LET F3(I) = H1(I)*V2(I)*(-D2 + H2(I))/B
1385 LET F4(I) = (V1(I) - D1)*H2(I)
1390 LET F8(I) = F3(I) + F4(I)
1392 NEXT I
1395 GOSUB 2200
```

```
1440 LET E = E + 1
1443 IF Z7 - S > 0.0002 GOTO 741
1445 IF S - Z7 <= ABS(0.0002) GOTO 1452
1450 GOTO 741
1452 PRINT "VALORES F GRAN MOD REFINADAS"
1454 PRINT
1456 PRINT "V          F HCL REF"
1458 FOR I = N1 TO (N1 + N2)
1460 PRINT V1(I), Z4(I)
1462 NEXT I
1464 PRINT "V HCL REF"
1466 PRINT Z7
1468 PRINT "V          F HA1 REF"
1470 FOR I = N3 TO (N3 + N4)
1472 PRINT V1(I), T(I)
1474 NEXT I
1476 PRINT "V HA1 REF      K HA1 REF"
1478 PRINT K3, -K2
1480 PRINT
1482 PRINT "V          F HA2 REF"
1484 FOR I = N5 TO (N5 + N6)
1486 PRINT V1(I), T1(I)
1488 NEXT I
1490 PRINT "V HA2 REF      K HA2 REF"
1492 PRINT K5, -K4
1495 PRINT
1496 PRINT "V          F B1H REF"
1498 FOR I = N7 TO (N7 + N8)
1500 PRINT V1(I), T2(I)
1502 NEXT I
1504 PRINT "V B1H REF      K B1H REF"
1506 PRINT K7, -K6
1509 PRINT
1510 PRINT "V          F B2H REF"
```

```
1512 FOR I = J2 TO (J2 + J3)
1514 PRINT V1(I), T3(I)
1516 NEXT I
1518 PRINT "V B2H REF      K B2H REF"
1520 PRINT D1, -K8
1525 PRINT
1530 PRINT "NO. DE INTERAÇÕES"
1535 PRINT E
2000 LET Y = 0
2060 LET X = 0

2070 FOR I = J TO (J + J1)
2080 LET Y = Y + F2(I)
2090 LET X = X + V1(I)
2100 NEXT I
2110 LET X = X/(J1 + 1)
2120 LET Y = Y/(J1 + 1)
2130 LET X1 = 0
2140 LET Y1 = 0
2150 FOR I = J TO (J + J1)
2160 LET X1 = X1 + (V1(I) - X)*F2(I)
2170 LET Y1 = Y1 + (V1(I) - X)**2
2180 NEXT I
2190 RETURN
2200 LET Y = 0
2210 LET X = 0
2220 FOR I = J TO (J + J1)
2230 LET Y = Y + F8(I)
2240 LET X = X + V1(I)
2250 NEXT I
2260 LET X = X/(J1 + 1)
2270 LET Y = Y/(J1 + 1)
2280 LET X1 = 0
2290 LET Y1 = 0
```

```
2300 FOR I = J TO (J + J1)
2310 LET X1 = X1 + (V1(I) - X)*F8(I)
2320 LET Y1 = Y1 + (V1(I) - X)**2
2330 NEXT I
2340 RETURN
2640 DATA 0,20,2.21, 0.30,2.22, 0.40,2.24, 0.50,2.26, 0.70,
2.32, 0.90,2.36
2641 DATA 1.02,2.40, 1.20,2.46, 1.40,2.52, 1.60,2.61, 1.80,
2.69, 2.00,2.80
2642 DATA 2.10,2.85, 2.20,2.92, 2.30,2.98, 2.40,3.05, 2.50,
3.14, 2.60,3.22
2643 DATA 2.70,3.31, 2.80,3.41, 2.90,3.51, 3.00,3.62, 3.10,
3.74, 3.20,3.85
2644 DATA 3.30,3.97,3.40,4.09, 3.50,4.22, 3.60,4.36, 3.70,
4.49, 3.80,4.64.
2645 DATA 3.90,4.81, 3.94,4.87, 4.00,4.99, 4.10,5.19, 4.14,
5.28, 4.24,5.55
2646 DATA 4.30,5.72, 4.34,5.87, 4.38,6.04, 4.42,6.21, 4.46,
6.39, 4.50,6.60
2647 DATA 4.52,6.75,4.56,7.03, 4.58,7.18, 4.60,7.41, 4.62,
7.66, 4.64,7.91
2648 DATA 4.66,8.15, 4.68,8.49, 4.70,8.73, 4.72,8.92, 4.74,
9.10, 4.76,9.24
2649 DATA 4.78,9.35, 4.80,9.46, 4.84,9.63, 4.88,9.78, 4.92
9.90, 4.94,9.96
2650 DATA 5.02,10.16, 5.06,10.24, 5.10,10.31, 5.16,10.41,
5.20,10.47
2651 DATA 5.30,10.61, 5.40,10.72, 5.50,10.81, 5.60,10.90,
5.70,10.97, 5.80,11.03, 5.90,11.09
3000 END
```

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) L.M. Aleixo, "Estudo da reação entre íons de Mn(II) e íons azoteto em solução aquosa", tese mestrado, I.Q. - UNICAMP, Campinas(1975).
- 2) O.E.S. Godinho e L.M. Aleixo, J. Coord. Chem., 6, 245 (1977).
- 3) F. Maggio, V. Romano e L. Pellerito, J. Eletroanal. Chem., 15, 227 (1967).
- 4) S. Ahrland e E. Avsar, Acta Chem. Scand., A 29, 881 (1975).
- 5) E.F.A. Neves e L.R. Sant'Agostino, Analytica Chim. Acta, 49, 591 (1970).
- 6) S. Ahrland e E. Avsar, Acta Chem. Scand., A 29, 890 (1975).
- 7) F. Maggio, V. Romano e L. Pellerito, Ann. Chem., (Roma), 57, 191 (1967).
- 8) O.E.S. Godinho e E. Stein, Z. Phys. Chemie, 1, 161 (1978).
- 9) E.F.A. Neves, R. Tokoro e E.M.V. Suárez, I Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, (São Paulo 1978), p. 61.
- 10) F.J.C. Rossotti e H. Rossotti, The Determination of Stability Constants (Mc Graw-Hill, New York, 1961) p. 108 e 109.

- 11) Idem, p. 93
- 12) Ibidem, p. 99
- 13) F. Ingman e E. Still, *Talanta*, 13, 1431 (1966).
- 14) A. Ivaska e E. Wanninen, *Anal. Lett.*, 6(11), 961 (1973).
- 15) C. McCallum e D. Midgley, *Anal. Chim. Acta*, 78, 171 (1975)
- 16) C. McCallum e D. Midgley, *Anal. Chem.*, 48, 1232 (1976).
- 17) M.D. Seymour, J.W. Clayton, Jr. e Q. Fernando, *Anal. Chem.*, 49, 1429 (1977).
- 18) C. Tanford, *Advances in Protein Chem.*, 17, 69 (1962).
- 19) A.W. Kenchington, *Analytical Methods of Protein Chemistry* (P. Alexander e R.J. Block, eds., Pergamon Press, New York, 1968), cap. 10.
- 20) R.K. Cannan, A. Kibrick e A.H. Palmer, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 41, 243 (1941).
- 21) J. Steinhardt e S. Beychok, *The Proteins* (H. Neurath, ed., Academic Press, New York, 1964), Vol. 2, cap. 8.
- 22) Y. Nozaki e C. Tanford, *Methods Enzymol.*, 11, 715 (1967).
- 23) K. Linderstron-Lang, *Compt. Rend. Trav. Lab. Calrsberg*, 15, n° 7, (1924).

- 24) M. Laskowski, Jr., e H.A. Sheraga, J. Am. Chem. Soc., 76, 6305 (1954).
- 25) C. Tanford e J.G. Kirkwood, J. Am. Chem. Soc., 79, 5333 (1957).
- 26) C. Tanford e R. Roxby, Biochem., 11, 2192 (1972).
- 27) S. Bugarsky e L. Lieberman, Pflugers Arch. ges. Physiol., 72, 51 (1898)
- 28) F.J.C. Rossotti, ref. 10, p.150
- 29) O.E.S. Godinho e L.M. Aleixo, J. Coord. Chem., trabalho submetido à publicação.
- 30) G. Gran, Analyst, 77, 661 (1952).
- 31) I. Hanson e D. Jagner, Anal. Chim. Acta, 65, 363 (1973).
- 32) F. Ingman, A. Johansson, S. Johansson e R. Karlson, Anal. Chim. Acta, 64, 113 (1973).
- 33) G. Gran, Acta Chem. Scand., 4, 559 (1950).
- 34) A. Johansson, Analyst, 95, 535 (1970).
- 35) T.N. Briggs e J.E. Stuehr, Anal. Chem., 46, 1517 (1974).
- 36) A. Ivaska, Talanta, 22, 995 (1975).
- 37) A. Ivaska e L. Harju, Talanta, 22, 1051 (1975).

- 38) M. Bos, Anal. Chim. Acta, 112, 65 (1979).
- 39) G. Nowogrocki, J. Canonine e M. Wosniak, Anal. Chim. Acta, 112, 185 (1979).
- 40) D.M. Barry e L. Meites, Anal. Chim. Acta, 68, 435 (1974).
- 41) D.M. Barry , L. Meites e B.H. Campbell, Anal. Chim. Acta, 69, 143 (1974).
- 42) G. Arena, E. Rizzarelli, S. Sammartano e C. Rigano, Talanta, 26, 1.. (1979).
- 43) T. Curtius, Ber., 23, 3023 (1890).
- 44) E. de Oliveira, "Aproveitamento Analítico da Reação de Cobre (II) - Azoteto, Equilíbrios e Dados Termodinâmicos", tese, USP, São Paulo (1974).
- 45) R. Haul e E. Sholtz, Naturwissesche, 32, 294 (1944), Apud Chem. Abstr., 40, 2764 (1966).
- 46) R Haul e E. Sheltz, Z. Elektrochem., 52, 226 (1948).
- 47) J. Msek, Collection Czechoslov. Chem. Communs., 25, 3137 (1960).
- 48) R. Shrader e G. Pretzscher, Talanta, 13, (8), 1105 (1966).
- 49) J. Dziegiec e H. Ignaczak, Soc. Sci. Lodz. Acta Chim., 16. 69 (1971), Apud. Chem. Abstr., 76, 94178 h(1972).
- 50) I.M. Kolthoff e E.B. Sandell, Texbook of Quantitative Inorganic Analysis (The Macmillan Co., New York, 1967), p. 542.

- 51) A.P. Chagas, O.E.S. Godinho e J.L.M. Costa, *Talanta*, 24, 593(1977).
- 52) E.A. Neves, "Estudos sobre a reação de íons azoteto com cátions metálicos", tese F.F.C.L. - USP, São Paulo (1966).
- 53) C.A. West, *J. Chem. Soc.*, 77, 705 (1900).
- 54) E.A. Neves, ref. 52, 2.224.
- 55) V.V. Bardin, Y.M. Kalmykov, V.N. Tostavosok e O.F. Shartuskov, *Isv. Vyssh. Ucheb. Zaved, Khim, Khimtekhnol.*, 14(10), 1946 (1971)
- 56) Orion Research, *Analytical Methods Guide* (Orion Research Inc., USA, 1973) 6a. Ed., p. 13.
- 57) F. Galembeck, "O sistema tetracarbonilferrato - zinco": equilíbrios em solução aquosa", Tese F.F.C.L. - USP, São Paulo (1970).
- 58) I.M. Kolthoff e P.J. Elving, *Treatise on Analytical Chemistry* (Interscience, New York, 1959), Part I, vol. 1, p. 242.
- 59) E. A. Burns e F.D. Chag, *J. Phys. Chem.*, 63, 1314 (1959).
- 60) W.S. Hughes, *J. Chem. Soc.*, 491 (1928).
- 61) A. Johansson, *Talanta*, 22, 945 (1975).
- 62) N.D. Jespersen e J. Jordan, *Anal. Lett.*, 3(6), 323 (1970).
- 63) A. W. Kenchington, ref. 19, p. 361.

- 64) A.W. Kenchington, ref. 19, p. 362
- 65) A.W. Kenchington, ref. 19, p. 366
- 66) I.M. Kolthoff, ref. 50, p. 562
- 67) E.A. Kabat e M.M. Mayer, Experimental Immunochemistry,
(C.C. Thomas, Springfield, Ill, 1961), 2a. Ed., cap. 27.
- 68) F. W. Dahlquist e M. A. Raftery, Biochem., 7, 3237 (1968).
- 69) K.C. Aune e C. Tanford, Biochem., 8, 4579 (1969).
- 71) Y. Nozaki e C. Tanford, ref. 22, p. 721.
- 72) R.A. Kekwick e R.K. Cannan, Biochem. J., 30, 227 (1936).
- 73) R.A. Kekwick e R.K. Cannan, Biochem. J., 30, 235 (1936).
- 74) H.H. Willard e G.F. Smith, J.Am. Chem. Soc., 44, 2816 (1922).
- 75) G. Shwarzenbach e H.A. Flaschka, Complexometric Titrations,
(Methuen & Co. Ltda., London, 1969), 2a. Ed., p. 234.
- 76) A.S. Brown, J. Am. Chem. Soc., 56, 646 (1934).