

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por Ivo Milton Raimundo Junior e aprovada pela comissão julgadora.

Campinas, 07 de agosto de 1989.

Oswaldo E.S. Godinho

Prof. Dr. Oswaldo E.S. Godinho

ESTUDO DO COMPORTAMENTO ÁCIDO-BASE
DE PROTEÍNAS NO SISTEMA DMSO-ÁGUA
TESE DE MESTRADO

Ivo Milton Raimundo Junior

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

Campinas

-1989-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"O bom senso é a coisa mais bem repartida deste mundo, porque cada um de nós pensa ser dele tão bem provido, que mesmo aqueles que são mais difíceis de se contentar com qualquer outra coisa não costumam desejar mais do que o que têm. Não é verossímil que todos se enganem; ao contrário, isto mostra que o poder de bem julgar e de distinguir o verdadeiro do falso, que é propriamente o que se chama de o bom senso ou a razão, é naturalmente igual em todos os homens; e, assim, a diversidade de nossas opiniões não resulta de serem umas mais razoáveis do que outras, mas somente de conduzirmos nossos pensamentos por diversas vias, e de não considerarmos as mesmas coisas."

R. Descartes

À ângela e américo, meus avós.

À gilda e ivo, meus pais.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Godinho, orientador e amigo, pela confiança em mim depositada e pelas "lições" de sabedoria e humildade.
- Aos Profs. Aleixo, Graciliano e Wilson, pelas sugestões.
- Ao Prof. Célio e às Profas. Inés e Carol, pelo incentivo.
- Ao pessoal do laboratório: Jarbas, Marco, Renato, Tuca, Jorge, Willian, Roberto, Volnei, Luca, Márcia, Helena e Zilda, pela amizade e convivência sempre alegre.
- Ao Jarbas e ao Boaventura, pela grande ajuda na construção do circuito eletrônico do derivador.
- Ao Zé Médico, pelas leituras em alemão.
- Ao Pin, pelo cuidado na "datilografia".
- Ao Marco e à Silvia, pela paciência na revisão do texto.
- Ao Célio e ao Paulo, pela ajuda na impressão.
- Ao Zuca, pela colaboração na montagem.
- Ao Laurindo, pelo capricho na reprodução e encadernação.
- Aos meus amigos...
- Ao CNPq, pela bolsa concedida no meu primeiro ano de mestrado.

RESUMO

ESTUDO DO COMPORTAMENTO ÁCIDO-BASE DE PROTEÍNAS NO SISTEMA DMSO-ÁGUA

autor: Ivo Milton Raimundo Junior

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

Neste trabalho foi estudado o comportamento ácido-base da lisozima e ovalbumina no sistema DMSO-água (7,0:0,8 ml) através de titulações termométrica catalítica (TTC) e potenciométrica.

Na TTC foi utilizada acrilonitrila (4,0 ml) como indicador termométrico, sendo determinados $23,6 \pm 0,7$ e $47,6 \pm 0,6$ grupos ácidos por mol de lisozima e ovalbumina, respectivamente. A comparação desses resultados com os obtidos por titulação potenciométrica das proteínas desnaturadas em uréia mostrou que os grupos guanidina ($pK_a = 12,5$ em água) são titulados no meio DMSO-água.

Na titulação potenciométrica foram utilizados eletrodos de alumínio ou vidro como indicadores e um fio de níquel-cromo imerso no titulante como referência. O eletrodo de alumínio não forneceu resultados satisfatórios nas titulações das proteínas, havendo indicações de adsorção destas na superfície do eletrodo. Com o emprego do eletrodo de vidro foram determinados $11,4 \pm 0,5$ e $52,3 \pm 1,5$ grupos ácidos e $22,7 \pm 0,8$ e $97,0 \pm 2,1$ grupos totais por mol de lisozima e ovalbumina, respectivamente. Esses resultados indicam que os grupos guanidina da lisozima são ácidos mais fracos que os da ovalbumina, pois são determinados apenas por TTC.

ABSTRACT

STUDY OF ACID-BASE BEHAVIOUR OF PROTEINS IN DMSO-WATER SYSTEM

author: IVO Milton Raimundo Junior

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

Acid-base behaviour of lysozyme and ovalbumin was studied in an DMSO-water (7,0 : 0,8 ml) system by catalytic thermometric titrimetry (CTT) and potentiometric titrimetry.

In CTT, where acrylonitrile (4,0 ml) was employed as a thermometric indicator, $23,6 \pm 0,7$ and $47,6 \pm 0,6$ acid groups per mol of lysozyme and ovalbumin were determined, respectively. Comparison of these results with those obtained by potentiometric titrations of proteins denaturated in urea showed that guanidine groups ($pK_a = 12,5$ in water) are titrated in the DMSO-water medium.

Both aluminum and glass were used as indicator electrodes in the potentiometric titrations. A nickel-chromium wire immersed in the titrant was used as reference electrode. The aluminum electrode did not provide satisfactory results in protein titrations, probably due to adsorption of proteins on the electrode surface. By employing the glass electrode, $11,4 \pm 0,5$ and $52,3 \pm 1,5$ acid groups, and $22,7 \pm 0,8$ and $97,0 \pm 2,1$ total groups per mol of lysozyme and ovalbumin were determined, respectively. These results show that the guanidine groups of lysozyme are weaker acids than those of ovalbumin, since they are determined only by CTT.

ÍNDICE

	página
Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iii
I. INTRODUÇÃO	01
II. VOLUMETRIA DE NEUTRALIZAÇÃO EM MEIO NÃO AQUOSO	05
II.1. Classificação dos solventes	05
II.2. Acidez em meio não aquoso: definição de pH	09
II.3. Equilíbrio ácido-base em meio não aquoso	15
II.4. Escolha do solvente e do titulante	20
II.5. A determinação do ponto final	24
III. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA	26
IV. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	35
V. O SISTEMA DMSO-ÁGUA	43
VI. EXPERIMENTAL	47
VI.1. Titulações Potenciométrica e Termométrica Catalítica	47
VI.1.1. Reagentes	47
VI.1.2. Aparelhagem	48
VI.1.3. Tratamento dos solventes	48
VI.1.4. Preparação das soluções padrão	49
VI.1.5. Procedimento	49
VI.1.5.1. Calibração da seringa	49
VI.1.5.2. Titulações	50

VI.2.	Construção do eletrodo de alumínio	52
VI.2.1.	Material	52
VI.2.2.	Esquema e descrição do eletrodo	53
VI.2.3.	Avaliação do eletrodo	54
VI.3.	Construção do derivador	54
VI.3.1.	Material	54
VI.3.2.	Esquema do aparelho	55
VII.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
VII.1.	Calibração da seringa	57
VII.2.	Titulações	58
VII.2.1.	Titulação termométrica catalítica	58
VII.2.2.	Titulação potenciométrica	67
VII.2.2.1.	O eletrodo de alumínio	67
VII.2.2.2.	A escolha do par de eletrodos	70
VII.2.2.3.	Titulação das proteínas	73
VIII.	CONCLUSÃO	83
IX.	BIBLIOGRAFIA	86

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
II.1. Titulação de uma mistura de ácidos em metil-isobutil-cetona	23
III.1. Curva típica de uma titulação catalítica	27
III.2. Esquema da aparelhagem utilizada nas titulações termométricas catalítica e convencional	30
IV.1. Curvas de titulações potenciométricas irregulares	40
IV.2. Titulação potenciométrica de ác.benzóico em piridina	41
VI.1. Esquema da aparelhagem utilizada nas titulações potenciométricas	50
VI.2. Esquema do eletrodo de alumínio	53
VI.3. Circuito eletrônico do derivador	56
VII.1. Localização do ponto final em TTC	61
VII.2. Curvas de TTC da lisozima	64
VII.3. Titulações de ácido benzóico com KOH. Eletrodos indicadores de vidro e alumínio	68
VII.4. 1ª derivada da curva de titulação de ácido benzóico. Eletrodo indicador de alumínio	68
VII.5. Forma da curva obtida na titulação de arginina com KOH em função do par de eletrodos utilizados	72
VII.6. Titulações potenciométricas de arginina. Eletrodos indicadores de vidro e alumínio	74
VII.7. Curvas de titulações potenciométricas de lisozima	76
VII.8. Curvas de titulações potenciométricas de ovalbumina	77

Figura	página
VII.9. 1ª derivada da curva de titulação potenciométrica de uma mistura de arginina e ácido clorídrico	80
VII.10. 1ª derivada das curvas de titulações potenciométricas de lisozima e ovalbumina em excesso de HCl	81

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
I.1. Ações farmacológicas do DMSO	04
II.1. Classificação dos solventes segundo Bronsted	06
II.2. Classificação dos solventes segundo Kolthoff	07
II.3. Propriedades de alguns solventes	09
II.4. Constantes de dissociação de ácidos em água, metanol e etanol	16
II.5. Constantes de dissociação de ácidos e bases em ácido acético glacial	17
II.6. Constantes de homoconjugação e de dissociação de ácidos em acetonitrila e DMSO	19
II.7. Constantes de associação em solventes inertes	20
IV.1. Estudo do par de eletrodos	39
VII.1. Massas de água obtidas na calibração da seringa	57
VII.2. Grupos ácidos titulados em arginina por TTC	62
VII.3. Grupos ácidos titulados em lisozima por TTC	63
VII.4. Grupos ácidos titulados em ovalbumina por TTC	66
VII.5. Grupos ácidos titulados potenciométricamente em arginina	74
VII.6. Grupos ácidos titulados potenciométricamente em lisozima e ovalbumina	75
VII.7. Grupos titulados potenciométricamente em arginina em excesso de ácido clorídrico	79
VII.8. Grupos totais titulados potenciométricamente em lisozima e ovalbumina	81

I. INTRODUÇÃO

O estudo de proteínas em meio aquoso é uma consequência natural do importante papel desempenhado pela água em sistemas biológicos. Todavia, existem indicações de que a água pode não ser um modelo ideal para as reações "in vivo", uma vez que sistemas biologicamente importantes tendem a ser lipofílicos¹. Associado a este fato, o emprego de solventes orgânicos com diferentes características (acidez, basicidade, constante dielétrica, viscosidade, transparência espectral, etc.) possibilita investigações no intuito de elucidar as estruturas e propriedades das proteínas².

As limitações desse estudo não esbarram somente na questão óbvia de solubilidade das proteínas nos solventes orgânicos mas também em certas condições necessárias para o uso dos mesmos. Neste sentido, os solventes devem ser estáveis e inertes quimicamente e suas impurezas, se houverem, não devem reagir com a proteína. Como esta possui grupos quimicamente reativos, apenas podem ser utilizados os solventes que, no máximo, promovam reações ácido-base envolvendo o átomo de hidrogênio².

A solubilidade de uma proteína não está diretamente relacionada com a constante dielétrica do solvente. Em outras palavras, o poder de ionização do solvente não exerce um papel fundamental neste processo^{2,3}. Como as proteínas são bastante solúveis em solventes ácidos (anfipróticos protogênicos) ou básicos (anfipróticos protofílicos), independentemente de suas constantes dielétricas, a formação de pares iônicos através de pontes de hidrogê-

nio parece ser o fator mais importante na solubilização².

A conformação* de uma proteína em solução depende das interações eletrostáticas entre grupos da macromolécula, pontes de hidrogênio entre grupos carboxílico e amino formadores das ligações peptídicas e das interações liofóbicas**². Em solução aquosa a proteína está na sua conformação nativa, na qual a cadeia polipeptídica está enrolada em um arranjo ordenado. A desnaturação da proteína consiste em desenrolar a cadeia sem romper as ligações peptídicas da macromolécula, resultando em um arranjo aleatório. A uréia e o cloreto de guanidina são agentes desnaturantes bastante utilizados⁶. Os solventes orgânicos também podem ser usados como tal, embora em alguns casos as proteínas possuam uma conformação mais ordenada que em água (por ex., em misturas de água com dioxano, 2-cloroetanol ou álcoois alifáticos simples)⁷. Na desnaturação a estrutura nativa é alterada devido ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos, ocasionado pelo solvente orgânico^{8,9}.

O dimetilssulfóxido (DMSO***) não é um agente desnaturante muito eficiente⁷, exercendo pouco efeito sobre a estabilidade das proteínas globulares quando misturado com água em pequenas proporções⁶. Entretanto, o DMSO é capaz de causar uma mudança rever-

(*) conformação é um termo geral que envolve as estruturas secundária, terciária e quaternária (se houver) da proteína⁴. Uma exposição bastante clara e sucinta sobre as estruturas das proteínas foi feita por Silva⁵.

(**) generalizando o termo interações hidrofóbicas

(***) embora a abreviação recomendada pela IUPAC seja Me₂SO.

sível na conformação da proteína, devido à substituição das moléculas de água que solvavam a macromolécula¹⁰.

O uso de DMSO no estudo de sistemas biológicos vem aumentando desde a descoberta, na década de 60, de suas propriedades farmacológicas e medicinais. Essa aplicação na medicina foi iniciada devido à descoberta de que o DMSO penetra muito facilmente na casca de árvores, espalhando-se totalmente no sistema vascular¹¹. A sua importância na medicina é tamanha que três simpósios foram promovidos pela Academia de Ciências de Nova Iorque sobre suas ações biológicas^{12,13,14}. O DMSO pode ser usado como analgésico, anti-inflamatório, radioprotetor, crioprotetor, etc, além de possuir um alto poder de penetração em membranas (como a pele), possibilitando o transporte de substâncias de baixo peso molecular através das mesmas¹⁵. A tabela I.1 sumariza algumas das aplicações farmacológicas do DMSO¹⁶.

As titulações de proteínas e aminoácidos têm sido muito pouco estudadas em meio não aquoso ou parcialmente aquoso^{1,17-23}. Quando um meio diferente da água é utilizado, a escala de pH e as constantes de dissociação dos ácidos e bases dependem do solvente²⁴. Isto quer dizer que nenhuma correlação pode ser feita com a água. Este problema é resolvido através da definição de uma escala arbitrária de pH no solvente empregado, a partir da qual são determinadas as constantes de dissociação dos ácidos e bases²⁴.

No presente trabalho foi estudado o comportamento ácido-base da lisozima e ovalbumina no sistema DMSO-água (7,0:0,8 ml). A determinação dos grupos ácidos e básicos dessas proteínas foi feita através de titulações termométrica catalítica e potenciométrica.

Tabela I.1. Ações farmacológicas do DMSO¹⁶.

analgésico	alivia dor e edema
anti-inflamatório	efeito demonstrado no edema, movimentação leucocitária, dermatite e outras
efeito bacteriostático	efeito em várias bactérias causando alterações de proteína e RNA
efeito no sistema nervoso central	sedativo; efeitos anti-psicótico e contra ansiedade
sistema nervoso	aumenta o efeito estimulatório do nervo vago
efeito cardiovascular	útil na proteção tecidual contra isquemia, sem efeitos adversos agudos hemodinâmicos
vasodilatação	causa vasodilatação e aumenta absorção de outras drogas
interação com drogas	interage pouco com drogas comuns
veículo para drogas tópicas	aumenta penetração na pele de agentes anti-virais

Os resultados foram comparados com os obtidos através de titulação potenciométrica das proteínas desnaturadas em soluções aquosas de uréia⁵, mostrando a possibilidade de se titular ácidos muito fracos no meio empregado. Complementando o trabalho, foi verificada a viabilidade de se utilizar eletrodos metálicos como indicador (alumínio) e/ou referência (níquel-cromo) nas titulações em meio não aquoso, comparando os seus desempenhos com os eletrodos convencionais (vidro, Ag/AgCl, calomelano).

II. VOLUMETRIA DE NEUTRALIZAÇÃO EM MEIO NÃO AQUOSO

II.1. Classificação dos solventes

Os solventes orgânicos têm sido classificados segundo vários critérios. Snyder²⁵ classificou-os baseado na força cromatográfica (polaridade) e seletividade (capacidade em fazer pontes de hidrogênio e ter interações dipolos); Gutmann²⁶ ordenou-os de acordo com a donicidade (entalpia molar da reação do solvente doador com um aceptor de referência, $SbCl_5$, numa solução 10^{-3} M em dicloroetano); Bronsted²⁷ baseou-se na acidez, basicidade e constante dielétrica e Kolthoff²⁸ utilizou-se da constante de autoprotólise dos solventes.

Tais classificações, apesar de arbitrárias, são importantes, pois proporcionam uma organização dos solventes segundo os critérios de interesse de cada área, facilitando a discussão e explicação dos resultados. Como este trabalho envolve volumetria de neutralização, interessam aqui as classificações propostas por Bronsted e Kolthoff.

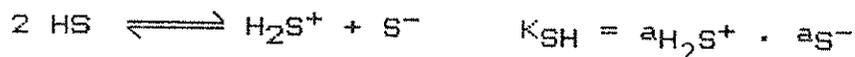
Bronsted²⁷, como dito acima, baseou-se na constante dielétrica, na acidez e na basicidade dos solventes. Atribuindo-lhes sinal positivo quando essas propriedades fossem significativas, dividiu-os em oito grupos distintos como mostra a tabela II.1. Bronsted citou somente a água e o benzeno como exemplos e os outros foram completados por Popovych e Tomkins²⁹, que também adicionaram os "termos modernos" encontrados na tabela.

Tabela II.1 . Classificação dos solventes segundo Bronsted²⁹.

classe	acidez	basicidade	ϵ	termo moderno	exemplos
1	+	+	+	anfiprótico neutro	H ₂ O, CH ₃ OH
2	+	+	-	protogênico	H ₂ SO ₄ , HF, HCOOH
3	+	-	+	protofilico	n-metil-propionamida tetrametiluréia
4	+	-	-	aprótico dipolar	acetonitrila, acetona
5	-	+	+	anfiprótico neutro	álcoois
6	-	+	-	protogênico	ácido acético
7	-	-	+	protofilico	maioria aminas
8	-	-	-	inerte	benzeno, alcanos

Cabe lembrar que Bronsted tomou a água como referência para classificar um solvente como ácido ou básico e que Popovych e Tomkins atribuíram positivo para os solventes com constante dielétrica acima de 15 a 30, embora Bates³⁰ recomende somente acima de 30.

Kolthoff²⁸ dividiu os solventes em duas grandes classes, baseando-se nas constantes de autoprotólise. Chamou de solvente anfiprótico aquele que, como a água, exerce o papel de ácido ou base, possuindo uma constante de autoprotólise mensurável, que pode ser escrita da seguinte forma:



onde HS é o solvente anfiprótico, H_2S^+ o íon "lyonium", S^- o íon "lyate" e K_{SH} a constante de autoprotólise, definida como o produto das atividades dos íons produzidos pelo solvente. Evidentemente classificou como aprótico o solvente que não possuía essa constante mensurável.

A tabela II.2 mostra a classificação proposta por Kolthoff.

Tabela II.2. Classificação dos solventes segundo Kolthoff²⁸.

classe	sub-classe	características	exemplos
anfiprótico	(1)	força ácido-base semelhante à da água, com constante dielétrica diferente	água, álcoois, glicóis, fenóis
	(2)	protogênico	H_2SO_4 , HF, $HCOOH$, CH_3COOH
	(3)	protofilico	en*, TMG*, NH_3 , DMSO*
aprótico	(1)	inerte	hidrocarbonetos alifáticos, $CHCl_3$, CCl_4
	(2)	protofóbico	acetonitrila, cetonas, nitrometano
	(3)	protofilico	DMF*, DMSO, Py*

(*) en = etilenodiamina; DMSO = dimetilssulfóxido; TMG = tetrametilguanidina; DMF = dimetilformamida; Py = piridina

Kolthoff, apesar de reconhecer que os fenóis são mais ácidos que a água, colocou-os no mesmo grupo desta. Tampouco utilizou critérios rigorosos para definir solvente aprótico e, portanto, classificou o DMSO em dois grupos.

Sob o caráter aprótico dos solventes é importante salientar

que traços de impurezas, principalmente dióxido de carbono e água, alteram significativamente o valor de K_{SH} . Por exemplo, foi determinado experimentalmente o K_{SH} para a acetonitrila ($pK_{SH} = 32,2$) e a dimetilformamida ($pK_{SH} = 21$), solventes reconhecidamente apróticos. Bates³⁰, tentando contornar o problema, classificou como aprótico todo o solvente com pK_{SH} maior que 20 e entende que os valores de pK_{SH} para acetonitrila, DMF, DMSO e outros representam apenas um valor mínimo. Dessa forma, etanol é anfiprótico ($pK_{SH} = 19,1$) e são apróticos DMF, iso-propanol ($pK_{SH} = 20,8$) e até mesmo amônia ($pK_{SH} = 32,7$; $-33^{\circ}C$).

Por outro lado, Kolthoff³¹ propôs que se chamasse de anfiprótico o solvente que possuísse o íon "lyate" estável, justificando, assim, a classificação proposta em artigo anterior²⁸. Então, o DMSO e a amônia podem ser classificados como anfipróticos.

Outro ponto a comentar sobre essas classificações é a designação de protofílico ao solvente básico com acidez desprezível e de protofóbico ao solvente com características inversas. A água, como dito anteriormente, é sempre a referência para essas designações e Kolthoff chamou também de protogênicos os solventes conhecidos como ácidos em solução aquosa.

Como se pode notar a classificação dos solventes não exprime uma regra absoluta, possuindo limites pouco definidos. Tais classificações também não podem explicar todo equilíbrio ácido-base em meio não aquoso, uma vez que não só a acidez, a basicidade, as constantes dielétrica e de autoprotólise dos solventes, mas também as forças de interação (dipolo, dispersão) e de pontes de hidrogênio entre solvente e soluto exercem um papel importante.

A tabela II.3 mostra os solventes mais comuns e suas respectivas propriedades.

Tabela II.3. Propriedades de alguns solventes a 25 °C³².

solvente	pK _{SH}	ε	A ^a	Bx10 ⁻¹⁰ a
água	13,9	78,54	0,5093	0,3286
metanol	16,9	32,63	1,902	0,5099
etanol	19,1	24,55	2,914	0,5878
iso-propanol	20,8	19,2	4,21	0,665
ácido fórmico	6,2	58,5	0,792	0,381
ácido acético	14,5	6,13	23,35	1,176
N-metilformamida	10,7	182,4	0,144	0,216
dimetilformamida	21	36,71	1,594	0,481
etilenodiamina	15,3 ^b	14,2	6,62	0,773
amônia	32,7 ^c	22,4	3,34	0,615
piridina	-----	12,4	8,12	0,827
dimetilsulfóxido	33,3	46,68	1,111	0,426
acetonitrila	32,2	36,2	1,63	0,484
anidrido acético	14,5	20,7	3,76	0,640
nitrometano	-----	35,87	1,650	0,486
acetona	21,1 ^d	20,7	3,76	0,640
metiletilcetona	25,7	18,51	4,45	0,677
metilisobutylcetona	-----	12,92	7,63	0,810
dioxano	21,4 ^e	2,21	-----	-----
benzeno	-----	2,27	-----	-----
tolueno	-----	2,38	-----	-----
n-hexano	-----	1,9	-----	-----

- a) constantes da equação de Debye-Huckel
 $A = 1,825 \times 10^6 / (\epsilon \cdot T)^{3/2}$ $\text{dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$
 $B = 5,029 \times 10^{11} / (\epsilon \cdot T)^{1/2}$ $\text{dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2} \cdot \text{m}^{-1}$
- b) 20°C
c) -33°C
d) valor calculado
e) valor muito baixo

II.2. Acidez em meio não aquoso: definição de pH

A escala de acidez mais conveniente e mais usada é a escala de pH. Seria, portanto, de extrema utilidade que fosse definida uma escala de pH universal, independente do solvente e tendo como referência a escala aquosa, por ser a mais conhecida.

A obtenção dessa escala universal esbarra no problema termodinâmico de definição de um estado padrão, uma vez que ele é arbitrário. Por exemplo, o potencial químico de uma espécie i em um meio qualquer (aquoso ou não) pode ser escrito como:

$$\mu_i = \mu_i^{\circ} + RT \cdot \ln a_i = \mu_i^{\circ} + RT \cdot \ln(m_i \cdot \gamma_i)$$

Se for tomado como estado padrão o potencial químico da espécie i , à $a_i = 1$, e assinalando w e s para evidenciar, respectivamente, os estados aquoso e não-aquoso, tem-se que³⁰:

$$\mu_i^{\circ}(s) = \mu_i^{\circ}(w) + RT \cdot \ln \frac{\gamma_i(w)}{\gamma_i(s)} = \mu_i^{\circ}(w) + RT \cdot \ln m\gamma_i$$

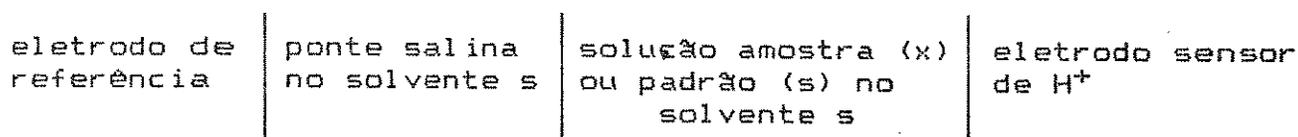
O termo $m\gamma_i$ é chamado de efeito do meio e é uma medida do trabalho de se transferir 1 mol da espécie i do estado padrão em água para o estado padrão no solvente s . O efeito do meio reflete a diferença de potencial químico da espécie i em dois solventes devido à variação de constante dielétrica, solvatação e outras interações específicas.

Então, se é conhecido o efeito do meio para o próton, $m\gamma_H$, pode-se definir a escala de pH universal baseada na água³³:

$$pH(s,w) = -\log (m\gamma_H \cdot m_H)$$

Infelizmente, o efeito do meio para um íon isolado não tem significado termodinâmico e sua medida por vários autores³⁴ não leva a resultados convergentes, muito embora tentativas sejam fei-

tas para se obter valores confiáveis³⁵. Portanto, resta apenas definir uma escala para cada solvente e, nesse sentido, a IUPAC³³ sugere certos critérios para padronização de medidas de pH em solventes orgânicos. Esses critérios seguem o mesmo rigor da definição de pH em água³⁶ e, analogamente, define-se uma escala operacional de pH baseada na cela:

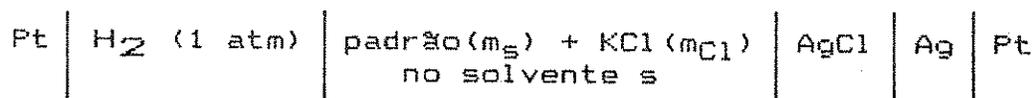


Se os potenciais de junção líquida entre a ponte salina e solução de amostra ou padrão forem idênticos, pode-se escrever:

$$\text{pH}(x) = \text{pH}(s) + \frac{E(s) - E(x)}{(RT/F) \ln 10}$$

onde $E(s)$ é o potencial da cela com solução padrão no solvente s com determinado $\text{pH}(s)$ e $E(x)$ é o potencial da cela com solução da amostra cujo $\text{pH}(x)$ se deseja determinar.

Para se determinar o $\text{pH}(s)$ da solução padrão segue-se, basicamente, o mesmo procedimento efetuado para água. Através da medida do potencial da cela sem junção líquida:



onde o padrão é uma solução tampão (hidrogenoftalato de potássio, acetato, fosfato, etc.), tem-se que:

$$p(a_H \cdot Y_{Cl}) = \frac{(E - E^0)}{(RT/F) \ln 10} - p_{mCl} = p_{aH} + p_{YCl}$$

Determinando-se pY_{Cl} , o coeficiente de atividade do íon Cl^- , através da equação de Debye-Huckel:

$$pY_{Cl} = A \cdot I^{1/2} / (1 + a_0 \cdot B \cdot I^{1/2})$$

e extrapolando-se para $m_{Cl} = 0$, após várias medidas do potencial da cela em diferentes concentrações de KCl, obtém-se o p_{aH} da solução padrão no solvente desejado.

Seguindo-se esses critérios para medidas de pH em meio não aquoso deve-se notar que os fatores A e B da equação de Debye-Huckel variam com o solvente (valores são encontrados na tabela II.3), assim como o parâmetro relativo ao tamanho do íon, a_0 , que deve ser corrigido³³. Esta definição é válida para solventes orgânicos e suas misturas com água com constante dielétrica acima de 30, valor mínimo acima do qual não ocorre associação de íons.

Nestas condições, a escala de pH obtida para um solvente de interesse não se relaciona com a de outro. Por exemplo, uma solução aquosa neutra tem pH igual a 7,0 enquanto que a etanólica tem pH 9,5.

Várias soluções padrão são indicadas para calibração de eletrodos, principalmente em misturas de água com metanol, etanol, dioxano e DMSO³³. Todavia, também são encontradas na literatura soluções padrão em acetona, metil-isobutil-cetona, nitrometano e outros solventes³⁷.

Antes, porém, desses critérios serem recomendados pela IUPAC duas outras escalas haviam sido propostas e como são de boa aplicação em sistemas não aquosos convém citá-las aqui.

A primeira foi inicialmente definida para ser utilizada em soluções ácidas concentradas e proposta por Hammett e Deyrup³⁸. Esta escala é baseada em indicadores ácido-base não carregados na forma alcalina, cujo equilíbrio num meio com determinada acidez pode ser descrito pela equação:



A constante do ácido HIn pode ser reordenada para:

$$pK_{\text{HIn}^+} = p_{\text{aH}} - \log \frac{m_{\text{In}}}{m_{\text{HIn}^+}} - \log \frac{\gamma_{\text{In}}}{\gamma_{\text{HIn}^+}}$$

A função ácida de Hammett*, H_0 , é definida como:

$$H_0 = pK_{\text{HIn}^+} + \log \frac{m_{\text{In}}}{m_{\text{HIn}^+}} = p_{\text{aH}} - \log \frac{\gamma_{\text{In}}}{\gamma_{\text{HIn}^+}}$$

onde o pK é medido em água e a razão das concentrações $m_{\text{In}}/m_{\text{HIn}^+}$ é medida espectrofotometricamente. É claro que em soluções aquosas diluídas H_0 torna-se igual a p_{aH} pois os coeficientes de atividade das espécies tornam-se unitários.

A outra escala foi proposta por Bates e colaboradores³⁹ e é, na verdade, uma escala operacional de pH. Apesar das medidas de pH em meio não aquoso envolverem um potencial de junção líquida

(*) é chamada de H_0 , pois está baseada em indicador sem carga. Existem, analogamente, funções H_- e H_+ baseadas em indicadores cuja forma não protonada tenham cargas negativa e positiva, respectivamente.

com valor elevado entre o meio e o eletrodo de referência preenchido com solução aquosa, ele permanece constante em ampla faixa de pH, se a composição do meio permanecer constante. Através de medidas de $p(a_H \cdot \gamma_{Cl})$ em celas sem junção líquida (como a citada anteriormente) e medidas de pH usando o par eletrodo de vidro-eletrodo de calomelano calibrados com solução tampão aquosa, foi possível obter valores de δ para um meio determinado e constante. Este parâmetro δ , proveniente da diferença de $pH - p(a_H \cdot \gamma_{Cl})$, envolve tanto o potencial de junção líquida citado como o efeito do meio para o próton, $m\gamma_H$.

Uma vez determinado o valor do parâmetro δ para o meio desejado, as medidas de pH podem ser feitas após a calibração dos eletrodos de vidro e calomelano em um tampão aquoso. O valor de pH lido no potenciômetro é, então, relacionado com a escala de pH do meio não aquoso através da equação:

$$p a_H^* = pH - \delta$$

Valores de δ podem ser encontrados na literatura, principalmente para misturas de água com metanol ou etanol³⁹.

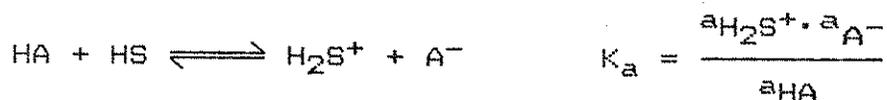
Como se pode ver, medidas de pH em meio não aquoso envolvem certos cuidados, decorrentes principalmente da incapacidade de se medir o efeito do meio para um íon isolado. Nunca se deve esquecer que ao se alterar o solvente as atividades dos íons mudam, assim como os potenciais de eletrodo. Por exemplo, o potencial padrão, E^0 , do eletrodo Ag/AgCl é 0,22234 V a 25 °C em água enquanto que em metanol anidro é -1,0101 V na mesma temperatura⁴⁰.

Outro ponto importante é que a medida de pH envolve maiores complicações em solventes com constante dielétrica abaixo de 30 devido à formação de pares iônicos.

II.3. Equilíbrio ácido-base em meio não aquoso

Para se tratar de equilíbrio ácido-base em meio não aquoso ou parcialmente aquoso deve-se considerar duas características fundamentais dos solventes: a constante de autoprotólise e a constante dielétrica. A constante de autoprotólise reflete o comportamento anfiprótico ou aprótico do solvente e a constante dielétrica reflete a sua capacidade de separar as cargas, isto é, de evitar a formação de pares entre íons de cargas opostas. Desta forma, os solventes podem ser divididos em quatro classes distintas com o intuito de facilitar esta discussão.

A primeira classe, os solventes anfipróticos polares*, tem comportamento similar ao da água e inclui metanol, ácido fórmico, misturas água-álcoois, etc.. Quando um ácido HA é dissolvido num solvente anfiprótico polar HS, ocorre a seguinte reação de equilíbrio:



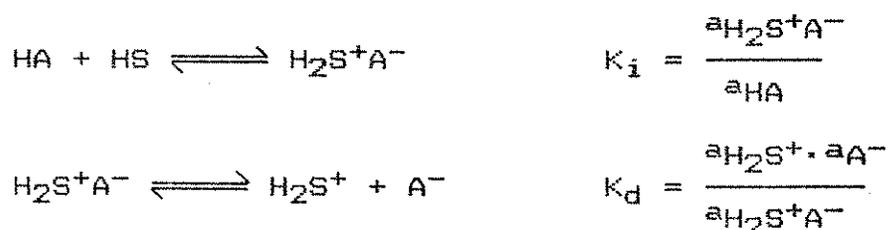
(*) embora não seja correto é comum se chamar de polar o solvente com alta constante dielétrica; no caso maior que 30-40.

onde H_2S^+ é o próton solvatado. O tratamento formal de equilíbrio dado à esta classe de solventes é semelhante ao dado à água, sendo que nenhuma complicação adicional existe. A tabela II.4 mostra as constantes de dissociação de alguns ácidos em água, metanol e etanol⁴¹.

Tabela II.4. Constantes de dissociação de ácidos em solventes anfipróticos polares⁴¹.

ácido	$pK_a(H_2O)$	$pK_a(MeOH)$	$pK_a(EtOH)$
acético	4,75	9,7	10,4
benzóico	4,20	9,4	10,13
fenol	9,97	14,2	15,3
anilônio	4,60	6,0	5,70
p-toluidínio	5,09	6,0	6,24

A segunda classe compreende os solventes anfipróticos apolares, cujo exemplo típico é o ácido acético glacial. A primeira contribuição significativa sobre equilíbrio em solventes anfipróticos apolares foi dada por Kolthoff e Bruckenstein⁴² através de estudos em ácido acético glacial. Um ácido HA, quando dissolvido nesse tipo de solvente, ioniza-se e dissocia-se segundo as equações:



onde K_i é a constante de ionização do ácido HA e K_d a sua constante de dissociação. A constante de dissociação total do ácido pode ser escrita como:

$$K_a = \frac{{}^a\text{H}_2\text{S}^+ \cdot {}^a\text{A}^-}{{}^a\text{HA} + {}^a\text{H}_2\text{S}^+\text{A}^-} = \frac{K_i \times K_d}{1 + K_i}$$

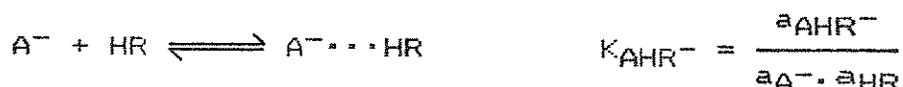
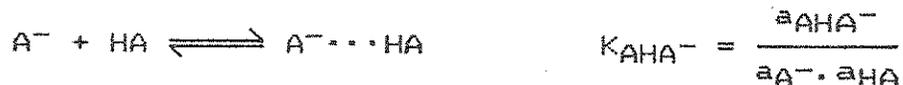
Como em solvente anfiprótico com baixa constante dielétrica a formação do par iônico é inevitável, a constante de ionização é quem expressa exatamente a força do ácido ou da base e não a sua constante de dissociação total. Em termos gerais, a ionização é função da acidez/basicidade do solvente e a dissociação é função da constante dielétrica. Em solventes com constante dielétrica maior que 30-40, a formação do par iônico é desprezível e o tratamento é feito como em água. A tabela II.5 mostra as constantes de dissociação total de alguns ácidos e bases em ácido acético glacial⁴³.

Tabela II.5. Constantes de dissociação total de ácidos e bases em ácido acético glacial (a 25 °C)⁴³.

ácido	pK _a	base	pK _b
perclórico	4,87	tribenzilamina	5,38
sulfúrico (K ₁)	7,24	N,N-dietilanilina	5,78
p-toluenossulfônico	8,44	piridina	6,10
clorídrico	8,55	2,5-dicloroanilina	9,48

A terceira classe de solventes é a que inclui os polares apróticos, que são mais conhecidos como dipolares apróticos. São relativamente inertes e podem ser subdivididos, segundo Kolthoff, em protofílicos e protofóbicos (tabela II.2). Os protofílicos (DMSO, DMF, Py) solvatam cátions (inclusive o próton) e podem aceitar pontes de hidrogênio. Os protofóbicos (acetonitrila, nitrometano, etc.) têm pouca capacidade para solvatar cátions e formar pontes de hidrogênio. Como os solventes dipolares apróti-

cos não têm hidrogênio apto para formar ponte, eles solvatam ânions muito fracamente. Então, um ânion A^- em um meio dipolar aprótico se associará a seu ácido conjugado, HA, ou a um outro ácido, HR:

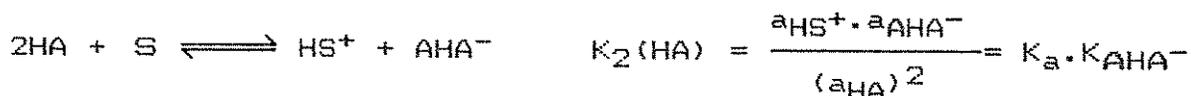


Essas reações foram chamadas por Kolthoff⁴⁴ de homoconjugação (formação de AHA^-) e heteroconjugação (formação de AHR^-). As constantes de formação de homo e heteroconjugados são muito maiores em solventes protofóbicos³¹, porque os solventes protofilicos solvatam melhor os ácidos HA ou HR através de pontes de hidrogênio. Na verdade, existe a competição:



onde S é o solvente, que determina a extensão da reação de homo e heteroconjugação.

Então, a reação de dissociação de um ácido HA em um meio dipolar aprótico pode ser escrita como:



onde K_a é a constante de dissociação do ácido. A tabela II.6 relaciona as constantes de homoconjugação e de dissociação de al-

guns ácidos em solventes protofóbico e protofilico⁴⁵.

Tabela II.6. Constantes de homoconjugação e de dissociação de ácidos em acetonitrila e DMSO⁴⁵.

ácido	acetonitrila		DMSO	
	K _{HA}	pK _a	K _{HA}	pK _a
acético	4.700	22,3	30	12,6
benzóico	4.000	20,7	60	11,1
salicílico	2.000	16,7	30	6,8

A quarta e última classe de solventes é dos apróticos apolares, comumente chamados de inertes. Nesta classe estão incluídos o benzeno, tolueno, n-hexano, tetracloreto de carbono, etc.. Eles têm baixa constante dielétrica (normalmente menor que 10) e não exercem nenhum papel em reações de neutralização. O ácido e/ou a base mantém a sua força intrínseca e os limites de acidez/basicidade não são definidos como nos solventes anfipróticos. Os primeiros estudos de equilíbrio nesse tipo de solvente foram feitos por LaMer e Downes⁴⁶ e, posteriormente, amplamente discutidos por Davis⁴⁷. A reação entre um ácido HA e uma base B se processa sem a participação do solvente e pode ser escrita como:



onde K_{ass} é a constante de associação ou constante de formação do sal. A natureza do "sal" formado depende das forças do ácido e/ou da base, podendo formar apenas um complexo através de ponte de hidrogênio (B...HA) ou um par iônico (BH⁺...A⁻). Na tabela II.7

estão relacionadas as constantes de associação ácido-base em alguns solventes inertes⁴⁷.

Tabela II.7. Constantes de associação em solventes inertes⁴⁷.

ácido	base	solvente	temp. (°C)	log K_{ass}
benzóico	DPG*	benzeno	25	5,26
acético	DPG	benzeno	25	4,45
fenol	Py	benzeno	25	1,26
fenol	Py	n-heptano	25	1,90
fenol	Py	CCl ₄	20	1,77
fenol	Py	CCl ₄	27	1,67
fenol	anilina	CCl ₄	27	0,60

(*) DPG = difenilguanidina.

O tratamento de equilíbrio em meio não aquoso, como pode ser notado, não é tão simples como em água e, portanto, muitos cuidados devem ser tomados. Apresentou-se neste tópico apenas o suficiente para que se fosse alertado quanto a esses cuidados. Um tratamento mais profundo sobre esses equilíbrios e como eles influenciam as formas das curvas de titulações fogem do interesse principal desta tese, mas podem ser encontrados facilmente na literatura⁴⁸⁻⁵².

Um tratamento análogo ao aqui dado para os ácidos pode ser desenvolvido para as bases e por isso não foi apresentado neste tópico.

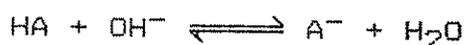
II.4. Escolha do solvente e do titulante

A titulação em solventes orgânicos aplica-se aos problemas que não podem ser resolvidos em água. Compostos insolúveis e áci-

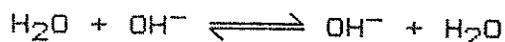
dos ou bases muito fracos em água podem ser facilmente titulados em meio não aquoso se o solvente for escolhido corretamente.

Para ser usado em titulação, um solvente deve solubilizar tanto a amostra como o produto da reação (se o produto for insolúvel, deve ser cristalino), não deve reagir lateralmente com a amostra e/ou titulante, deve possibilitar a detecção do ponto final da titulação e deve ser facilmente purificado. A pureza dos solventes orgânicos é um fator crítico pois o mesmo solvente pode ter diferentes impurezas dependendo do lote ou do fabricante. Vários métodos de purificação de solventes podem ser encontrados na literatura^{49,50,52,53}.

Na titulação de uma amostra de um ácido muito fraco ($pK_a > 10$ em água; fenol, por exemplo), com uma base forte em meio aquoso, além da reação de neutralização:



haverá também uma reação competitiva da água, um ácido fraco, pelo titulante:



e o ponto final da titulação será de difícil detecção (por exemplo, não será detectado potenciométricamente). Entretanto, se for utilizado um solvente com basicidade maior que a da água, a força ácida do fenol será aumentada e sua titulação possível. Da mesma forma, esse ácido pode ser titulado em um solvente aprótico,

pois o ácido manterá a sua força intrínseca . Na verdade, fenol e seus derivados são facilmente titulados em etilenodiamina (anfiprótico protofilico), acetona, piridina, acetonitrila e dimetilformamida (apróticos)^{20,54}.

Analogamente, pode-se titular uma base que seja muito fraca em água (anilina, por exemplo) utilizando um solvente anfiprótico protogênico ou um solvente aprótico. Anilina pode ser titulada em ácido acético glacial (onde sua basicidade é acentuada), benzeno, clorofórmio, acetonitrila (onde mantém sua força intrínseca)⁵⁵.

Por outro lado, se for desejado determinar a quantidade de ácido clorídrico e ácido perclórico presentes em uma amostra, não se pode fazê-lo em água. Neste solvente, ambos os ácidos são fortes pois a água é uma base suficientemente forte e é capaz de nivelar a força desses ácidos. Entretanto, o ácido perclórico é mais forte que o clorídrico em ácido acético glacial, isto é, a força dos ácidos é diferenciada neste solvente. Esta diferenciação também ocorre em solventes apróticos, pois os ácidos mantêm as suas forças intrínsecas. Um exemplo típico, mostrado na figura II.1, é a titulação de vários ácidos em metil-isobutil-cetona⁵⁶.

Como regra geral, tem-se que para a titulação de ácidos fracos, um solvente com características básicas deve ser usado e para bases fracas, um solvente com características ácidas (respectivamente, anfipróticos protofilico e protogênico segundo a classificação de Kolthoff - tabela II.2). Os solventes apróticos têm uso indiscriminado pois mantêm a força intrínseca dos ácidos e/ou bases (diferenciação), podendo também ser usados em misturas com os anfipróticos. Entretanto, os apróticos protofilicos favorecem

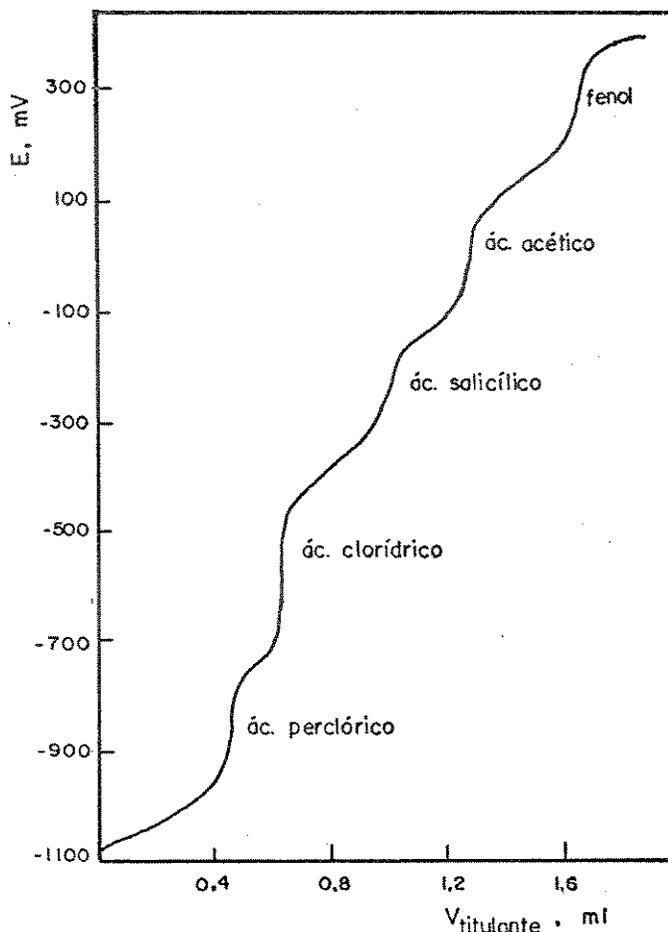


Figura II.1 - Titulação de uma mistura de ácidos em metil-isobutil cetona. Titulante: hidróxido de tetrabutilamônio $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ em isopropanol. Eletrodos de vidro e platina (no titulante)⁵⁶.

a titulação de ácidos fracos, enquanto os apróticos protofóbicos a titulação de bases fracas³¹.

Embora possam ser traçadas certas regras para escolha do solvente, o mesmo não ocorre para o titulante. A escolha deste está condicionada à força (por exemplo, ácido clorídrico não é forte em ácido acético glacial), solubilidade e estabilidade do ácido ou base no solvente a ser utilizado. Para a titulação de

bases frequentemente são empregados os ácidos perclórico, clorídrico ou p-toluenossulfônico. Os titulantes básicos mais comuns são hidróxido de metal alcalino (normalmente hidróxido de potássio) em álcoois*, alcoóxidos** de metal alcalino (potássio) e hidróxido de tetraalquilamônio**. A preparação desses titulantes em diversos solventes e as respectivas padronizações podem ser encontrados na literatura^{50,52}.

Para se obter resultados satisfatórios nas titulações em meio não aquoso é também necessário que seja escolhido adequadamente o par solvente-titulante. Neste sentido, Heijde⁵⁷ elaborou algumas tabelas que podem ajudar nessa escolha, pelo menos para os solventes e titulantes mais usuais.

II.5. A determinação do ponto final

O ponto final de uma titulação em meio não aquoso pode ser determinado pelos mesmos métodos utilizados em meio aquoso, tais como visual, condutométrico, potenciométrico, espectrofotométrico, termométrico convencional e catalítico, etc..

O uso de indicadores visuais fornece uma maneira prática, simples, barata e eficiente para se determinar o ponto final de uma titulação. Entretanto, certos cuidados devem ser tomados uma vez que o mesmo indicador pode apresentar diferentes cores em

(*) metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, etc.

(**) tetrametil, tetraetil e tetrabutyl são os mais usuais.

função do solvente e da pureza deste. A utilidade do indicador em um determinado solvente deve ser comprovada através da comparação da sua cor de viragem com a curva de titulação potenciométrica. Podem ser utilizados, entre outros, azo violeta, fenolftaleína, azul de timol e timolftaleína na titulação de ácidos e violeta de cristal, alaranjado de metila e vermelho de metila na titulação de bases. A escolha do indicador depende do composto a ser titulado e, principalmente, do solvente a ser utilizado. Gyenes⁵⁸ apresenta algumas tabelas que podem ser úteis nessa escolha.

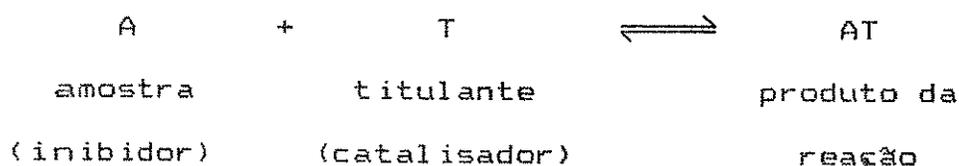
Obviamente certas complicações também aparecem quando se pretende acompanhar o curso de uma titulação através dos métodos físico-químicos anteriormente citados. Nos capítulos posteriores serão apresentados certos detalhes apenas das titulações potenciométrica e termométrica catalítica, uma vez que essas técnicas são objetos de interesse desta tese.

III. TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

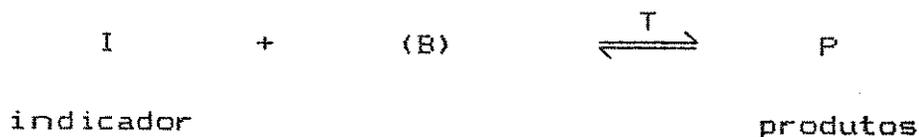
A titulação termométrica catalítica (TTC) teve início em 1965 com o trabalho publicado por Vaughan e Swithenbank⁵⁹. Embora tenha sido tratada como uma variação da titulação termométrica convencional, a TTC é agora classificada como um ramo das titulações catalíticas que, por sua vez, têm merecido especial atenção a partir de 1980 nas revisões bienais sobre "Determinações cinéticas e alguns aspectos cinéticos da química analítica" publicadas na revista Analytical Chemistry⁶⁰⁻⁶⁴.

As titulações catalíticas podem ser explicadas com base nas seguintes reações^{65,66}:

a. reação determinativa:



b. reação indicativa:



Na reação determinativa o titulante reage estequiometricamente com a amostra, que é um inibidor da reação indicativa. Após

a reação determinativa ter sido completada, o excesso de titulante catalisa a reação indicativa, que é utilizada para se determinar o ponto final da titulação. A figura III.1 mostra uma curva típica das titulações catalíticas.

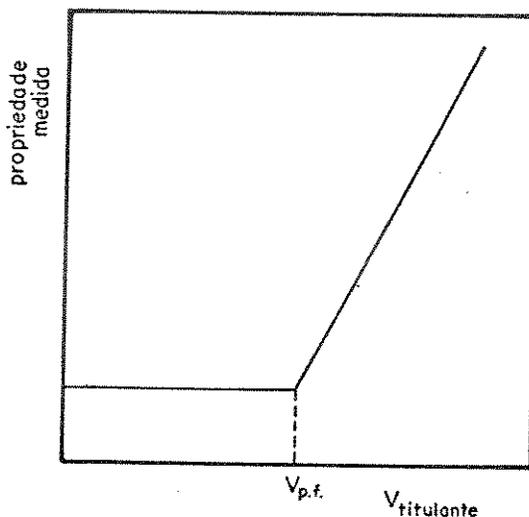


Figura III.1. Curva típica ideal de uma titulação catalítica.

Como se pode notar a propriedade medida permanece constante (ou praticamente constante) até o ponto final da titulação, variando bruscamente a partir deste ponto.

As titulações catalíticas podem ser aplicadas às volumetrias de neutralização, complexação, precipitação e oxi-redução e a determinação do ponto final pode ser feita visual, fotométrica, potenciométrica, amperométrica, biamperométrica, condutométrica, fluorimétrica e termometricamente. Gaal⁶⁵ e Pantel e Weisz⁶⁶ publicaram bons artigos de revisão sobre as titulações catalíticas, cobrindo aspectos teóricos e experimentais do método e apresentando também suas aplicações e limitações.

O primeiro trabalho sobre titulação catalítica foi publicado por Erdey e Buzas em 1960⁶⁷, que utilizaram as reações de lucigenina/H₂O₂ ou luminol/H₂O₂ como indicativas do ponto final na determinação de EDTA com solução padrão de Cu²⁺. A detecção foi feita visualmente devido a quimioluminescência do luminol na presença de Cu²⁺ e da lucigenina na ausência de Cu²⁺. Esses autores não mencionaram o fato de terem utilizado um novo método de determinação do ponto final de titulação.

Por outro lado, Keily e Hume⁶⁸ mostraram que na titulação termométrica de bases com ácido perclórico em ácido acético glacial, a adição de anidrido acético provocava um súbito aumento de temperatura no ponto final da titulação. Mesmo concluindo que este aumento de temperatura era devido à reação exotérmica do anidrido com a água, catalisada pelo excesso de ácido perclórico, os autores também não exploraram este efeito na determinação do ponto final.

Dessa forma, é considerado como pioneiro em TTC o trabalho publicado por Vaughan e Swithenbank⁵⁹, que utilizaram a acetona como solvente e "indicador entalpimétrico" na titulação de ácidos com hidróxido de potássio em iso-propanol.

Algumas condições são necessárias para que uma reação catalítica (indicador) possa ser utilizada na determinação do ponto final de uma titulação: a reação indicativa deve ser muito lenta na ausência do catalisador (titulante) e muito rápida na sua presença; ter um tempo de indução bastante pequeno; a atividade catalítica do titulante deve ser inibida devido à reação determinativa; a reação indicativa deve processar-se nas mesmas condições

da reação determinativa; o indicador não deve reagir com a amostra, devendo ser solúvel (miscível) no titulado e a reação indicativa deve possibilitar a determinação do ponto final da titulação.

Na TTC a reação indicativa é exotérmica, possibilitando o acompanhamento da titulação através do monitoramento da temperatura e a curva obtida, temperatura versus volume de titulante, é mostrada na figura III.1. Esta reação indicativa diferencia a titulação catalítica da termométrica convencional, pois enquanto nesta é medida a variação de temperatura do sistema devido à reação entre titulado e titulante (sendo da ordem de alguns décimos de graus Celsius, no máximo), na TTC esta variação de temperatura é desprezível quando comparada com a variação provocada pela reação indicativa do ponto final (podendo chegar a 30°C). Outro ponto diferenciador dos métodos é que, ao contrário do que ocorre na titulação convencional, a variação de temperatura na catalítica independe da quantidade de amostra titulada, sendo função da quantidade do indicador termométrico utilizado⁶⁹.

Em ambos os métodos é utilizada basicamente a mesma aparelhagem. Um frasco Dewar é usado como recipiente para a titulação e um termistor é usado como sensor de temperatura. A adição do titulante é feita continuamente através de uma bureta de vazão constante e a curva de titulação é obtida através do conjunto termistor-ponte de Wheatstone-registrador. É desejável que o titulado seja idealmente agitado de forma a evitar um excesso localizado de titulante. A figura III.2 mostra a aparelhagem utilizada nas titulações termométricas.

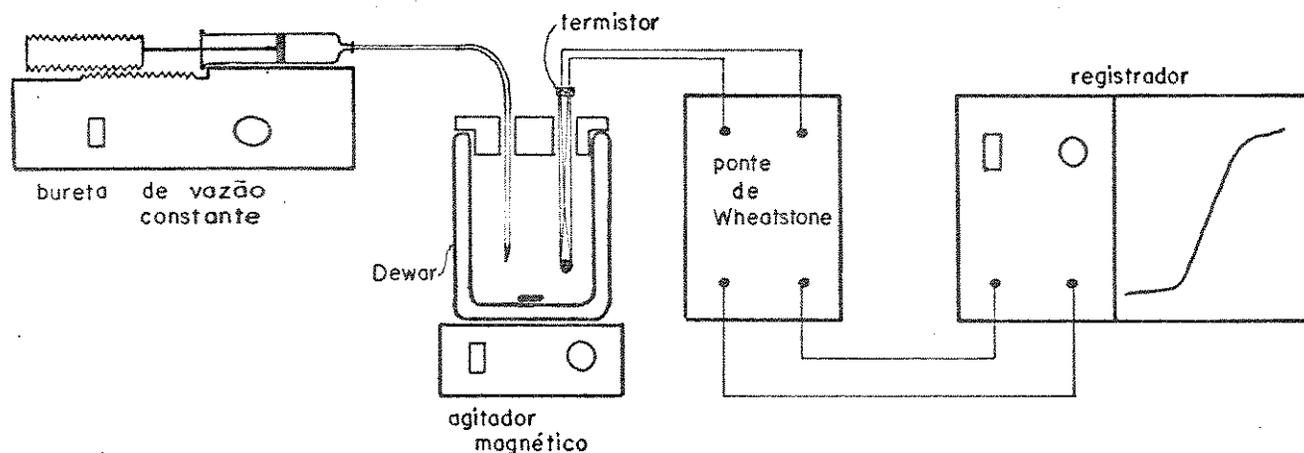


Figura III.2. Esquema da aparelhagem utilizada nas titulações termométricas catalítica e convencional

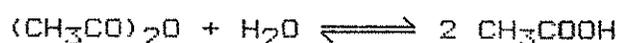
Como na termométrica convencional a variação de temperatura durante a titulação é muito pequena é necessário que o frasco Dewar seja prateado de forma a garantir a adiabaticidade do sistema, que o titulante e o titulado estejam na mesma temperatura e que o calor de mistura entre o solvente da amostra e o solvente do titulante seja desprezível (o que praticamente significa que o solvente deve ser o mesmo para o titulante e o titulado). Entretanto, na TTC (na qual a variação de temperatura no ponto final da titulação é grande), pode ser utilizado um frasco Dewar não prateado e se não houver necessidade de uma precisão muito alta, o Dewar pode ser substituído por um béquer comum⁷⁰; pode haver uma pequena diferença de temperatura entre titulante e titulado sem comprometer a curva de titulação e não há necessidade de ser empregado o mesmo solvente para amostra e titulante.

Outras vantagens podem ser conseguidas devido à grande variação de temperatura no ponto final da TTC. Por exemplo, a titulação catalítica pode ser feita manualmente^{71,72} e o conjunto termistor-ponte de Wheatstone-registrador pode ser substituído por um indicador termocrômico inorgânico⁷³ ou orgânico⁷⁴, possibilitando a determinação visual do ponto final da TTC.

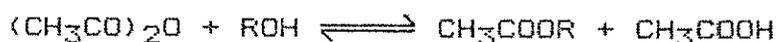
A TTC tem sido quase que exclusivamente utilizada para acompanhar as titulações de neutralização, as quais são efetuadas em meio não aquoso ou parcialmente aquoso.

Na determinação de bases são geralmente utilizados os seguintes indicadores, cujas reações são catalisadas por ácidos (normalmente ácido perclórico em ácido acético glacial):

a. anidrido acético e água⁷⁵:



b. anidrido acético e álcoois ou fenóis^{76,77}:

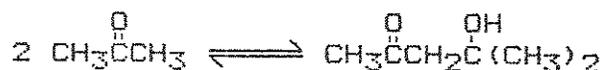


c. α -metil-estireno⁷¹, éteres cíclicos e acetais⁷⁸: polimerização catiônica.

Na determinação de ácidos são geralmente utilizados os seguintes indicadores, cujas reações são catalisadas por bases (normalmente hidróxidos de amônio quaternário, alcoóxidos de po-

tássio ou hidróxido de potássio alcoólico):

a. acetona^{59,79}: condensação aldólica.



b. aldeídos (acetaldeído⁸⁰, formaldeído e outros⁸¹): condensação aldólica.

c. cetonas cíclicas (ciclo-butanona, ciclo-pentanona, ciclo hexanona, ciclo-heptanona⁸²): condensação aldólica.

d. acrilonitrila^{72,83}: polimerização e cianoetilação.

Na TTC a forma da curva de titulação e o resultado obtidos dependem de fatores como indicador utilizado (e quantidade), solvente da amostra e titulante. Por exemplo, na titulação de ácido salicílico com hidróxido de tetrabutylamônio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (em tolueno-metanol), a utilização de 2,0 ml de acrilonitrila e 2,0 ml de DMSO como solvente da amostra possibilita a determinação de apenas um grupo enquanto que o emprego de 4,0 ml de acrilonitrila e 0,5 ml de DMSO possibilita a titulação dos grupos fenólico e carboxílico do referido ácido⁸⁴. Da mesma forma, na determinação de acidez em asfalto (piridina como solvente) com hidróxido de potássio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (em piridina-iso-propanol 1:1), com o emprego de acrilonitrila como indicador termométrico foi encontrado um índice de acidez de 9,23 mg KOH/g am., enquanto que com acetona

foi obtido um valor de 10,13 mg KOH/g am.; a utilização de hidróxido de potássio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ em iso-propanol como titulante forneceu um índice de acidez de 7,67 e 9,03 mg KOH/g am. com o emprego de acrilonitrila e acetona como indicadores, respectivamente⁸⁵.

Portanto, é importante a escolha do indicador e do solvente para a obtenção de resultados coerentes através da localização correta do ponto final da titulação. Essa escolha tem sido feita de maneira empírica e muitas informações podem ser encontradas a respeito da utilização do par solvente/indicador. Uma forma racional de se evitar o trabalho experimental é o desenvolvimento teórico das titulações catalíticas. Embora Mottola⁸⁶, em 1969, tenha descrito simplificadaamente a teoria das titulações catalíticas e Goizman⁸⁷, em 1971, tenha derivado equações para as curvas de TTC, somente a partir de 1984 é que apareceram algumas contribuições mais criteriosas à teoria das titulações catalíticas, envolvendo as volumetrias de complexação⁸⁸, precipitação, oxi-redução⁸⁹ e neutralização^{90,91}.

Na derivação das expressões matemáticas que descrevem as curvas de titulações foi assumido que a reação determinativa é extremamente rápida, não sendo necessário considerá-la nos cálculos. Entretanto, como foi mostrado anteriormente, essa suposição não é correta no caso da TTC ácido-base, isto é, a reação de neutralização em meio não aquoso não pode ser considerada instantânea quando comparada à reação indicativa da titulação catalítica. Como a cinética das reações determinativa e indicativa das titulações catalíticas varia com o solvente, cuja composição pode

ser infinitamente variada, muitos esforços ainda deverão ser feitos no sentido de se obter uma teoria consistente para a TTC.

Dessa forma, a aplicação da TTC na determinação de ácidos e bases está limitada pela escolha correta do par solvente-indicador termométrico (e titulante) que ainda hoje é, infelizmente, feita de maneira empírica.

IV. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

A potenciometria é a técnica mais utilizada na determinação do ponto final das titulações em meio não aquoso. A titulação potenciométrica é comparável à TTC quanto ao custo e simplicidade, com a vantagem de possibilitar a diferenciação de uma mistura de ácidos ou bases, determinando suas forças relativas.

Como a grande aplicação da titulação em meio não aquoso está na volumetria de neutralização, o eletrodo de vidro é o eletrodo indicador mais utilizado, respondendo de forma satisfatória em praticamente todos os solventes orgânicos.

O eletrodo de vidro é muitas vezes empregado em meio não aquoso somente após o seu condicionamento no solvente de interesse. Acreditava-se que uma vez feito o condicionamento, o eletrodo deveria ser utilizado apenas nesse solvente e que o seu contato com água deveria ser evitado⁹². Essa prática provocava a desidratação da membrana do eletrodo, tornando lenta a sua resposta. Entretanto, a imersão do eletrodo em água por alguns minutos reidrata a sua membrana, devolvendo-lhe suas propriedades iniciais⁹³. Mesmo em meio não aquoso o potencial do eletrodo de vidro é determinado pela sua camada de gel hidratada⁹³, não sendo, portanto, aconselhável acondicioná-lo em solventes orgânicos por longos períodos, exceto quando o solvente seja fortemente polar⁹⁴.

Alguns estudos foram efetuados sobre a resposta do eletrodo de vidro em solventes orgânicos e podem ser assim resumidos⁹⁵:

a. o eletrodo deve ser mantido em água antes do seu uso e lavado com água, seco com papel apropriado, lavado com o solvente puro e imerso na solução a ser titulada. A estabilização demora de 2 a 20 minutos, sendo que o tempo aumenta com a diminuição da constante dielétrica e com o aumento do caráter aprótico do solvente. Entre as determinações de diferentes amostras, o eletrodo deve ser lavado com o solvente puro e a medida que as amostras são analisadas, o potencial estabiliza mais rapidamente. Após o uso, o eletrodo deve ser lavado com água até que indique o pH correto de duas soluções tampão aquosas.

b. a mudança de resposta do eletrodo devido ao uso prolongado em solvente orgânico é resultado da desidratação de sua membrana, que ocorre mais rapidamente em meios apróticos e mais lentamente em meios polares. As características iniciais do eletrodo são reobtidas através de sua imersão em água.

c. um eletrodo velho pode ser reativado através da "limpeza" de sua superfície com solução aquosa de ácido fluorídrico a 2 % e reidratação com solução aquosa diluída de ácido clorídrico por uma hora.

d. melhores resultados são obtidos quando se titula ácido com solução padrão de base.

Um aspecto até certo ponto contraditório deve ser comentado com respeito ao uso do eletrodo. Se, como foi colocado anteriormente, o tempo de estabilização do potencial do eletrodo diminui a medida que o uso no solvente aumenta, fica clara a necessidade de se condicionar o eletrodo de vidro, mesmo que seja por um período curto. Neste sentido, diferentes resultados foram obtidos

(variação de potencial no ponto final da titulação) por Greenhow e Al-Mudarris⁹⁶ devido à variação no tempo de condicionamento do eletrodo.

Quando é desejada apenas a determinação do ponto final da titulação, os eletrodos metálicos podem ser usados com vantagens em relação ao de vidro. Por exemplo, um eletrodo metálico não necessita de condicionamento antes do uso e a sua superfície, à medida que perde a sensibilidade, pode ser facilmente limpa mecânica ou quimicamente. Esse eletrodo é recoberto por uma fina camada de seu próprio óxido, responsável pela resposta às variações de pH⁹⁷. Podem ser utilizados, entre outros, eletrodos de antimônio⁹⁸, platina⁹⁹, ouro⁹², nióbio¹⁰⁰, alumínio^{96,101}, gálio, arsênio, bismuto, chumbo, índio e tálio⁹⁶.

Com relação aos eletrodos de referência, os mais utilizados são os de calomelano e prata-cloreto de prata.

O eletrodo de calomelano, preenchido com solução aquosa de cloreto de potássio, tem sido utilizado com bastante frequência. Entretanto, o potencial de junção do eletrodo com o meio orgânico pode ser muito alto e, neste sentido, algumas alterações são normalmente propostas. A mais comum é a substituição da solução de cloreto de potássio aquosa por uma saturada em metanol²⁰, embora outras modificações sejam feitas. Por exemplo, Harlow e Bruss¹⁰² utilizaram uma solução $1,0 \text{ mol.l}^{-1}$ de cloreto de tetrabutylamônio nas titulações em benzeno e tolueno, enquanto que Fisicaro e Braibanti¹⁰³ utilizaram uma solução de cloreto de potássio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ em metanol-água (9:1) nas titulações no mesmo meio.

Da mesma forma, o eletrodo de prata-cloreto de prata tem si-

do modificado através da substituição da solução aquosa de cloreto de potássio por uma saturada de cloreto de lítio ou potássio em um solvente anidro (usualmente ácido acético ou álcool)¹⁰⁴.

Doutros eletrodos podem ser utilizados como referência. Um fio metálico (Pt, Sb, Ni-Cr) imerso no titulante pode ser usado como eletrodo de referência, sendo que o contato elétrico é feito através da imersão da ponta da bureta na solução titulada¹⁰⁵. O eletrodo de vidro em etilenodiamina e na presença de íons Na^+ não responde às variações de pH, funcionando como eletrodo de referência em conjunto com um eletrodo indicador de platina¹⁰⁶ ou antimônio¹⁰⁷.

Assim como a forma da curva de titulação em meio não aquoso depende do solvente e titulante, a variação de potencial depende também do par de eletrodos utilizados. Pellerin e Demay¹⁰⁸ investigaram o comportamento de dez pares de eletrodo nas titulações de biftalato de potássio com ácido perclórico $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ em ácido acético glacial e de ácido benzóico em dimetilformamida com metóxido de sódio $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ em benzeno-metanol. A tabela IV.1 resume os resultados deste trabalho.

Algumas anomalias podem ocorrer durante o curso de uma titulação em meio não aquoso, principalmente em solventes apróticos. Por exemplo, a curva de titulação pode apresentar um salto de potencial adicional na metade da neutralização; pode ser assimétrica em relação ao ponto de meia neutralização; pode ser irreprodutível e apresentar pequenos saltos ou quedas de potencial à 25, 50 e 75 % do ponto final da titulação.

Tabela IV.1. Estudo do par de eletrodos¹⁰⁸.

par de eletrodos	valor máximo de mV/ ml	
	$C_6H_4(COO)_2HK \times HClO_4$	$C_6H_5COOH \times MeONa$
Pt x Pt polarizada(1)	12.500	6.500
Pt x Pt polarizada(2)	4.900	3.100
Pt x Pt(3)	6.750	4.750
Pt polar x Pt polar(3)	6.000	3.500
Pt x calomelano	4.350	5.000
Pt x calomelano	5.750	4.250
vidro x calomelano(4)	5.600	750
vidro x calomelano	5.150(5)	700(6)
Ag x vidro	3.650	1.250
vidro x Ag/AgCl comb	3.250	300

(1) Pt polarizado no titulado; (2) Pt polarizado no titulante; (3) um dos eletrodos é colocado no titulante; (4) KCl aquoso saturado; (5) LiCl saturado em ácido acético; (6) KCl saturado em metanol.

A figura IV.1.A mostra curvas de titulação onde ocorrem salto adicional de potencial (A.1 e A.2) e assimetria (A.3 e A.4). De acordo com van der Heijde¹⁰⁹ essas irregularidades são devido à associação ácido-ânion e dimerização do ácido. A associação ácido-ânion pode ser entendida como homoconjugação, que é também responsável pelos saltos de potencial que ocorrem nas titulações mostradas na figura IV.1.B¹¹⁰. Pode ser notado que o ácido fórmico (B.1) e o fenol (B.2) sofrem homoconjugação (o que altera a curva de titulação), enquanto que o 2,6-diterbutil-4-metil-fenol (B.3) não sofre homoconjugação devido ao impedimento estérico e, portanto, apresenta uma curva de titulação "normal".

A irreprodutibilidade das curvas de titulações e as súbitas variações de potencial no decorrer das mesmas ocorrem em razão da adsorção da amostra à superfície do eletrodo, sendo que alguns exemplos podem ser encontrados no trabalho de van der Heijde¹⁰⁹.

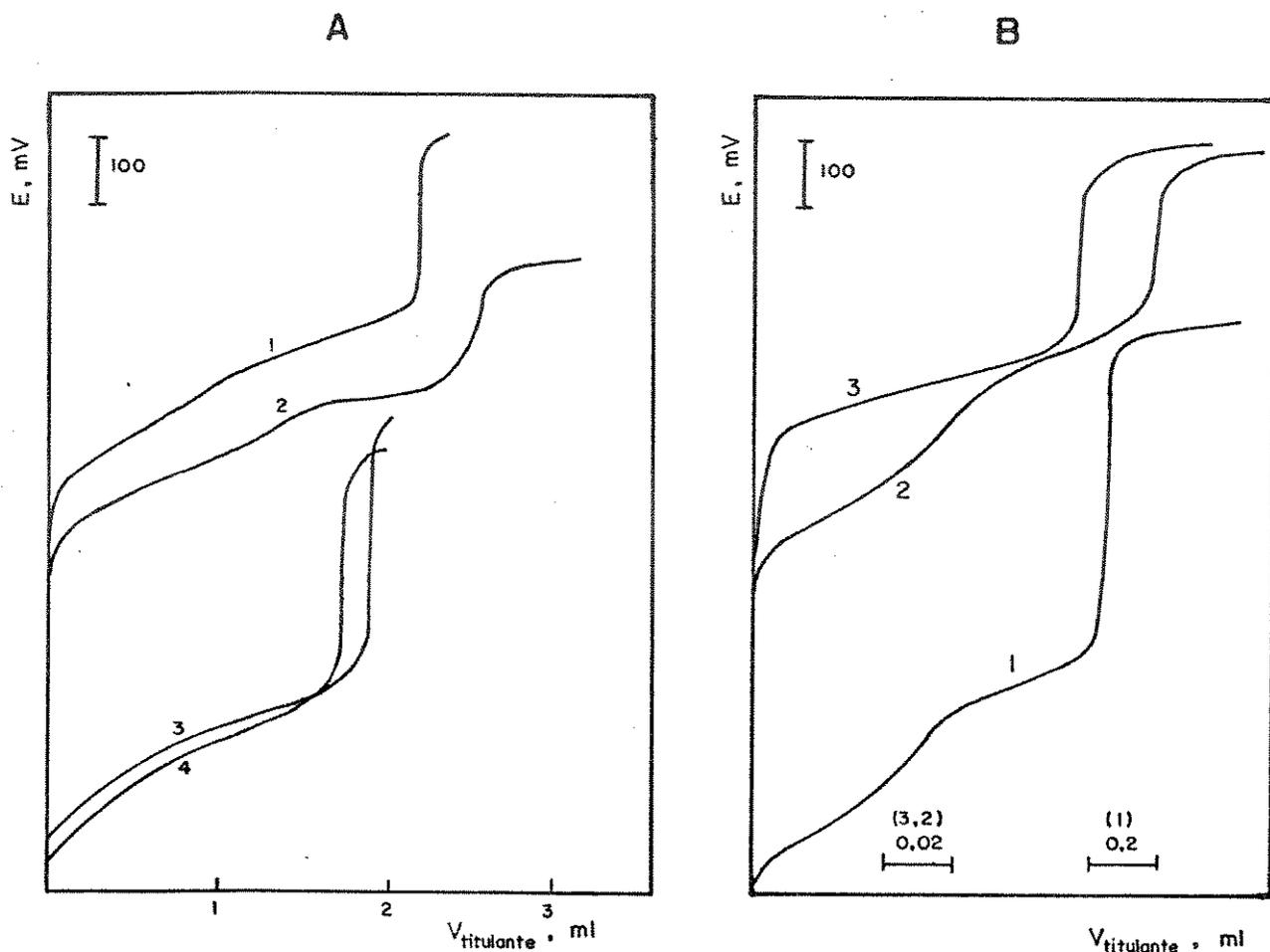


Figura IV.1. Curvas de titulações potenciométricas irregulares.

- A. (1) titulação de ácido acético em acetona.
 (2) titulação de fenol em piridina.
 (3) titulação de ácido acético em acetonitrila.
 (4) titulação de ácido acético em clorobenzeno.
 titulante: hidróxido de metiltributilamônio em piridina.
 eletrodos: vidro x calomelano¹⁰⁹.
- B. (1) titulação de ácido fórmico.
 (2) titulação de fenol.
 (3) titulação de 2,6-diterbutil-4-metil-fenol.
 titulante: hidróxido de tetrabutilamônio em iso-propanol.
 eletrodos: vidro x calomelano¹¹⁰.

Como pode ser visto, as titulações em meio não aquoso não são tão simples como as efetuadas em água, uma vez que vários parâmetros definem a forma da curva de titulação. Um exemplo que sintetiza essas "complicações" pode ser representado pelo trabalho publicado por Yakubik e colaboradores¹¹¹. Utilizando um par de eletrodos vidro x prata e combinando apropriadamente solvente e titulante, os autores obtiveram uma curva de titulação semelhante à curva de 1ª derivada. A figura IV.2 mostra o resultado obtido na titulação de ácido benzóico em piridina com a combinação apropriada dos eletrodos. Pela forma da curva de titulação

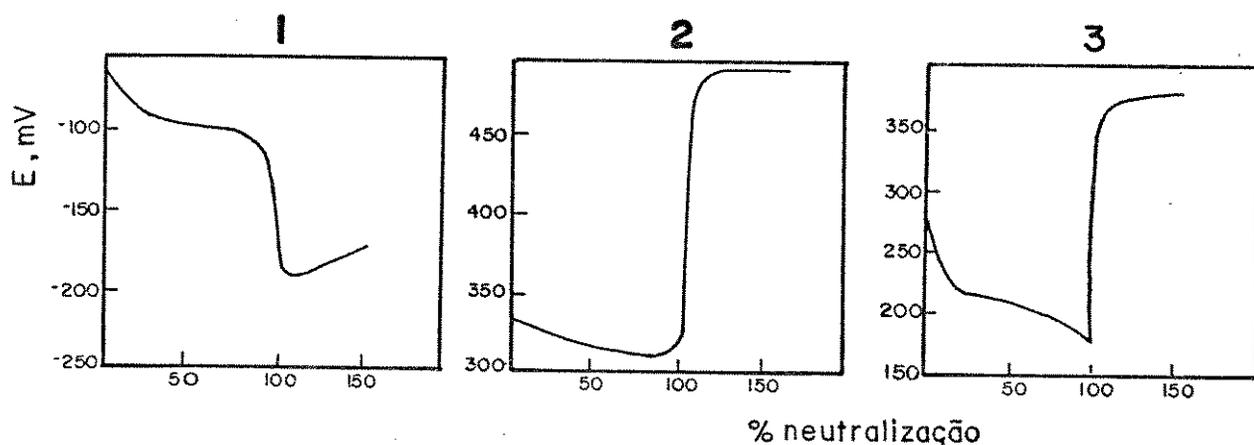


Figura IV.2. Titulação potenciométrica de ácido benzóico em piridina¹¹¹ (titulante: metóxido de sódio $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ em benzeno-metanol).

- eletrodos: 1. vidro x calomelano.
2. prata x calomelano.
3. vidro x prata.

(curva 3) nota-se que o eletrodo de vidro funciona como eletrodo indicador até o ponto final, a partir do qual atua como referência.

Portanto, em vista do exposto, é necessário que a aplicação de métodos potenciométricos na determinação do ponto final das titulações em meio não aquoso seja feita com cuidado, de forma a garantir a obtenção de bons resultados, confiáveis tanto em precisão quanto em exatidão.

V. O SISTEMA DMSO-ÁGUA

Ao lado de suas importantes propriedades farmacológicas¹⁵, o DMSO tem sido bastante utilizado nas várias áreas da química, em virtude da sua grande capacidade de solvatar tanto compostos orgânicos como inorgânicos.

O DMSO é um líquido incolor, inodoro e altamente higroscópico¹¹². É classificado como um solvente dipolar aprótico³¹, possuindo, a 25 °C, uma constante dielétrica de 46,7, um momento dipolar de 3,9 D* e uma densidade de 1,096 g.cm⁻³ ¹¹³. É relativamente viscoso (2,473 cP**, a 20 °C) e possui um coeficiente de expansão térmica baixo (8,8x10⁻⁴ cm³.°C⁻¹) ¹¹².

O fato do DMSO ser líquido numa grande faixa de temperatura (p.f.= 18,6 °C; p.e.= 189,0 °C), ser muito polar e ser capaz de aceitar pontes de hidrogênio é que lhe confere um grande poder de solvatação¹¹². A associação do próton ao DMSO é feita somente através do átomo de oxigênio, embora o enxofre também possua um par de elétrons livre. Isto é explicado pela teoria desenvolvida por Pearson, segundo a qual o próton, um ácido duro, se liga fortemente ao oxigênio, uma base dura, e não ao enxofre, uma base mole¹¹². Os pares de elétrons livres dão ao DMSO um caráter básico semelhante ao da água, mas com uma acidez muito menor¹¹⁴.

Kolthoff e Reddy¹¹⁴ determinaram a constante de autoprotólise do DMSO, encontrando um valor de 5x10⁻¹⁸. Entretanto, sabe-se

* 1 Debye = 3,34x10⁻³⁰ A.s.m.

** 1 cP = 1x10⁻³ Kg.s⁻¹.m⁻¹.

hoje que essa constante é da ordem de 10^{-33} , sendo reportados na literatura valores de pK_{SH} iguais a 33,3¹¹⁵; 32-33¹¹⁶ e 31,3¹¹⁷.

O DMSO, sendo um solvente dipolar aprótico protofílico, solvata fortemente os cátions e fracamente os ânions. Esta característica traz várias consequências no equilíbrio ácido-base em DMSO. Normalmente os ácidos carboxílicos são mais fracos do que em água, em virtude da pouca habilidade do DMSO em solvatar o íon carboxilato^{112,118}. Excessão é feita aos ânions grandes que são solvatados e, como tal, o ácido pícrico apresenta um pK_a igual a -1,9 em DMSO e igual a 0,7 em água¹¹². Também são fortes os ácidos clorídrico, perclórico e sulfúrico (K_1), que se apresentam totalmente dissociados em DMSO¹¹⁴. Embora a força dos ácidos carboxílicos seja diminuída em DMSO, a titulação de ácidos muito fracos é favorecida neste solvente devido às suas características levemente básicas³¹.

O trabalho com DMSO passa necessariamente por uma etapa de purificação do solvente. Vários métodos são propostos no intuito de se retirar impurezas ácidas e básicas do DMSO^{113,119}. No entanto, a água é a principal impureza existente no DMSO devido às suas propriedades higroscópicas (a 10 °C contém 10% p/p de água¹¹²) e o tratamento do solvente com peneira 3A ou 4A é eficiente, possibilitando a obtenção do DMSO com teor de água da ordem de 0,03%¹²⁰.

O DMSO tem sido utilizado como solvente tanto em titulações potenciométricas para as determinações de ácido cianúrico e melamina¹²¹; amônio e íons amônio substituídos¹²²; ácido fúlvico¹²³ e

outros^{124, 125}, como nas titulações termométricas catalíticas para as determinações de ácidos carboxílicos e fenóis⁸⁴ e resinas^{126, 127}. Entretanto, dois inconvenientes existem ao se trabalhar com DMSO anidro. O primeiro está relacionado com o fato do DMSO ser fortemente higroscópico, como dito anteriormente. O segundo envolve as titulações potenciométricas e está relacionado com os eletrodos utilizados. A resposta do eletrodo de vidro se torna extremamente lenta em pH superior a 15³¹, podendo ser irreprodutível quando é utilizado um eletrodo de calomelano como referência¹²⁸ e como o cloreto de prata é bastante solúvel em DMSO¹¹⁴, o eletrodo de Ag/AgCl é muito difícil de ser empregado no solvente puro¹²⁹.

Dessa forma, misturas DMSO-água tem sido bastante utilizadas. Existe uma forte interação entre os dois solventes, sendo que uma molécula de DMSO se associa preferencialmente a duas moléculas de água através de interações dipolo-dipolo¹¹². No entanto, a mistura aproximadamente equimolar (80% p/p em DMSO) tem sido frequentemente empregada em titulações. Esta mistura é conveniente porque é pouco higroscópica, dissolve muitas substâncias orgânicas e inorgânicas, possui uma constante dielétrica (72) próxima à da água (78,5) com propriedades ácido-base bastante diferentes¹³⁰ e o eletrodo de vidro responde rapidamente nesta mistura, podendo ser utilizados eletrodos de calomelano¹³¹ ou Ag/AgCl¹²⁹ como referência.

O sistema 80% DMSO - 20% água (p/p) tem sido empregado nas determinações da constante de dissociação de vários ácidos e indicadores¹³⁰ e da acidez de várias drogas pouco solúveis em

água¹³¹. Budevsky e colaboradores definiram uma escala de pH para esta mistura¹²⁹, determinaram os valores de pK de ácidos carboxílicos alifáticos¹²⁹ e aromáticos¹³² e de alguns indicadores¹³³. Várias investigações também têm sido efetuadas em misturas menos ricas em DMSO. Longhi e colaboradores¹³⁴ determinaram a constante de dissociação da água em misturas com até 60 % de DMSO (p/p), variando a temperatura de 10 até 70 °C. Das e Kundu¹³⁵ efetuaram a mesma determinação a 25°C, computando também valores de energia livre de transferência da hidroxila para a mistura. Taylor¹³⁶ determinou o pH de tampões em misturas 20 e 30% DMSO-água (p/p) a várias temperaturas e Vega e Halle¹³⁷ determinaram o pH de tampões biológicos em misturas com até 95% (v/v) de DMSO. Galvão e Stradiotto¹³⁸ determinaram fatores de correção para o eletrodo de vidro em mistura de água com até 90% (v/v) de DMSO.

Com relação à TTC, Greenhow e Shafi²³ titularam vários ácidos fracos em DMSO-água; Godinho e Greenhow¹³⁹ investigaram a interação entre esses dois solventes determinando que a proporção molar 2DMSO : 1H₂O é a mais indicada para ser utilizada neste método e, baseado neste fato, Queiroz⁷⁴ determinou o número de grupos ácidos tituláveis em tripsina e mioglobina.

Da mesma forma, a mistura proposta por Godinho e Greenhow¹³⁹ será utilizada como solvente neste trabalho, tanto nas TTC como nas titulações potenciométricas.

VI. EXPERIMENTAL

VI.1. Titulações Potenciométrica e Termométrica Catalítica

VI.1.1. Reagentes

- peneira molecular 3A; Merck.
- peneira molecular 4A; Carlo Erba.
- iso-propanol; Merck.
- acrilonitrila (AN); Aldrich.
- DMSO; grau espectroscópico - Merck; P.A. - Riedel.
- etanol absoluto; Merck.
- ácido clorídrico fumegante; Merck.
- ácido benzóico P.A.; Carlo Erba.
- hidróxido de potássio P.A.; Carlo Erba.
- carbonato de sódio P.A.; Reagen.
- brometo de tetraetilamônio P.A.; Aldrich.
- monoclóridrato de L-arginina (Arg) P.A.; Fluka.
- lisozima da clara do ovo; Aldrich 85387-9, lote 121567.
- ovalbumina; Sigma A-5503, lote 81F-8235.
- água destilada; destilador de vidro Glissa.

VI.1.2. Aparelhagem

- propulsor de seringa; Sage Instruments, modelo 351.
- registrador potenciométrico; ECB, modelo RE 101.
- ponte de Wheatstone; Leeds & Northrup Co., modelo 4760.
- agitador magnético; Methrom, modelo E 549.
- pH-metro; Micronal, modelo B 375.
- termistor; ITT, modelo F 230 ($R = 1,6 K$, à $25^{\circ}C$).
- derivador (circuito para 1° derivada).
- eletrodo de vidro; Beckman, uso geral, tipo 42.
- eletrodo de calomelano saturado; Beckman, modelo 39170 A2U.
- eletrodo de Ag/AgCl, dupla junção; Orion, modelo 90-02-00.
- eletrodo de alumínio.
- fio de níquel-cromo.
- seringa de vidro de 10 ml; Yale.
- frasco Dewar de 50 ml, não prateado.
- béquer de 50 ml.

VI.1.3. Tratamento dos Solventes

Os solventes iso-propanol, AN e DMSO foram secos sobre peneira molecular 3A ou 4A ativada. A ativação da peneira foi feita por aquecimento a $500^{\circ}C$ por 4 horas; foi resfriada em dessecador com vácuo e imediatamente utilizada.

Na secagem dos solventes foram colocados nos próprios frascos 100 a 150 g de peneira ativada. Somente após um período míni-

mo de 24 horas é que os solventes foram utilizados.

VI.1.4. Preparação das soluções padrão

A solução padrão de HCl 0,1000 M foi preparada segundo o descrito na literatura¹⁴⁰.

A solução de KOH 0,1000 M em iso-propanol foi preparada dissolvendo-se, com agitação, 3,3-3,4 g da base em 500 ml do solvente previamente seco. A solução foi deixada em repouso por 12 horas para completa precipitação do carbonato de potássio. O sobrenadante foi transferido para um frasco plástico apropriado, livre de CO₂. Após outras 12 horas a solução foi padronizada contra ácido benzóico, utilizando etanol como solvente e fenolftaleína como indicador. Foi colocado etanol suficiente para não haver formação de precipitado (benzoato de potássio) durante a titulação, sendo descontada a titulação do branco. O título da solução preparada e armazenada como descrito permanece inalterado por pelo menos 60 dias.

VI.1.5. Procedimento

VI.1.5.1. Calibração da seringa

A seringa foi calibrada através de pesagem do volume de água escoada durante 2,5 minutos, com a vazão nominal do propulsor

ajustada para $0,40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dessa forma, calibrou-se a seringa da marca de 7,0 até 1,0 ml, em incrementos de 1,0 ml; as medidas foram feitas em quadruplicatas.

VI.1.5.2. Titulações

O esquema da aparelhagem utilizada nas titulações termométricas catalíticas é semelhante ao mostrado na figura III.2, sendo que a bureta de vazão constante foi substituída por um propulsor de seringa. Este propulsor é mostrado na figura VI.1, onde é também apresentado o esquema da aparelhagem empregada nas titulações potenciométricas. Pode ser notado na figura que o fio de níquel-cromo imerso no titulante é usado como eletrodo de referência e o contato elétrico feito através da imersão da ponta do tubo de polietileno no titulado.

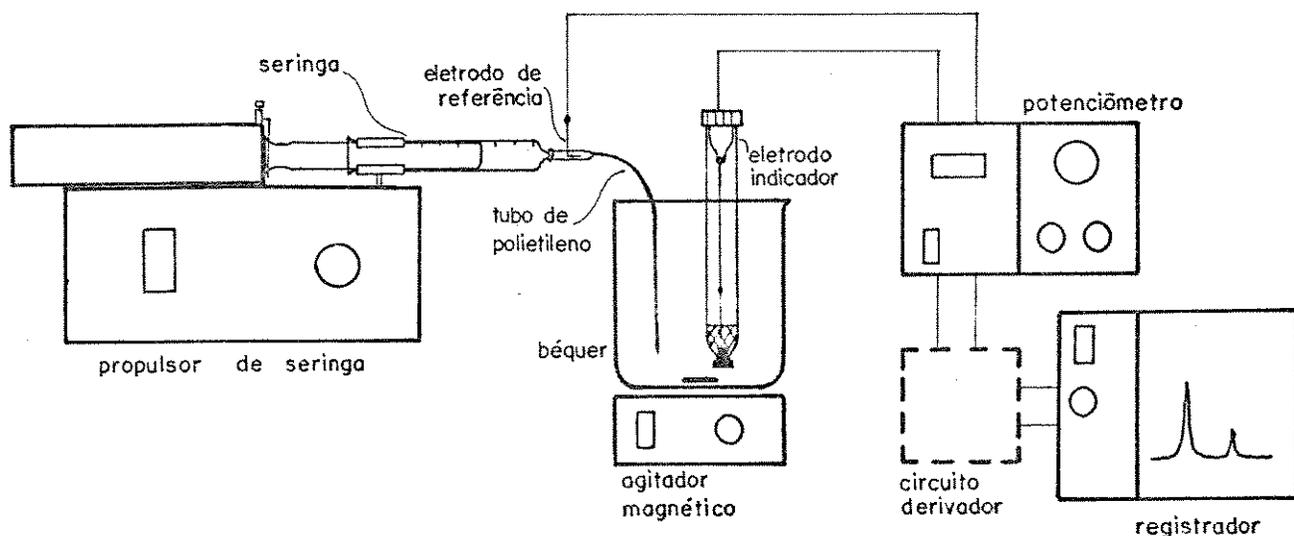


Figura VI.1. Esquema da aparelhagem utilizada nas titulações potenciométricas.

Na TTC as amostras de Arg (10 mg) ou proteína (20 mg) foram pesadas em balança analítica (anotando até $\pm 0,01$ mg), transferidas para o frasco Dewar e dissolvidas em 0,8 ml de água. Após a dissolução foram adicionados 7,0 ml de DMSO e 4,0 ml de AN, nessa ordem. A mistura obtida foi titulada com a solução padrão de KOH, após um período de 20 minutos. Foi efetuada a titulação do branco.

Na titulação potenciométrica foram realizados os seguintes experimentos:

a. escolha do par de eletrodos: 10 mg de Arg, pesados em balança analítica, foram transferidos para um béquer de 50 ml e dissolvidos em 0,8 ml de água e 7,0 ml de DMSO. A mistura foi titulada com a solução padrão de KOH, utilizando-se os seguintes pares de eletrodos.

- vidro x E.C.S.
- vidro x dupla junção (eletrólito interno = solução aquosa de KCl $3,0 \text{ mol.l}^{-1}$; eletrólito externo = solução de Et_4NBr $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ em DMSO : H_2O , 7,0:0,8 ml)
- vidro x Ni-Cr (no titulante)
- alumínio x Ni-Cr (no titulante)

As titulações foram efetuadas 5 minutos após a colocação dos eletrodos nas soluções e as curvas clássicas foram registradas. O eletrodo de vidro foi inicialmente condicionado por 60 horas na mistura DMSO- H_2O antes de iniciado o experimento e guardado nesta solução durante todo o trabalho. Entre as titulações o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel.

b. determinação de grupos ácidos das proteínas e aminoácidos: foram titulados 20 mg de lisozima ou ovalbumina como descrito no item a.. Os pares de eletrodos vidro x Ni-Cr e Al x Ni-Cr foram utilizados e as curvas de 1ª derivada registradas.

c. determinação dos grupos totais das proteínas e aminoácidos: as titulações foram feitas como descrito anteriormente, exceto que as amostras foram dissolvidas em 0,800 ml de solução aquosa de HCl 0,1000 mol.l⁻¹. Foi utilizado o par de eletrodos vidro x Ni-Cr e registradas as curvas de 1ª derivada.

Foram efetuadas titulações do branco nos itens b e c para se descontar o volume gasto devido às impurezas do solvente.

VI.2. Construção do Eletrodo de Alumínio

VI.2.1. Material

- pipeta de Pasteur.
- fio de níquel-cromo.
- fio de cobre.
- rebite de alumínio.
- mercúrio.
- plug banana (fêmea).
- solda de estanho.

- resina cianoacrilica (cola "Super Bonder").

VI.2.2. Esquema e descrição do eletrodo

A figura VI.2 mostra o esquema do eletrodo construído. O rebite e o plug foram colados à pipeta com "Super Bonder" e as junções fio de Ni-Cr/fio de cobre/plug feitas com solda de estanho. A parte superior do eletrodo foi selada com a própria cola de forma a se evitar a perda de mercúrio por evaporação.

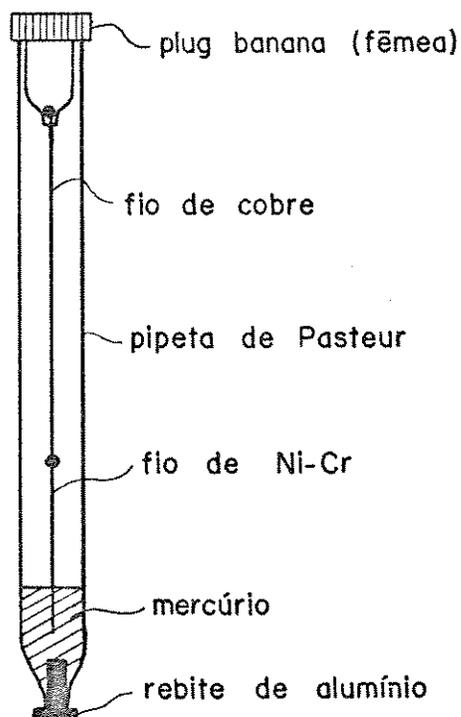


Figura VI.2. Esquema do eletrodo de alumínio.

VI.2.3. Avaliação do eletrodo

O eletrodo foi avaliado através de titulações com ácido benzóico (10 mg) como a descrita na "escolha do par de eletrodos" (item V.1.5.2). Foi utilizado um fio de níquel-cromo imerso no titulante como eletrodo de referência e registradas as curvas clássica e de 1ª derivada. O eletrodo foi polido com lixa d'água nº 500 antes de se iniciar a série de titulações.

VI.3. Construção do Derivador

O derivador (circuito para 1ª derivada) foi construído baseado no descrito por Wheals e Russel¹⁴¹.

VI.3.1. Material*

- placa universal para o circuito impresso (1).
- transformador para 110 V, saída 9x9, 1 A (1).
- regulador de voltagem 7805 (1)
- regulador de voltagem 7905 (1).
- diodo retificador, 1 A, 150 V (4).
- capacitor eletrolítico, 1000 µF, 25 V (1).

(*) o número entre parênteses se refere à quantidade de cada material utilizado.

- capacitor eletrolítico, 1000 μF , 40 V (1).
- capacitor de cerâmica, 47 μF , 25 V (2).
- capacitor 0,1 μF , 630 V (1).
- capacitor eletrolítico 1,0 μF , 400 V (1).
- soquete de 8 pinos para wire up (4).
- circuito integrado 741 (4).
- resistor 10 M Ω (1).
- resistor 1 M Ω (5).
- resistor 100 K Ω (2).
- resistor 10 K Ω (1).
- resistor 4,7 K Ω (1).
- resistor 2,7 K Ω (2).
- potenciômetro 10 K Ω (1).
- fusível 0,5 A (1).
- chave H (1).
- plug banana fêmea (5).
- porta fusível (1).

VI.3.2. Esquema do aparelho

A figura V.3 mostra os circuitos eletrônicos utilizados na construção do derivador e para alimentação do mesmo. O circuito, montado sobre a placa, foi devidamente acondicionado em uma caixa de alumínio construída para tal finalidade. Os resistores de 10 K Ω , em virtude de diferenças de fabricação dos circuitos integrados 741 podem ser alterados de forma a fornecerem um potencial

de +5 V e -5 V. No derivador construído foi necessária a troca de um desses resistores por um de 4,7 K Ω na entrada de -5 V para que isso fosse possível.

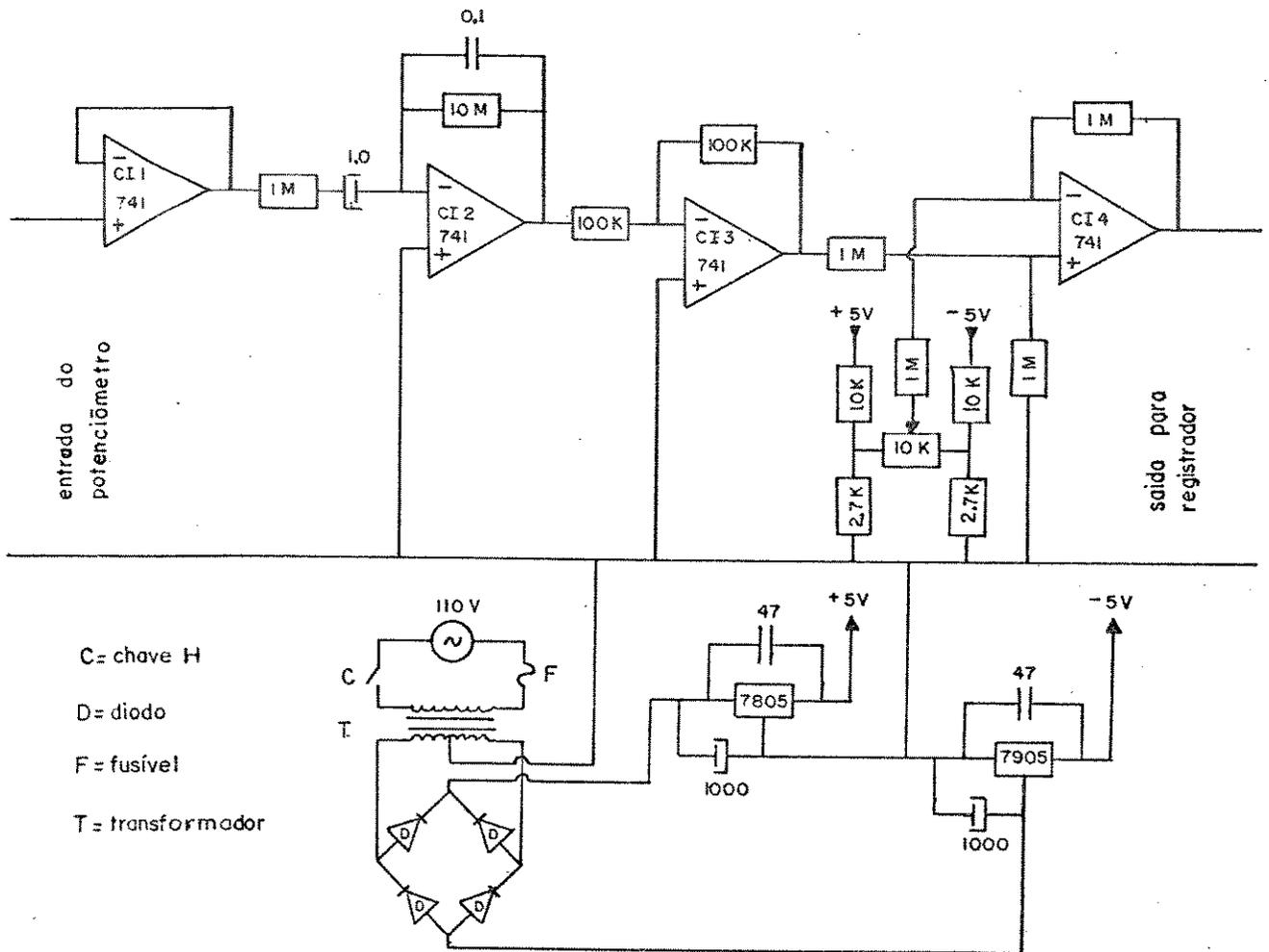


Figura VI.3. Circuito eletrônico do derivador (valores dos resistores em Ω e dos capacitores em μF).

VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII.1. Calibração da seringa

A calibração da seringa é necessária não somente para se conhecer a sua vazão real, mas também para verificar a homogeneidade do seu êmbolo. A tabela VII.1 mostra os resultados obtidos nesta calibração.

Tabela VII.1. Massas de água obtidas na calibração da seringa, a 20,0 °C; tempo de escoamento : 2,5 min; vazão nominal do propulsor : 0,40 ml.min⁻¹.

escala da seringa	massa de H ₂ O (g)			
7-6	0,99494	0,99220	0,99974	0,97391
6-5	0,99680	1,01323	0,99376	1,00580
5-4	1,00409	1,00399	0,99474	1,01713
4-3	0,98949	0,99737	0,98948	0,99244
3-2	0,98135	0,99236	0,98331	0,98943
2-1	0,98797	0,98259	0,98986	0,98896

A verificação da homogeneidade do êmbolo da seringa foi feita através de análise de variâncias¹⁴² (one-way analysis of variance).

Inicialmente foi aplicado o teste Q para cada conjunto de replicatas, sendo que nenhum dado foi rejeitado com um nível de 90% de significância. Em seguida a análise de variâncias foi efetuada, mostrando que a seringa é homogênea com um nível de 99% de significância, fornecendo uma vazão média de 0,398 ± 0,006 ml.

min^{-1} quando o propulsor estiver ajustado para uma vazão nominal de $0,40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Durante a calibração da seringa houve necessidade de se tomar alíquotas de uma determinada seção da mesma, como mostra a tabela VII.1. Entretanto, durante as titulações não existiu essa preocupação, uma vez que a seringa é homogênea em toda a extensão utilizada.

VII.2. Titulações

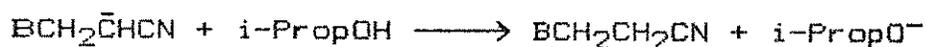
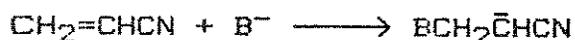
VII.2.1. Titulação Termométrica Catalítica

Na TTC o ponto final da titulação é determinado, como dito anteriormente, pelo rápido aumento de temperatura que ocorre no sistema devido a uma reação exotérmica catalisada por um pequeno excesso de titulante.

Quando se utiliza acrilonitrila como indicador termométrico e KOH em iso-propanol como titulante, o aumento de temperatura no ponto final da titulação é consequência das reações de polimerização aniônica da acrilonitrila:

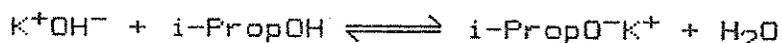


e cianoetilação do iso-propanol¹⁴³:



onde B^- é o catalisador. Na verdade, o aumento de temperatura é devido, principalmente, à reação de cianoetilação do iso-propanol¹⁴⁴, uma vez que a água contida no solvente utilizado e o iso-propanol do titulante, sendo doadores de prótons, impedem o crescimento do polímero de acrilonitrila¹⁴⁵.

Pode-se afirmar que o catalisador B^- dessas reações é o ion iso-propóxido, pois em uma solução diluída de hidróxido de potássio em iso-propanol, a reação:



favorece a formação desse ion^{83,146}. Entretanto, o solvente utilizado contém água que, por outro lado, deve deslocar o equilíbrio no sentido dos ions hidroxila. Independente do catalisador envolvido nas reações de indicação do ponto final, a boa definição deste está diretamente relacionada com a velocidade dessas reações. Essa velocidade e, portanto, o rápido aumento de temperatura dependem da eficiência do catalisador. A água tem um efeito adverso na velocidade da reação, uma vez que solvata os ions hidroxila (ou iso-propóxido), diminuindo a sua atividade catalítica. Entretanto, o DMSO, um solvente dipolar aprótico protofílico, solvata fracamente os ânions, aumentando assim a atividade catalítica dos ions hidroxila (ou iso-propóxido).

Neste sentido, Godinho e Greenhow¹³⁹ investigaram a interação entre DMSO-H₂O através de TTC, utilizando acrilonitrila como indicador termométrico. Embora não tenha sido o objetivo principal do trabalho, pode ser notado através dos resultados obtidos pelos autores que a maior velocidade das reações de indicação do ponto final ocorre quando os solventes DMSO e água estão na proporção molar mínima de 2:1. Como neste trabalho a água tem a função de possibilitar a solubilização das proteínas para a realização das titulações, a proporção de solventes foi mantida através do uso de 7,0 ml de DMSO e 0,8 ml de água. A quantidade de acrilonitrila utilizada (4,0 ml) proporciona uma maior velocidade nas reações de indicação do ponto final, sem interferir na estequiometria das titulações realizadas¹⁴⁷.

O ponto final da TTC tem sido localizado de diferentes maneiras^{69,75,79,84,148}. A figura VII.1 mostra a curva típica obtida na titulação da arginina e as respectivas formas de se localizar o seu ponto final. O ponto final tomado logo que se inicia o aumento de temperatura (1 - início do aquecimento) se justifica baseado no argumento de que a reação indicativa do ponto final começa com um pequeno excesso do titulante; os tomados como a intersecção das tangentes traçadas nos dois "braços" da curva de titulação (2 - extrapolação) ou como o ponto no qual a tangente traçada no "braço" relativo à reação indicativa deixa de coincidir com a curva (3 - tangente) se baseiam no fato de que as reações de neutralização e indicativa se processam simultaneamente próximo ao ponto final da titulação. Portanto, a localização do ponto final em TTC é feita de maneira empírica e depende da amos-

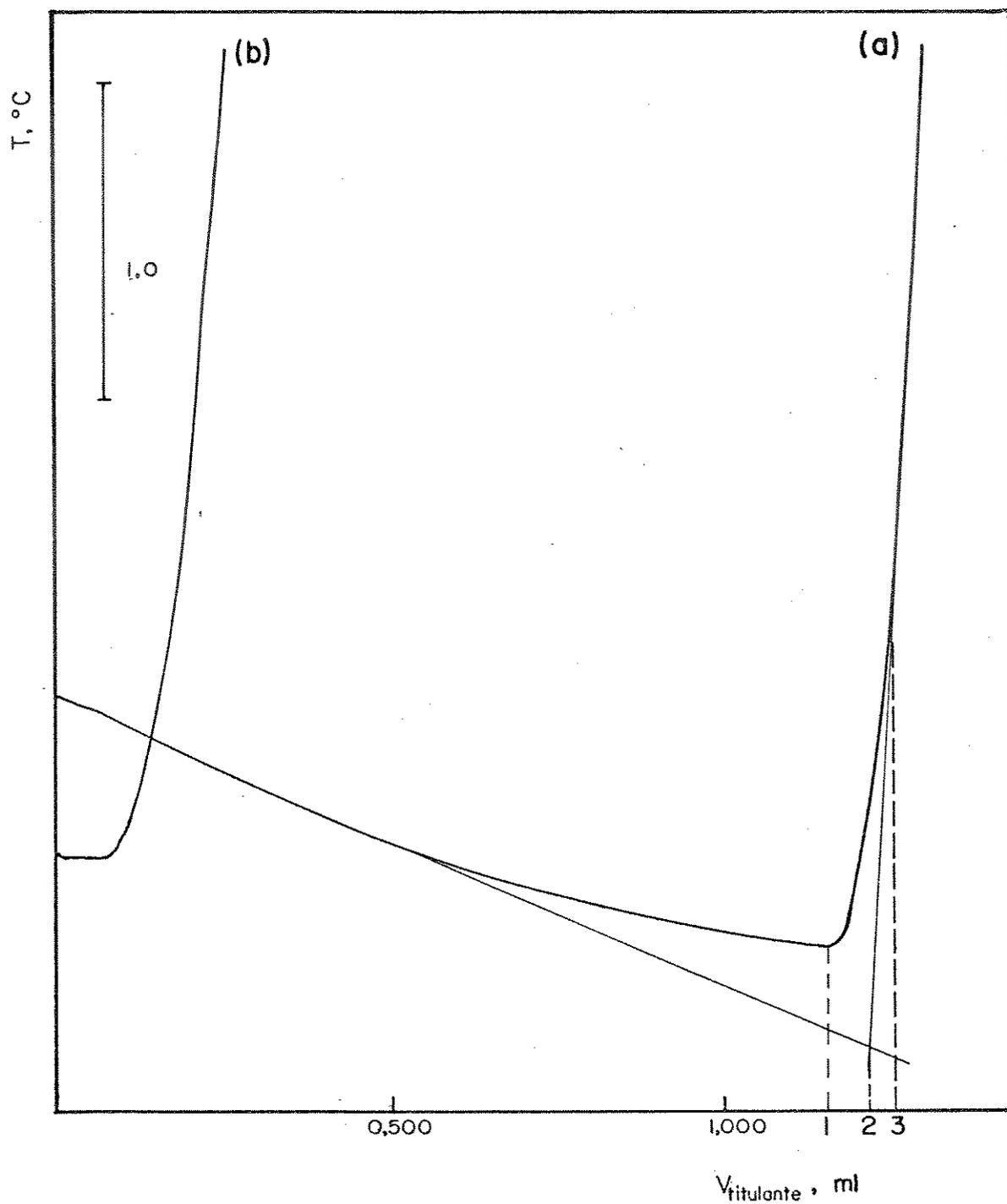


Figura VII.1. Localização do ponto final em TTC. Titulações de 12,08 mg de Arg com KOH $0,1047 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (a); e do branco: 7,0 ml de DMSO, 0,8 ml de H_2O e 4,0 ml de AN (b).

tra titulada, do solvente, do titulante e, conseqüentemente, da forma da curva obtida.

Para se localizar o ponto final da TTC das proteínas foram realizadas titulações de arginina, cuja curva típica é mostrada na figura VII.1, e os resultados obtidos relacionados na tabela VII.2.

Tabela VII.2. Número de grupos* ácidos titulados em amostra de arginina em função da localização do ponto final.

método	início aqueci/to	extrapolação	tangente
grupos/mol	1,98 ± 0,03	1,96 ± 0,03	1,94 ± 0,03

(*) n^o grupos = (mol KOH gasto / mol aminoácido adicionado); média de 5 determinações ± estimativa do desvio padrão.

Comparando-se esses resultados pode ser verificado que eles não diferem significativamente entre si (90% de confiança), embora o método "início do aquecimento" tenha fornecido o resultado mais exato.

Entretanto, a obtenção de dois grupos ácidos por mol de arginina mostra a possibilidade de se titular o grupo guanidina, um ácido muito fraco, cujo pK_a em água é 12,5²⁴. A arginina, na forma de cloridrato, quando dissolvida na mistura DMSO-H₂O permanece com os grupos amino e guanidina protonados, uma vez que a reação:



está deslocada para a direita pois os grupos citados são os ácidos mais fracos da molécula. Baseado neste equilíbrio, pode-se explicar o resultado obtido, que concorda com o fato do DMSO, sendo protofilico, favorecer a titulação de ácidos muito fracos³¹.

Embora a titulação de arginina não tenha possibilitado nenhuma conclusão segura acerca da localização do ponto final da TTC, isso foi possível através da titulação da lisozima.

A tabela VII.3 mostra os resultados obtidos na titulação dessa proteína em função da massa titulada e forma de localização do ponto final e a figura VII.2 mostra as curvas de titulação em função da massa de proteína titulada. Exceto para 10 mg, houve a precipitação da proteína durante a titulação e sua ressolubilização antes do ponto final, fenômeno que não interferiu nos resultados.

Tabela VII.3. Número de grupos ácidos titulados em amostra de lisozima* em função da massa titulada e localização do ponto final.

massa (mg)	grupos / mol		
	início aqueci/to	extrapolação	tangente
10**	22,6 ± 0,2	27,5 ± 0,8	28,8 ± 1,4
20***	23,6 ± 0,7	28,1 ± 0,6	29,6 ± 1,0
40***	23,1 ± 0,4	28,7 ± 0,6	31,2 ± 0,7
60***	23,1 ± 0,5	28,3 ± 1,0	31,2 ± 1,4
80**	22,6 ± 0,4	28,3 ± 0,2	31,3 ± 0,1

(*) peso molecular = 14.307 g/mol 5.

(**) média de 3 determinações ± estimativa do desvio padrão.

(***) média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão.

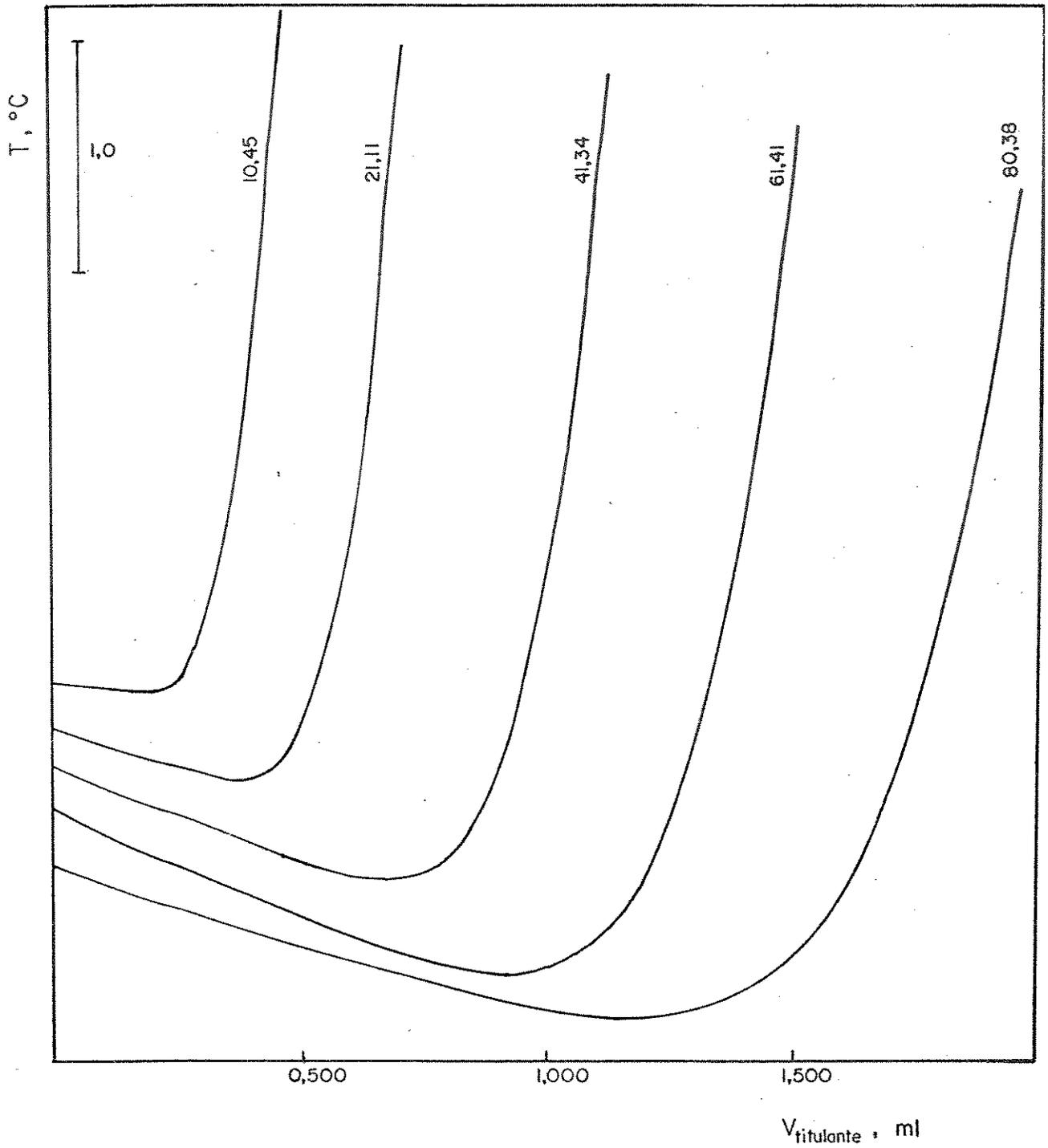


Figura VII.2. Curvas de TTC de lisozima com $\text{KOH } 0,1047 \text{ mol.l}^{-1}$ em iso-propanol (o número ao lado de cada curva é referente à massa titulada de proteína, em mg).

A variação da massa de proteína titulada permite concluir que o iso-propanol adicionado através do titulante não interfere na estequiometria, pois não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelo mesmo método de localização do ponto final.

A titulação potenciométrica da lisozima desnaturada em uréia 9,30 mol.l⁻¹ mostrou a existência de 10,3 grupos ácidos por mol de proteína^{5*}. Quando este resultado é comparado com os mostrados na tabela VII.3, verifica-se que qualquer método de localizar o ponto final da titulação fornece resultados altos. Entretanto, a lisozima possui 11 grupos guanidina¹⁴⁹ que não são detectados através de titulação potenciométrica em água mas que podem ser determinados por TTC em mistura DMSO-H₂O. Dessa forma, o número de grupos obtidos quando se toma como ponto final da titulação o início do aquecimento concorda razoavelmente com o número total de grupos ácidos (10,3 + 11) existentes na lisozima.

Como a mistura entre DMSO e água é fortemente exotérmica, as titulações foram efetuadas assim que a temperatura das soluções de proteína retornou à ambiente, o que significou um período de 20 minutos após o preparo das amostras. Entretanto, na titulação

(*) como as titulações no referido trabalho foram feitas em soluções previamente aciduladas com excesso de ácido clorídrico, o número de grupos ácidos da proteína foi calculado a partir das seguintes equações:

grupos ácidos = grupos totais - grupos básicos

grupos básicos = $\frac{\text{mol HCl adicionado} - \text{mol HCl restante}}{\text{mol proteína titulada}}$

da proteína logo após o seu preparo foram obtidos $22,6 \pm 1,6$ grupos ácidos por mol (média de 6 determinações), mostrando que embora o tempo de espera não influencie a estequiometria, ele afeta diretamente a precisão das medidas.

De maneira análoga foram efetuadas titulações de ovalbumina e os resultados estão apresentados na tabela VII.4. A ovalbumina desnaturada em uréia $8,0 \text{ mol.l}^{-1}$ possui 39,1 grupos ácidos tituláveis⁵ e 15 grupos guanidina¹⁵⁰ não detectados potenciométricamente. Como foram obtidos 47,6 grupos ácidos por mol de proteína, apenas uma parte dos grupos guanidina foram titulados, uma vez que o número total de grupos é de aproximadamente 54 ($39,1+15$). Esse resultado indica que há diferença entre os grupos guanidina. Alguns grupos (6 a 7) não devem estar acessíveis para neutralização ou então possuem uma velocidade de neutralização menor que a dos outros. Os resultados obtidos por titulação potenciométrica e que serão apresentados no tópico seguinte mostraram que a segunda hipótese é verdadeira. A obtenção de $48,8 \pm 1,5$ grupos ácidos por mol de ovalbumina (média de 5 determinações) quando a titulação foi feita logo após o preparo da amostra mostrou, como no caso da lisozima, que este procedimento afeta diretamente a precisão das medidas e não a estequiometria da reação.

Tabela VII.4. Números de grupos ácidos titulados na ovalbumina* em função da localização do ponto final.

método	início aqueci/to	extrapolação	tangente
grupos/mol **	$47,6 \pm 0,6$	$58,8 \pm 1,1$	$63,2 \pm 2,2$

(*) peso molecular = 42.699 g/mol ⁵.

(**) média de 5 determinações \pm estimativa do desvio padrão.

VII.2.2. Titulação Potenciométrica

VII.2.2.1. O eletrodo de alumínio

A construção do eletrodo de alumínio para utilização como indicador nas titulações de proteínas foi baseada no fato de que este eletrodo tem uma variação de potencial no ponto final da titulação muito maior que vários outros, inclusive o de vidro⁹⁶.

A figura VII.3 mostra as curvas obtidas nas titulações de ácido benzóico, utilizando eletrodo de alumínio e de vidro. A figura VII.4 mostra a curva de 1ª derivada obtida com o eletrodo de alumínio.

Pode ser notado através da figura VII.3 que o eletrodo de alumínio, apesar de ter uma variação de potencial maior que o eletrodo de vidro, apresenta uma menor inclinação principalmente na região alcalina da curva. Uma explicação para este fato é que o oxigênio dissolvido na solução desloca o potencial do eletrodo para valores menos negativos quando em meio alcalino¹⁵¹. Entretanto, a titulação do branco deve minimizar o possível erro introduzido por essa menor inclinação (além de descontar as impurezas dos solventes) e como consequência foram obtidos $1,02 \pm 0,05$ grupos ácidos por mol de ácido benzóico (média de 7 determinações) através de cálculos feitos a partir das curvas de 1ª derivada (figura VII.4).

Apesar do bom resultado conseguido na titulação, o polimento do eletrodo com lixa d'água não é o tratamento suficiente para o seu bom desempenho, pois somente após a primeira titulação o ele-

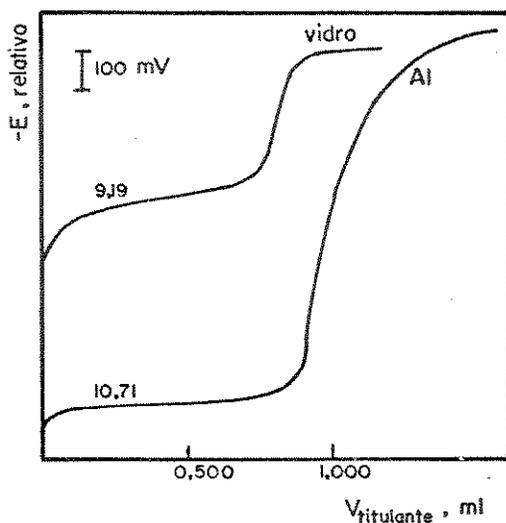


Figura VII.3. Titulações de ác. benzóico com $\text{KOH } 0,1047 \text{ mol.l}^{-1}$. Eletrodo de referência: fio de Ni-Cr imerso no titulante (o número acima de cada curva é referente à massa do ácido titulado, em mg).

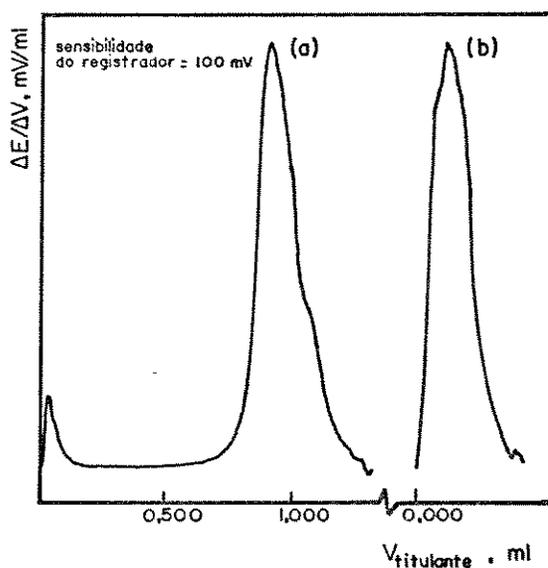
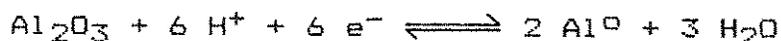


Figura VII.4. 1ª derivada das curvas de titulações de 10,05 mg de ácido benzóico com $\text{KOH } 0,1045 \text{ mol.l}^{-1}$ (a) e do branco (b). Par de eletrodos Al x Ni-Cr.

trodo respondeu de maneira adequada. Os resultados indicaram que esta titulação é necessária para se obter o bom condicionamento do eletrodo. Apesar de existirem outros métodos para tratamento da superfície do eletrodo, tal como eletrólise anódica¹⁵², tratamento com edta em ácido acético seguido de polarização anódica e catódica¹⁵¹, o procedimento adotado foi seguido em virtude do bom resultado obtido na titulação do ácido benzóico.

Ao contrário do que ocorre em meio alcalino, o potencial do eletrodo de alumínio não é muito reproduzível em meio ácido, havendo variações entre os potenciais iniciais das titulações. Esta irreproduzibilidade e até mesmo a estabilidade estão diretamente relacionadas com o mecanismo de resposta do eletrodo. A sua superfície é recoberta por uma fina camada de óxido de alumínio e, baseado neste fato, Greenhow e Al-Mudarris⁹⁶ propuseram que a resposta fosse governada da mesma forma que a do eletrodo de antimônio¹⁵³. Como os autores trabalharam em meio anidro, a maior variação de potencial para o eletrodo de alumínio foi justificada através da formação de água na reação de neutralização, uma vez que a reação no eletrodo é:

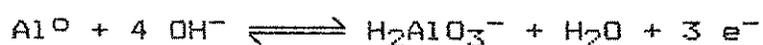


e a equação de Nernst se torna:

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{H}^+}}{(a_{\text{H}_2\text{O}})^{1/2}}$$

pois a atividade da água não é constante durante a titulação. Entretanto, o mecanismo proposto não deve estar correto pois neste trabalho a atividade da água se mantém praticamente constante durante a titulação e, da mesma forma, o eletrodo de alumínio apresentou uma maior variação de potencial que o de vidro. Na verdade, mesmo em solução aquosa o eletrodo de alumínio tem uma maior variação de potencial que o eletrodo de vidro¹⁵².

Por outro lado, Kolthoff e Sambucetti¹⁵¹ verificaram que em meio aquoso alcalino o eletrodo de alumínio é sensível aos íons hidroxila e assumiram que a reação que determina o seu potencial é:



e que, portanto, pode ser a responsável pela grande variação de potencial obtida com o eletrodo.

Apesar dos mecanismos propostos, o caráter anfótero do alumínio e seu óxido não permitiu a elucidação deste fato que ainda é motivo de questionamento¹⁵⁴ e foge do objetivo principal desta tese.

VII.2.2.2. A escolha do par de eletrodos

A forma da curva e a variação de potencial nas titulações em meio não aquoso podem ser determinadas pelo par de eletrodos utilizado¹⁵⁵. Nesse sentido, foi efetuado um estudo sobre o de-

sempenho do par de eletrodos e os resultados obtidos estão apresentados na figura VII.5.

Embora todas as curvas sejam semelhantes até a titulação do primeiro grupo ácido da arginina, existem diferenças acentuadas após este ponto.

As curvas obtidas com os pares vidro x ECS e vidro x Ag/AgCl-dupla junção não foram reprodutíveis e mostraram anomalias em meio alcalino. Apesar do ECS ser utilizado em meio parcialmente aquoso¹³¹ e do eletrodo de Ag/AgCl-dupla junção estar preenchido com solução de um sal de amônio quaternário (eletrólito externo) como recomendado¹⁵⁶, essas anomalias foram devido aos eletrodos de referência. O emprego do fio de níquel-cromo imerso no titulante garante o potencial constante do eletrodo, pois ele se encontra em um meio definido e invariável, estando livre de contaminação⁹⁶. Desta forma, foi possível a obtenção de curvas reprodutíveis, como as mostradas na figura VII.5, quando foi utilizado o eletrodo de Ni-Cr como referência.

Quando são comparadas as curvas obtidas com os eletrodos de vidro e alumínio verifica-se a grande variação de potencial proporcionada por este último, que pode ser explicada pelo que foi exposto no item anterior. Entretanto, a variação de potencial obtida com o eletrodo de vidro na titulação do segundo grupo da arginina foi muito pequena e pode ser devido à resposta lenta do eletrodo em DMSO, quando em meio alcalino³¹. Portanto, parece que o eletrodo de alumínio é o mais indicado para a titulação de ácidos muito fracos como o grupo guanidina da arginina.

Em virtude dos resultados obtidos foram utilizados nas titu-

lações de proteínas os eletrodos de vidro e alumínio como indicadores e o fio de Ni-Cr imerso no titulante como referência.

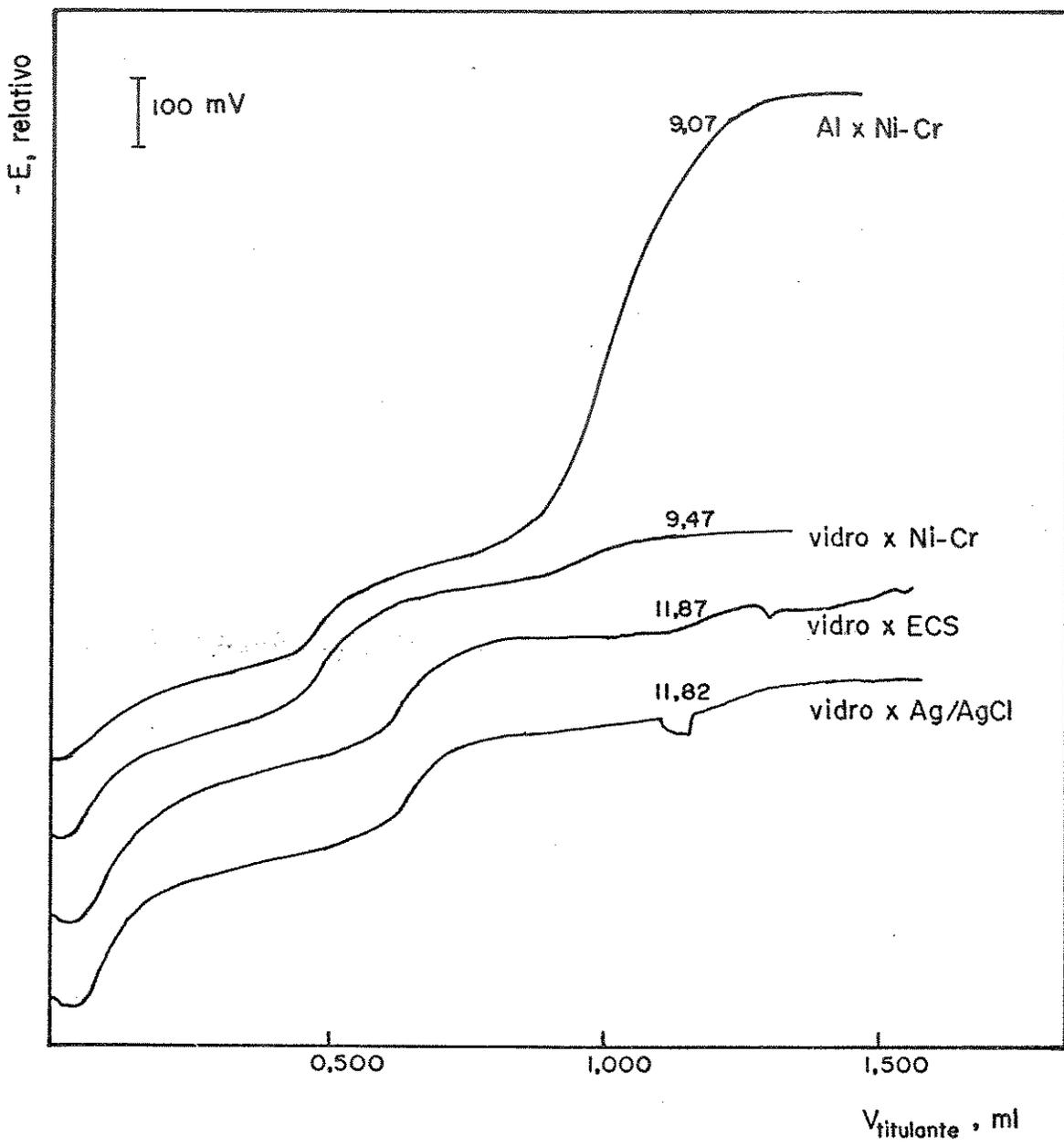


Figura VII.5. Forma da curva obtida na titulação de Arg com KOH 0,1047 mol.l⁻¹, em função do par de eletrodos utilizados (o número acima de cada curva é referente à massa de aminoácido titulado, em mg).

VII.2.2.3. Titulação das proteínas

Ao contrário da TTC, a potenciometria possibilita a determinação tanto dos grupos ácidos como dos grupos básicos presentes nas proteínas.

Na determinação dos grupos ácidos a titulação foi feita como na TTC, exceto que não foi adicionada acrilonitrila no solvente da amostra.

A figura VII.6 mostra as curvas de primeira derivada das titulações de arginina quando foram utilizados eletrodos de vidro e alumínio como indicadores. O volume de titulante gasto na prova em branco, quando foi empregado o eletrodo de alumínio, foi aproximadamente 2,5 vezes maior que com o uso de eletrodo de vidro. Esta discrepância deve ser em função do eletrodo de alumínio apresentar uma menor inclinação no ponto final da titulação, como dito anteriormente.

A dificuldade proveniente deste fato surge no cálculo do número de grupos do aminoácido e na estimativa da força ácida das impurezas.

A tabela VII.5 mostra os resultados obtidos e o valor de $0,79 \pm 0,03$ grupos ácidos por mol de arginina salienta a dificuldade supra citada quando foi utilizado o eletrodo de alumínio. Entretanto, a obtenção de $0,99 \pm 0,01$ grupos quando empregado o eletrodo de vidro e descontada a prova em branco não deixa dúvidas em relação à força das impurezas no solvente. Tais impurezas são ácidos mais fortes que o grupo amino da arginina, que é o primeiro grupo a ser titulado. O segundo grupo titulado é o gua-

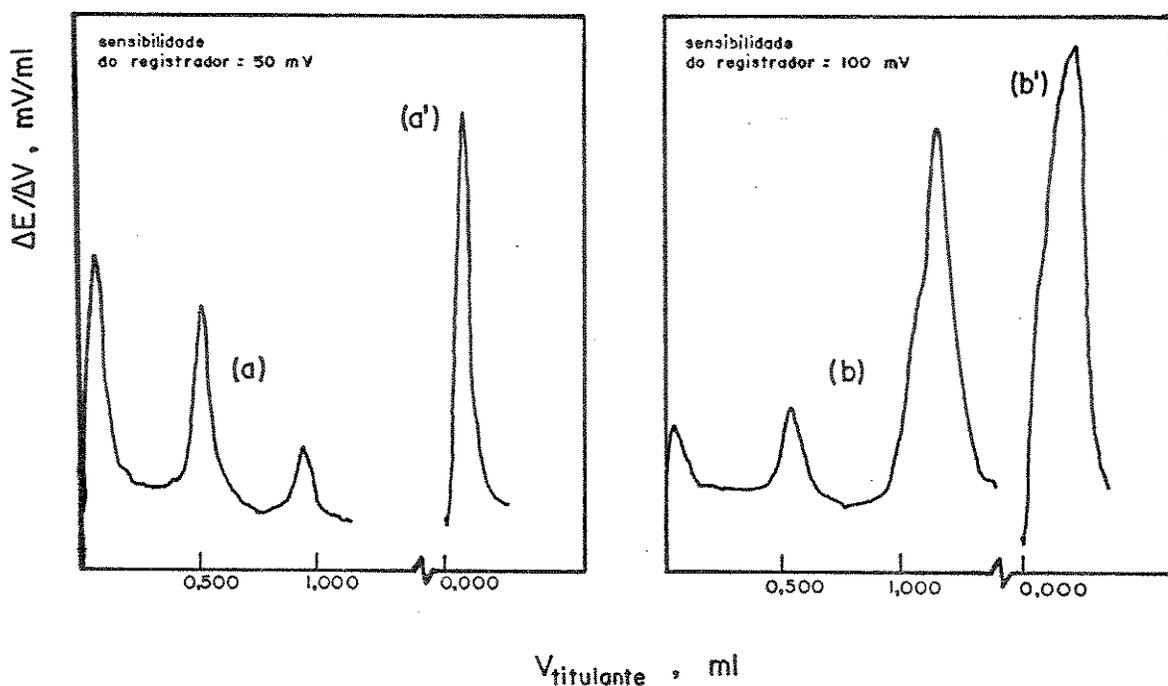


Figura VII.6. Titulações potenciométricas de Arg com KOH.

a. vidro x Ni-Cr; 9,30 mg; $0,1045 \text{ mol.l}^{-1}$; b. Al x Ni-Cr; 9,82 mg; $0,0995 \text{ mol.l}^{-1}$; a' e b'. brancos

nidina, um ácido muito fraco que não pode ser determinado potenciométricamente em água ($\text{pK}_a = 12,5$) e nem mesmo em misturas piridina-água e acetonitrila-água¹.

Tabela VII.5. Número de grupos ácidos titulados em amostra de arginina.

eletrodo indicador	1º grupo	1º grupo*	2º grupo*
Al**	$1,13 \pm 0,04$	$0,79 \pm 0,03$	$2,06 \pm 0,06$
vidro***	$1,14 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,01$	$2,01 \pm 0,01$

(*) descontada a titulação do branco.

(**) média de 6 determinações \pm estimativa do desvio padrão.

(***) média de 5 determinações \pm estimativa do desvio padrão.

Logo, a obtenção de 2 grupos/mol de arginina, com ambos os eletrodos, indica a possibilidade de se titular os grupos guanidina da lisozima e ovalbumina. As figuras VII.7 e VII.8 mostram as curvas de titulação dessas proteínas quando foram utilizados eletrodos de vidro e alumínio como indicadores. A tabela VII.6 mostra os resultados obtidos nessas titulações, onde pode ser notado que o emprego do eletrodo de vidro possibilita a determinação dos grupos guanidina apenas da ovalbumina, pois o valor encontrado concorda com o obtido em uréia⁵, acrescido do número de grupos guanidina. Por outro lado, esses grupos não são titulados na lisozima. As hipóteses de complexidade da proteína e carga líquida sobre a molécula como explicação para o resultado obtido foram descartadas, pois a lisozima tem um peso molecular menor que o da ovalbumina (14.307 x 42.699) e uma carga líquida também menor ao se iniciar a titulação dos grupos guanidina (2 x 46 cargas negativas). Como esses grupos estão acessíveis para a neutralização, uma vez que foi possível determiná-los através de TTC,

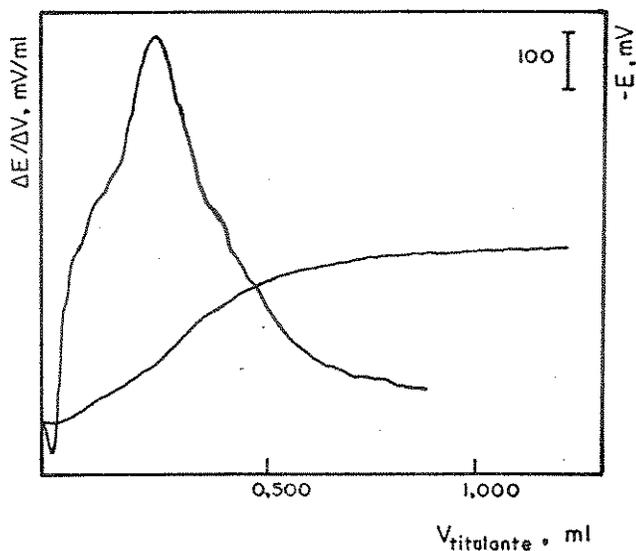
Tabela VII.6. Número de grupos ácidos titulados em amostras de lisozima e ovalbumina.

amostra	grupos ácidos / mol			grupos guanidina
	eletrodo vidro	eletrodo alumínio	ref. 5	
lisozima	11,4 ± 0,5**	31,6 ± 1,3*	10,3	11
ovalbumina	52,3 ± 1,5***	77,5 ± 2,4***	39,1	15

(*) média de 6 determinações ± estimativa do desvio padrão.

(**) média de 5 determinações ± estimativa do desvio padrão.

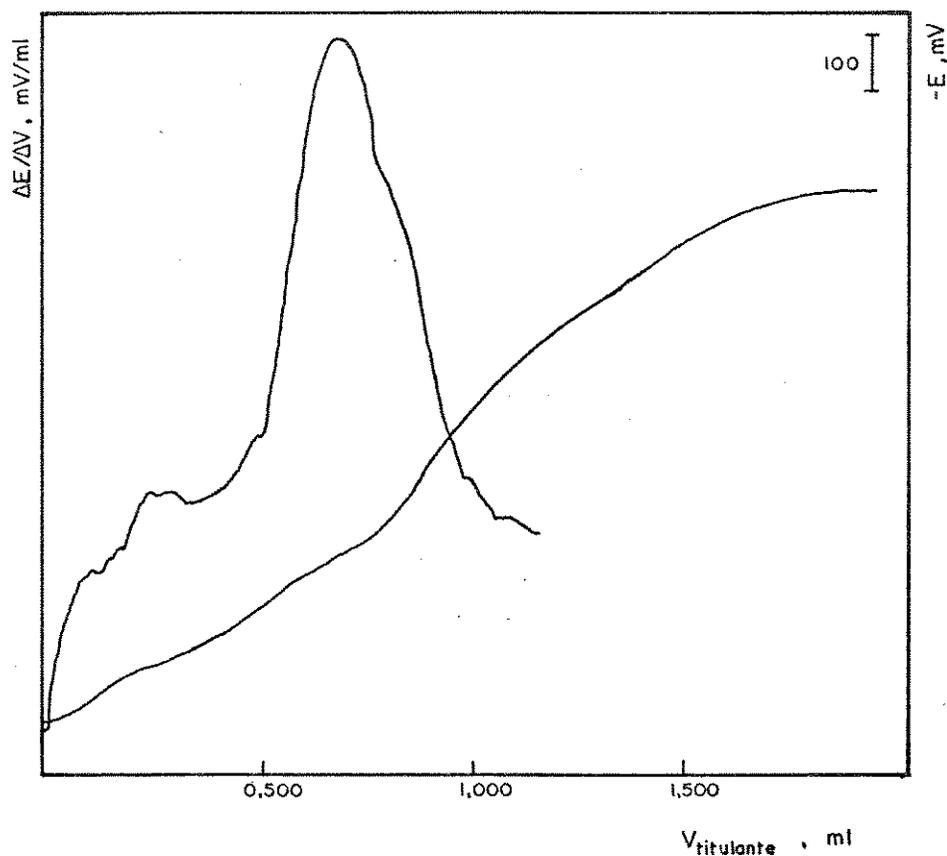
(***) média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão.



eletrodos: vidro x Ni-Cr

curva clássica: $m_{\text{prot.}} = 33,53 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,1047 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg. = 200 mV

1^{a} derivada : $m_{\text{prot.}} = 19,99 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,0995 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg. = 50 mV

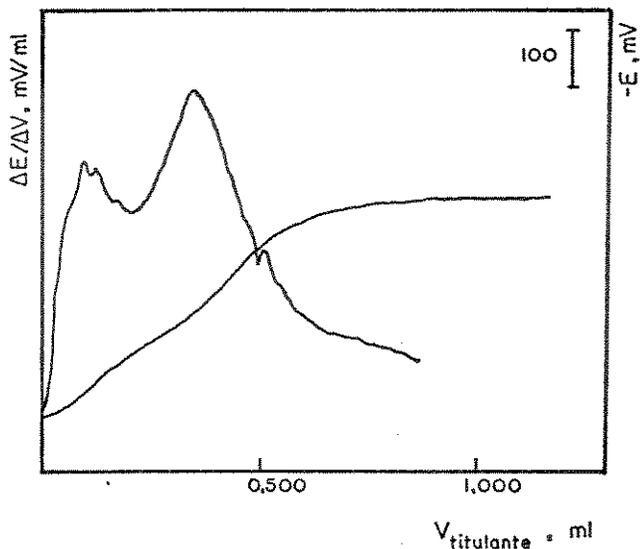


eletrodos: Al x Ni-Cr

curva clássica:
 $m_{\text{prot.}} = 31,52 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,1047 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg. = 200 mV

1^{a} derivada:
 $m_{\text{prot.}} = 21,02 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,0995 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg. = 50 mV

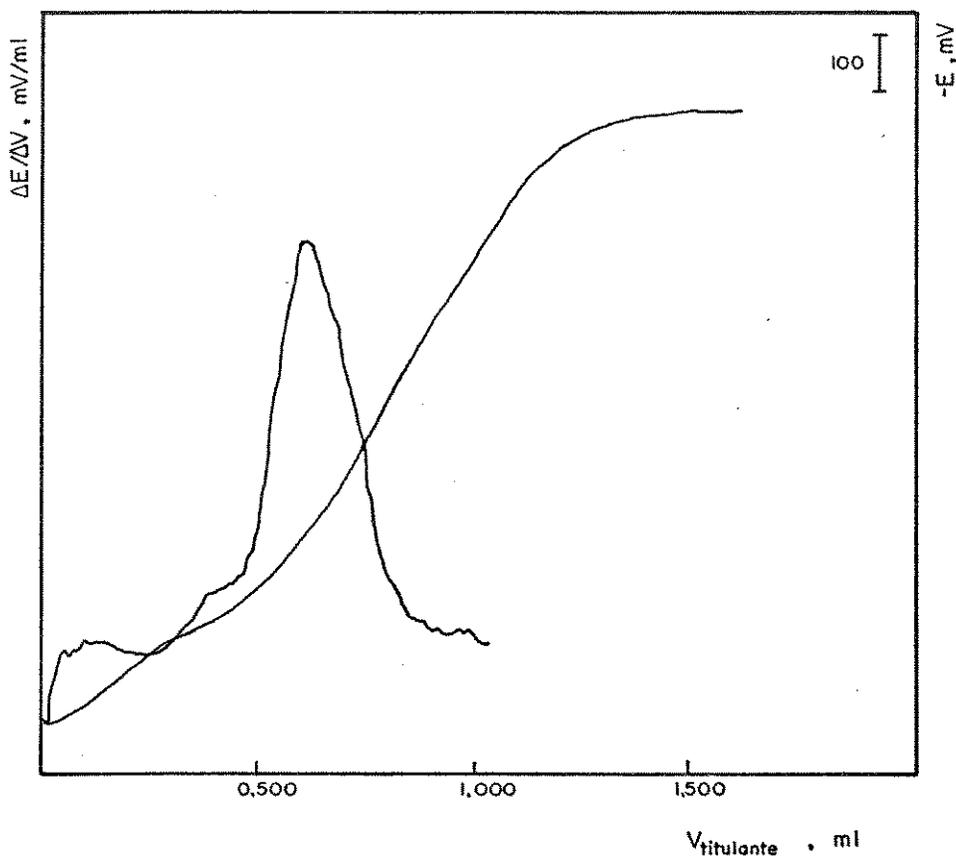
Figura VII.7. Curvas de titulações de lisoizima com KOH.



eletrodos : vidro x Ni-Cr

curva clássica: $m_{\text{prot.}} = 32,74 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,1047 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg = 200 mV

1ª derivada : $m_{\text{prot.}} = 21,47 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,0995 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg = 50 mV



eletrodos : Al x Ni-Cr

curva clássica:
 $m_{\text{prot.}} = 32,60 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,1047 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg. = 200 mV

1ª derivada :
 $m_{\text{prot.}} = 20,21 \text{ mg}$
 $\text{KOH} = 0,0995 \text{ mol.l}^{-1}$
 sens. reg. = 100 mV

Figura VII.B. Curvas de titulações de ovalbumina com KOH.

pode-se dizer que os grupos guanidina da lisozima são ácidos mais fracos que os da ovalbumina. Na tentativa de assemelhar o solvente da titulação potenciométrica ao da TTC, foram adicionados 4,0 ml. de acetonitrila para a titulação da lisozima. Neste caso, foram determinados $11,9 \pm 0,2$ grupos (média de 3 determinações), resultado este que concorda com o obtido por Gündüz e colaboradores¹ e confirma que os grupos guanidina da lisozima são ácidos muito fracos que não são titulados potenciometricamente.

Com o emprego do eletrodo de alumínio foram obtidos resultados bastante altos. O interessante é que para ambas as amostras foi encontrado um excesso de aproximadamente 45 % dos grupos esperados (soma dos grupos da referência 5 e grupos guanidina). É muito difícil propor uma explicação para estes resultados uma vez que não se tem dados suficientes para supor um erro sistemático positivo de 45 %. Todavia, as curvas obtidas com o eletrodo de alumínio não foram muito reprodutíveis e a presença deste, nas titulações onde o eletrodo de vidro foi utilizado como indicador, foi causa de irreprodutibilidade das curvas de titulação, dificultando e até mesmo inviabilizando a localização do ponto final. Esses fatos indicam uma provável adsorção das proteínas na superfície do eletrodo de alumínio tornando lenta a sua resposta, o que, de certa forma, explica os altos valores encontrados.

Em vista dos resultados obtidos com o eletrodo de alumínio na determinação dos grupos ácidos das proteínas e associado ao fato desse eletrodo responder a íons cloreto¹⁵⁷, somente o eletrodo de vidro foi utilizado na determinação dos grupos totais das proteínas, uma vez que às amostras tituladas era adicionado

um excesso de ácido clorídrico.

A figura VII.9 mostra a 1ª derivada da curva de titulação da arginina onde são titulados o excesso de ácido clorídrico e os grupos carboxílico, amino e guanidina, nesta ordem.

A tabela VII.7 mostra os resultados obtidos na titulação da arginina. A princípio parece que o solvente possui impurezas ácidas mais fortes e mais fracas que o grupo amino, pois foram titulados apenas 1,94 grupos, quando descontada a prova em branco. Entretanto, foi mostrado anteriormente, que as impurezas são mais fortes que o grupo amino, o que é confirmado pela obtenção de apenas 2,96 grupos na arginina. Tais resultados, abaixo do esperado, podem ser devido à dificuldade de se eliminar totalmente o dióxido de carbono dissolvido no DMSO ao ser feita a titulação do branco. Um aumento no valor do branco fornecerá resultados mais baixos pois não haverá CO_2 na amostra em virtude do excesso de ácido. Entretanto, o erro introduzido na análise devido ao dióxido de carbono dissolvido é desprezível quando se trata de proteínas.

Tabela VII.7. Número de grupos titulados em amostra de arginina em excesso de ácido clorídrico.

	1º grupo (-COOH)	2º grupo (-NH ₄ ⁺)	2º grupo (*)	3º grupo (guanidina)	3º grupo (*)
número de grupos**	1,01±0,01	2,08±0,02	1,94±0,02	3,09±0,04	2,96±0,03

(*) descontada a prova em branco.

(**) média de 6 determinações ± estimativa do desvio padrão.

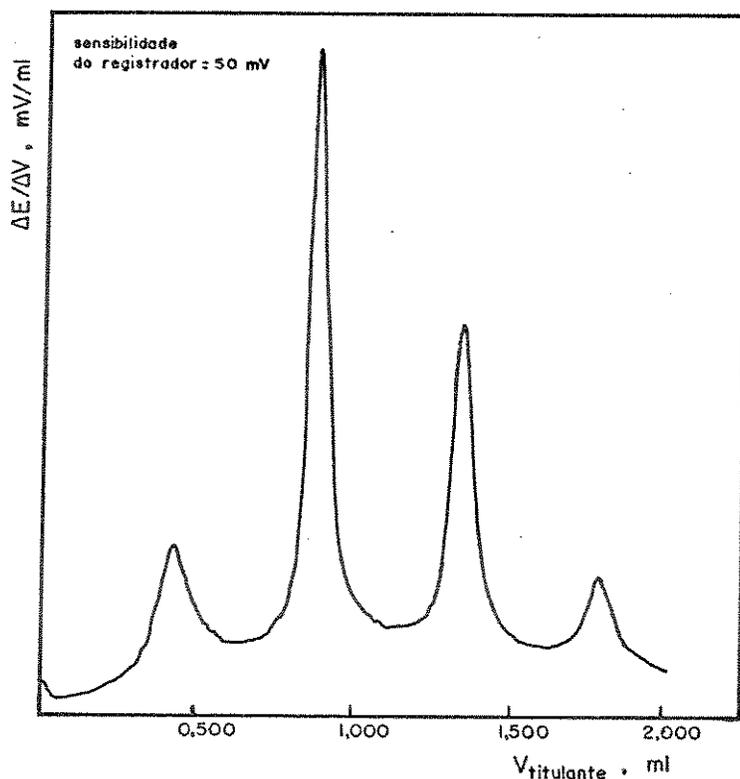


Figura VII.9. 1ª derivada da curva de titulação da mistura de 9,11 mg de Arg e 0,809 ml de HCl $0,1018 \text{ mol.l}^{-1}$ com KOH $0,0995 \text{ mol.l}^{-1}$.

A figura VII.10 mostra as curvas de 1ª derivada das titulações de lisozima e ovalbumina em excesso de ácido. Em ambas as curvas existem três picos, sendo o primeiro referente ao excesso de ácido adicionado. Aos outros dois pode-se reportar, com as devidas restrições, como referentes à neutralização dos grupos ácidos e básicos. A tabela VII.8 relaciona os resultados obtidos nessas titulações.

Na titulação da lisozima foram determinados 22,7 grupos por mol, que concorda com o resultado obtido em uréia⁵. Como esperado, os grupos guanidina não foram titulados e como a lisozima

Tabela VII.8. Número de grupos titulados em amostras de lisozima e ovalbumina.

	grupos totais	grupos ácidos	grupos básicos (total-ácido)	ref. 5
lisozima*	22,7 ± 0,8	8,7 ± 0,8	14,0 ± 1,6	20,7
ovalbumina**	97,0 ± 2,1	42,2 ± 2,2	54,8 ± 4,3	88,5

(*) média de 7 determinações ± estimativa do desvio padrão.

(**) média de 5 determinações ± estimativa do desvio padrão.

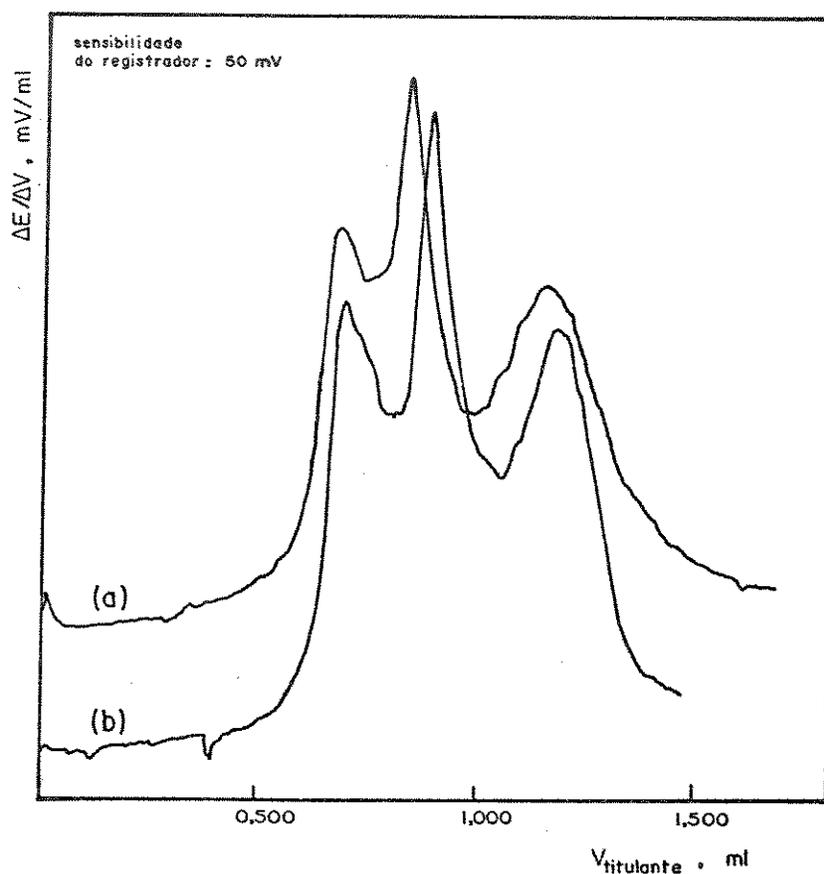


Figura VII.10. Curvas de 1ª derivada das titulações de 25,69 mg de lisozima (a) e 19,09 mg de ovalbumina (b) em excesso de ácido (0,809 ml de HCl 0,1018 mol.l⁻¹) com KOH 0,0995 mol.l⁻¹.

possui dez grupos carboxílicos, a obtenção de 8,7 grupos ácidos indica que um ou dois grupos carboxílicos devem ser mais fracos que os demais no solvente utilizado.

Na titulação da ovalbumina era esperada a obtenção de 103 a 104 grupos, uma vez que os 15 grupos guanidina são titulados além dos determinados em uréia⁵. Entretanto, a titulação dessa proteína nativa em solução aquosa previamente acidulada e força iônica $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ mostrou que alguns (5-7) grupos carboxílicos são suficientemente fortes, sendo titulados juntos com o ácido clorídrico em excesso¹⁵⁸. Como a ovalbumina possui 47 grupos carboxílicos, a determinação de 42,2 grupos ácidos indica que 5 desses grupos são titulados com excesso de ácido forte e, portanto, a obtenção de 97 grupos por mol de proteína concorda com o esperado.

VIII. CONCLUSÃO

A titulação em meio não aquoso ou parcialmente aquoso possibilita a determinação de ácidos e bases muito fracos em água. No presente trabalho, a titulação da ovalbumina e lisozima na mistura DMSO-água (7,0:0,8 ml) tornou possível a determinação dos grupos guanidina dessas proteínas, um ácido muito fraco em água ($pK_a = 12,5$) e, portanto, não titulado neste meio.

A comparação dos resultados obtidos através da titulação potenciométrica e da TTC permitiu mostrar que os grupos guanidina da lisozima são ácidos mais fracos que os da ovalbumina pois são determinados somente por TTC e que devem existir diferenças entre os grupos guanidina da ovalbumina. Estes resultados sugerem que outras investigações devem ser efetuadas no intuito de se obter informações mais refinadas a respeito da estrutura dessas proteínas na mistura DMSO-água. Por exemplo, o número de grupos tituláveis e seus respectivos pK 's podem ser determinados através de linearização das curvas de titulação¹⁵⁹. Como a mistura 80 % DMSO -20 % água (p/p) possui características que favorecem as titulações potenciométricas¹³⁰, as proteínas podem ser estudadas nesse meio caso não se consiga bons resultados com a mistura usada neste trabalho. Este estudo, inevitavelmente, também fornecerá informações que contribuirão no entendimento das ações farmacológicas do DMSO.

A titulação termométrica catalítica é um método simples e barato para a determinação de ácidos e bases. Fundamentalmente o problema para a obtenção de resultados coerentes está relacionado

com a escolha de um indicador termométrico cineticamente adequado e com a localização do ponto final da titulação. Na titulação das proteínas o ponto final foi encontrado empiricamente através da comparação dos resultados com o teoricamente esperado. Neste sentido, foi tomado o início de aquecimento do sistema como sendo o ponto final das titulações, o que não significa que este procedimento deve ser seguido na análise de outras amostras. Este fato caracteriza uma desvantagem do método, que só será eliminada quando houver a possibilidade de se construir a curva teórica de titulação. Os esforços que têm sido feitos na elaboração da teoria das titulações catalíticas não foram ainda estendidas à TTC. Como as cinéticas de neutralização e da reação indicativa devem ser conhecidas para se traçar uma curva teórica de titulação e assumindo que as velocidades das reações se alteram em virtude de pequenas mudanças no solvente da titulação, pode-se concluir que a determinação do ponto final em TTC deverá ser feita empiricamente por um bom período de tempo, exceto para casos muito particulares.

Quanto à aparelhagem utilizada na TTC há a possibilidade de serem efetuadas duas alterações. A primeira é o emprego de cristais líquidos colestéricos em substituição ao conjunto termistor-ponte de Wheatstone-registrador para ser determinado o ponto final da titulação. Esses cristais líquidos são termocrômicos e já foram utilizados com sucesso na determinação de cafeína e ácido acetil-salicílico⁷⁴, possibilitando a adição manual do titulante através de uma bureta simples. A segunda alteração é a construção de um titulador que poderia ser utilizado nas TTC, cujas curvas

típicas fossem semelhantes às obtidas neste trabalho. Como o ponto final da titulação ocorre em um mínimo de potencial (temperatura) o registrador pode ser substituído por um circuito derivador que controlaria um cronômetro digital. Desta forma, sabendo-se a vazão do titulante e o tempo necessário para se efetuar a titulação, pode-se calcular o volume de titulante adicionado.

A utilização de eletrodos metálicos nas titulações potenciométricas mostrou a possibilidade de se substituir os eletrodos convencionais por outros mais simples e baratos. O eletrodo de referência de níquel-cromo é bastante adequado para as titulações contínuas, superando o desempenho dos eletrodos de calomelano e Ag/AgCl. Por outro lado, o eletrodo de alumínio não pode ser utilizado nas titulações de proteínas da maneira como foi proposto. Talvez outros tipos de tratamento da superfície do eletrodo^{151,152} possam melhorar o seu desempenho ou, então, a utilização de um eletrodo indicador de aço inox¹⁶⁰ forneça resultados coerentes. Entretanto, o eletrodo de alumínio pode ser utilizado na determinação de substâncias menos complexas como o ácido benzoico e arginina. Desta forma os eletrodos de alumínio e níquel-cromo são uma alternativa simples e barata para o ensino de titulação em meio não aquoso nos cursos de graduação em química.

IX. BIBLIOGRAFIA

- (1) T. Gündüz, N. Gündüz, E. Kiliç, F. Köseoglu and S.G. Oztas, *Analyst* 113, 715 (1988).
- (2) S.J. Singer, *Adv. Prot. Chem.* 17, 1 (1962).
- (3) E.D. Rees and S.J. Singer, *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 144 (1956).
- (4) A.L. Lehninger, "Bioquímica", vol. 1, Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1976, p. 42.
- (5) M.C. Silva, "Otimização das condições para titulações potenciométricas de proteínas em soluções concentradas de uréia. Titulações potenciométricas das proteína de Bence Jones (JJO)", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.
- (6) C.N. Pace and H.F. Marshall, Jr., *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 270 (1980).
- (7) C. Tanford, *Adv. Prot. Chem.* 23, 121 (1968).
- (8) T. Asakura, K. Adachi and E. Schwarts, *J. Biol. Chem.* 253, 6423 (1978).
- (9) T.T. Herskovits and H. Jaillet, *Science* 163, 282 (1969).
- (10) S.J. Singer, "Advances in Protein Chemistry", vol. 1, Academic Press, New York, 1962, apud R.J. Ma and C.H. Wang, *J. Phys. Chem.* 87, 679 (1983).
- (11) D. Martin and H.G. Hauthal, "Dimethyl Sulphoxide", John Wiley, New York, 1975, p. 459
- (12) S. Jacob and E.E. Rosenbaum, eds., "Biological Actions of DMSO", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141, (1967).

- (13) S.W. Jacob and R. Herschler, eds., "Biological Actions of Dimethyl Sulfoxide", Ann. N. Y. Acad. Sci. 243, (1975).
- (14) J.C. de la Torre, ed., "Biological Actions and Medical Applications of Dimethyl Sulfoxide", Ann. N. Y. Acad. Sci. 411, (1983).
- (15) S.W. Jacob and R. Herschler, Cryobiology 23, 14 (1986).
- (16) N. Kaharasch and B.S. Thyagarajan, Ann. N.Y. Acad. Sci. 411, 391 (1983).
- (17) T. Gündüz, E. Kiliç, F. Köseoglu and S.G. Oztas, Analyst 113, 1313 (1988).
- (18) I. Molnár-Perl and M. Pintér-Szakács, Anal. Chim. Acta 202, 159 (1987).
- (19) H.P. Deppeler and G. Witthaus, Fresenius' Z. Anal. Chem. 305, 273 (1981).
- (20) R.H. Cundiff and P.C. Markunas, Anal. Chem. 28, 792 (1956).
- (21) G. Toennies and T.P. Callan, J. Biol. Chem. 125, 259 (1938).
- (22) G.F. Nodeau and L.E. Branchen, J. Am. Chem. Soc. 57, 1363 (1935).
- (23) E.J. Greenhow and A.A. Shafi, Talanta 23, 73 (1976).
- (24) C. Tanford, Adv. Prot. Chem. 17, 69 (1962)
- (25) L.R. Snyder, J. Chromatogr. Sci. 16, 223 (1978).
- (26) V. Gutmann, "The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interactions", Plenum, New York, 1978, p. 19.
- (27) J.N. Bronsted, Chem. Ber. 61, 2049 (1928).
- (28) I.M. Kolthoff, Pure Appl. Chem. 25, 305 (1971).
- (29) O. Popovich and R.P.T. Tomkins, "Nonaqueous Solution Chemistry", John Wiley, New York, 1981, p. 34.

- (30) R.G. Bates, "Medium Effects and pH in Nonaqueous Solvents" in "Solute-Solvent Interactions", J.F. Costzel and C.D. Ritchie, eds., Marcel Dekker, New York, 1969.
- (31) I.M. Kolthoff, Anal. Chem. 46, 1992 (1974).
- (32) L. Safarik and Z. Stránský, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p. 59-60.
- (33) T. Mussini, A.K. Covington, P. Longhi and S. Rondinini, Pure Appl. Chem. 57, 865 (1985).
- (34) Y. Marcus, Pure Appl. Chem. 55, 977 (1983).
- (35) P. Ugo, S. Daniele and G.A. Mazzachin, Anal. Chim. Acta 208, 207 (1988).
- (36) A.K. Covington, Pure Appl. Chem. 57, 531 (1985).
- (37) L. Safarik and Z. Stránský, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p. 72-73.
- (38) L.P. Hammett and A.J. Deyrup, J. Am. Chem. Soc. 54, 2721 (1932).
- (39) R.G. Bates, M. Paabo and R.A. Robinson, J. Phys. Chem. 67, 1833 (1963).
- (40) O. Popovich and R.P.T. Tomkins, "Nonaqueous Solution Chemistry", John Wiley, New York, 1981, p. 222.

- (41) L. Safarik and Z. Stránský, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p. 130.
- (42) I.M. Kolthoff and S. Bruckenstein, J. Am. Chem. Soc. 78, 1 (1956).
- (43) S. Bruckenstein and I.M. Kolthoff, J. Am. Chem. Soc. 78, 2974 (1956).
- (44) I.M. Kolthoff and M.K. Chantooni, Jr., J. Am. Chem. Soc. 85, 2195 (1963).
- (45) I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni, Jr. and S. Bhowmik, J. Am. Chem. Soc. 90, 23 (1968).
- (46) V.K. LaMer and H.C. Downes, J. Am. Chem. Soc. 55, 1840 (1933).
- (47) M.M. Davis, "Bronsted Acid-Base Behavior in "Inert" Organic Solvents" in "The Chemistry of Nonaqueous Solvents", J.J. Lagowski, ed., vol. III, Academic Press, New York, 1970.
- (48) I.M. Kolthoff and S. Bruckenstein, "Acid-Base Equilibria in Nonaqueous Solutions" in "Treatise on Analytical Chemistry", I.M. Kolthoff and P.J. Elving, eds., vol. 1, Part I, The Interscience Encyclopedia, New York, 1967.
- (49) C.A. Streuli, "Titrimetry: Acid-Base Titration in Nonaqueous Solvents" in "Treatise on Analytical Chemistry", I.M. Kolthoff and P.J. Elving, eds., vol. 11, Part I, John Wiley, New York, 1975.
- (50) I. Gyenes, "Titration in non-aqueous media", D. Van Nostrand Company, Budapest, 1967.

- (51) O. Popovich and R.P.T. Tomkins, "Nonaqueous Solution Chemistry", John Wiley, New York, 1981.
- (52) L. Safarik and Z. Stránsky, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986.
- (53) D.D. Perrin, W.L.F. Armarego and D.R. Perrin, "Purification of Laboratory Chemicals", 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, 1980.
- (54) J.S. Fritz and R.T. Keen, Anal. Chem. 25, 179 (1953).
- (55) J.S. Fritz, Anal. Chem. 22, 1028 (1950).
- (56) D.B. Bruss and G.E.A. Wyld, Anal. Chem. 29, 232 (1957).
- (57) H.B. van der Heijde, Anal. Chim. Acta 17, 512 (1957).
- (58) I. Gyenes, "Titration in non-aqueous media", D.Van Nostrand Company, Budapest, 1967, p. 204-210.
- (59) G.A. Vaughan and J.J. Swithenbank, Analyst 90, 594 (1965).
- (60) H.A. Mottola and H.B. Mark, Jr., Anal. Chem. 52, 31R (1980).
- (61) H.A. Mottola and H.B. Mark, Jr., Anal. Chem. 54, 62R (1982).
- (62) H.A. Mottola and H.B. Mark, Jr., Anal. Chem. 56, 96R (1984).
- (63) H.A. Mottola and H.B. Mark, Jr., Anal. Chem. 58, 264R (1986).
- (64) H.A. Mottola, D. Pérez-Bendito and H.B. Mark, Jr., Anal. Chem. 60, 181R (1988).
- (65) F.F. Gaál, Analyst 112, 739 (1987).
- (66) S. Pantel and H. Weisz, Anal. Chim. Acta 202, 1 (1987).
- (67) L. Erdey and I. Buzás, Anal. Chim. Acta 22, 524 (1960).
- (68) H.J. Kelly and D.N. Hume, Anal. Chem. 36, 543 (1964).
- (69) E.J. Greenhow, Chem. Rev. 77, 835 (1977).

- (70) T.F.A. Kiss, *Talanta* 30, 771 (1983).
- (71) E.J. Greenhow and L.E. Spencer, *Analyst* 98, 81 (1973).
- (72) E.J. Greenhow and L.E. Spencer, *Analyst* 98, 90 (1973).
- (73) O.E.S. Godinho, C. Pasquini, R.R.U. Queiroz and L.M. Aleixo, *Anal. Lett.* 17(A2), 135 (1984).
- (74) R.R.U. Queiroz, "Investigações envolvendo Titulação Termométrica Catalítica", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.
- (75) V.J. Vajgand and F.F. Gaál, *Talanta* 14, 345 (1967).
- (76) E.J. Greenhow, *Analyst* 102, 584 (1977).
- (77) E.J. Greenhow, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 1248 (1979).
- (78) E.J. Greenhow and M. Kashanipour, *Analyst* 110, 1209 (1985).
- (79) F.F. Gaál, A.S. Topalov and Zs.J. Vitéz, *Microchem. J.* 33, 71 (1986).
- (80) E.J. Greenhow and L.E. Spencer, *Talanta* 24, 201 (1977).
- (81) F.F. Gaál and B.Dj. Abramovic, *Microchem. J.* 27, 231 (1982).
- (82) D. Marrero-Ardila and E.J. Greenhow, *Anal. Proc.* 20, 130 (1983).
- (83) E.J. Greenhow and L.A. Dajer de Torrijos, *Analyst* 104, 801 (1979).
- (84) E.J. Greenhow and A.A. Shafi, *Analyst* 101, 421 (1976).
- (85) E.J. Greenhow and A. Nadjafi, *Anal. Chim. Acta* 109, 129 (1979).
- (86) H.A. Mottola, *Talanta* 16, 1267 (1969).
- (87) M.S. Goizman, *Zavodsk. Lab.* 42, 630 (1970) apud F.F. Gaál and B.F. Abramovic, *Talanta* 31, 987 (1984).
- (88) F.F. Gaál and B.F. Abramovic, *Talanta* 31, 987 (1984).

- (89) B.F. Abramovic, F.F. Gaál and D.Z. Paunic, *Talanta* 32, 549 (1985).
- (90) F.F. Gaál and B.F. Abramovic, *Talanta* 32, 559 (1985).
- (91) B.F. Abramovic, F.F. Gaál and B.K. Abramovic, *J. Serb. Chem. Soc.* 51, 265 (1986).
- (92) H. Zeidler, *Fresenius'Z. Anal. Chem.* 146, 251 (1955).
- (93) B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 66, 93 (1973).
- (94) J.E. Taphorn, G.M. Davies and J.A. Caruso, *Talanta* 22, 611 (1975).
- (95) L. Safarik and Z. Stránsky, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p. 262-263.
- (96) E.J. Greenhow and B.F. Al-Mudarris, *Talanta* 22, 417 (1975).
- (97) R.G. Bates, "Determination of pH. Theory and Practice", John Wiley, New York, 1965, p. 257.
- (98) B. Waligora and M. Paluch, *Anal. Chim. Acta* 132, 229 (1981).
- (99) R.A. Glenn and J.T. Peake, *Anal. Chem.* 27, 205 (1955).
- (100) M.A.B. Gomes and L.O.S. Bulhões, *J. Electroanal. Chem.* 165, 289 (1984).
- (101) I. Prazack and J. Grimmer, *Coll. Czech. Chem. Commun.* 24, 2049 (1959).
- (102) G.A. Harlow and D.B. Bruss, *Anal. Chem.* 30, 1833 (1958).
- (103) E. Fisicaro and A. Braibanti, *Talanta* 35, 769 (1988).

- (104) L. Safarik and Z. Stránsky, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p. 268.
- (105) H.H. Willard and A.W. Boldyeff, J. Am. Chem. Soc. 51, 471 (1929).
- (106) M. Katz and R.A. Glenn, Anal. Chem. 24, 1157 (1952).
- (107) J.S. Fritz and N.M. Lisicki, Anal. Chem. 23, 589 (1951).
- (108) F. Pellerin and D. Demay, Ann. Pharm. Franç. 20, 45 (1962).
- (109) H.B. van der Heidje, Anal. Chim. Acta 16, 392 (1957).
- (110) D.H. Mornan and G.A. Harlow, Anal. Chem. 39, 1869 (1967).
- (111) M.G. Yakubik, L.W. Safranski and J. Mitchell, Jr., Anal. Chem. 30, 1741 (1958).
- (112) D. Martin, A. Weise and H.J. Niclas, Angew. Chem. 6, 318 (1967).
- (113) T.B. Reddy, Pure Appl. Chem. 25, 457 (1971).
- (114) I.M. Kolthoff and T.B. Reddy, Inorg. Chem. 1, 189 (1962).
- (115) J.C. Coupez and M. Le Démezét, Bull. Soc. Chim. Fr., 1033 (1969).
- (116) R. Stewart and J.R. Jones, J. Am. Chem. Soc. 89, 5069 (1967).
- (117) E.C. Steiner and J.M. Gilbert, J. Am. Chem. Soc. 87, 382 (1965).
- (118) M.K. Chantooni, Jr. and I.M. Kolthoff, J. Phys. Chem. 79, 1176 (1975).
- (119) J.N. Butler, J. Electroanal. Chem. 14, 89 (1967).

- (120) D.R. Burfield and R.H. Smithers, *J. Org. Chem.* 43, 3966 (1978).
- (121) R. Morales, *Anal. Chem.* 40, 1149 (1968).
- (122) K.K. Barnes and C.K. Mann, *Anal. Chem.* 36, 2502 (1964).
- (123) J.M. Andres, C. Romero and J.M. Gavilan, *Talanta* 34, 583 (1987).
- (124) J. Bercík, Z. Hladký and M. Čákr, *Fresenius'Z. Anal. Chem.* 261, 113 (1972).
- (125) M. Bos, S.T. Ijpmá and E.A.M.F. Dahmen, *Anal. Chim. Acta* 83, 39 (1976).
- (126) E.J. Greenhow and A.A. Shafi, *Angew. Makromol. Chem.* 53, 187 (1976).
- (127) E.J. Greenhow, R. Hargitt and A.A. Shafi, *Angew. Makromol. Chem.* 48, 55 (1975).
- (128) C.D. Ritchie and R.E. Uschold, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 1721 (1967).
- (129) M. Georgieva, G. Velinov and O. Budevsky, *Anal. Chim. Acta* 90, 83 (1977).
- (130) E.H. Baughman and M.M. Kreeroy, *J. Phys. Chem.* 78, 421 (1974).
- (131) A. Fini, P. De Maria, A. Guarnieri and L. Varoli, *J. Pharm. Sci.* 76, 48 (1987).
- (132) M. Georgieva, G. Velinov and O. Budevsky, *Anal. Chim. Acta* 101, 139 (1978).
- (133) M. Georgieva, P. Zikolov and O. Budevsky, *Anal. Chim. Acta* 115, 411 (1980).

- (134) P. Longhi, T. Mussini and M.G. Veleza, An. Quim. 71, 1043 (1975).
- (135) A.K. Das and K.K. Kundu, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 730 (1973).
- (136) M.J. Taylor, J. Chem. Eng. Data 24, 230 (1979).
- (137) C.A. Vega and J.C. Halle, Bull. Soc. Chim. Fr., Part I, 124 (1979).
- (138) A.D. Galvão and N.R. Stradiotto, Talanta 36, 427 (1989).
- (139) O.E.S. Godinho and E.J. Greenhow, Anal. Chem. 57, 1725 (1985).
- (140) N. Baccan, J.C. de Andrade, O.E.S. Godinho e J.S. Barone, "Química Analítica Quantitativa Elementar", Edgar Blücher Ltda., São Paulo, 1979, p. 180.
- (141) B.B. Wheals and J.R. Russell, J. Chromatogr. 176, 418 (1979).
- (142) J.C. Davis, "Statistics and Data Analysis in Geology", John Wiley, New York, 1973, p. 106.
- (143) L. Dajer de Torrijos and E.J. Greenhow, Proc. Anal. Div. Chem. Soc. 16, 7 (1979).
- (144) E.J. Greenhow, A. Nadjafi and L. Dajer de Torrijos, Analyst 103, 411 (1978).
- (145) E.J. Greenhow and A.A. Shafi, Talanta 23, 73 (1976).
- (146) I. Gyenes, "Titration in non-aqueous media", D. Van Nostrand Company, Budapest, 1967, p. 160.
- (147) O.E.S. Godinho, "Relatório de Bolsa no Exterior", Processo Fapesp nº 78/0832, Campinas, 1979, p. 4.
- (148) E.J. Greenhow and L.E. Spencer, Analyst 98, 811 (1973).

- (149) R.E. Canfield, J. Biol. Chem. 238, 2691 (1963).
- (150) A.D. Nisbet, R.H. Saundry, A.J.G. Moir, L.A. Fothergill and J.E. Fothergill, Eur. J. Biochem. 115, 335 (1981).
- (151) I.M. Kolthoff and C.J. Sambucetti, Anal. Chim. Acta 21, 17 (1959).
- (152) E. Scarano, Anal. Chim. Acta. 16, 365 (1957).
- (153) R.G. Bates, "Determination of pH. Theory and Practice", John Wiley, New York, 1965, p. 252.
- (154) W.S. Selig, Fresenius Z. Anal. Chem. 317, 865 (1984).
- (155) I. Gyenes, "Titration in non-aqueous media", D.Van Nostrand Company, Budapest, 1967, p. 194-195.
- (156) L.Safarik and Z. Stránsky, "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p. 270.
- (157) L.I. Checkmareva, V.B. Avilov, Yu.F. Klimov and T.A. Kolmogorova, Zh. Anal. Khim. 27(7), 1401 (1972).
- (158) J.C. Masini e O.E.S. Godinho, trabalho não publicado.
- (159) O.E.S. Godinho and L.M. Aleixo, Anal. Biochem. 112, 323 (1981)
- (160) K. Nomura and Y. Ujihira, Anal. Chem. 60, 2564 (1988).