

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO DE EQUILÍBRIOS ATRAVÉS DE POTENCIOMETRIA
E VOLTAMETRIA COM RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS**

TESE DE DOUTORADO

Josué da Rosa Missel

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2012

INVESTIGAÇÃO DE EQUILÍBRIOS ATRAVÉS DE POTENCIOMETRIA E VOLTAMETRIA COM RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS

por

Josué da Rosa Missel

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Santa Maria, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**INVESTIGAÇÃO DE EQUILÍBRIOS ATRAVÉS DE POTENCIOMETRIA
E VOLTAMETRIA COM RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS**

elaborada por
Josué da Rosa Missel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Cícero do Nascimento, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marcos Viero Guterres, Dr. (EMS)

Denise Bohrer do Nascimento, Dra. (UFSM)

Vânia Regina Gabbi Polli, Dra. (UFSM)

Cristiane Luisa Jost, Dra. (UFSC)

Santa Maria, 09 de março de 2012.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

INVESTIGAÇÃO DE EQUILÍBRIOS ATRAVÉS DE POTENCIOMETRIA E VOLTAMETRIA COM RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS

AUTOR: JOSUÉ DA ROSA MISSEL
ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

A interação entre o aminoácido glutationa (GSH) e os íons zinco (II) e cádmio (II) foi investigada a partir de dados obtidos por medidas potenciométricas e voltamétricas. Soluções com força iônica 0,1 M de KCl de diferentes proporções metal-ligante foram tituladas com solução padrão de KOH e os perfis de pH assim obtidos foram usados para propor os modelos de equilíbrio químico entre as espécies. Para tratar os dados potenciométricos foi utilizado o programa *Hyperquad*, possibilitando que as constantes de formação das diferentes espécies pudessem ser refinadas. O programa *HySS*, pertencente ao pacote computacional do *Hyperquad*, foi utilizado para obtenção das curvas de distribuição das espécies. O melhor ajuste dos modelos de equilíbrio foi alcançado propondo a existência de espécies em que os íons metálicos foram coordenados por uma e duas moléculas do ligante, sendo que os maiores valores de $\log \beta$ foram encontrados para os complexos do tipo MH_2L , MHL_2 e ML_2 . Para os dados voltamétricos, foi aplicado o método de resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS). Vários voltamogramas registrados a diferentes proporções metal-ligante geraram uma série de picos sobrepostos, a partir dos quais foi possível recuperar os voltamogramas puros e respectivos perfis de concentração aplicando não negatividade, unimodalidade e *closure* como restrições. Para ambos os sistemas estudados (GSH-Zn e GSH-Cd) os voltamogramas foram resolvidos para três componentes, o metal livre e dois complexos. A potenciométrica e a voltametria submetida a MCR-ALS mostraram-se capazes de se complementarem, constituindo-se em grandes ferramentas na investigação de equilíbrios químicos entre íons metálicos e ligantes.

Palavras chave: potenciométrica; voltametria; resolução multivariada de curvas, constantes de estabilidade.

ABSTRACT

EQUILIBRIA INVESTIGATION BY POTENTIOMETRY AND VOLTAMMETRY WITH MULTIVARIATE CURVE RESOLUTION

AUTHOR: JOSUÉ DA ROSA MISSEL

ADVISOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

The interaction between the amino acid glutathione (GSH) and zinc (II) and cadmium (II) ions was investigated using data obtained by potentiometric and voltammetric measurements. Solutions with ionic strength 0.1 M KCl with different metal-ligand ratios were titrated with standard solution of KOH and the pH profiles obtained were used to propose models of chemical equilibrium between the species. The potentiometric data treatment was performed using the *Hyperquad software*, which enabled that the formation constants of the different species could be refined. The program *HySS*, belonging to the *Hyperquad* computer package, was used to obtain the species distribution curves. The best fit models of equilibrium was reached suggesting the existence of species in which the metal ions were coordinated by one and two molecules of the ligand, and the highest values were found for $\log \beta$ complex type MH_2L , MHL_2 and ML_2 . For the voltammetric data, multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) was applied. Several voltammograms recorded at different metal-ligand ratios generated a series of overlapping peaks, from which it was possible to recover the pure voltammograms and their concentration profiles applying non-negativity, unimodality and "closure" as constraints. For both systems studied (GSH-Zn and GSH-Cd), voltammograms were resolved to three components, the free metal and two complexes. The potentiometric and voltammetric data treated with MCR-ALS were capable to complement one another, constituting an important tool in the investigation of chemical equilibria between metal ions and ligands.

Key words: potentiometry; voltammetry; multivariate curve resolution; stability constants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS	Alternating Least Squares (Mínimos Quadrados Alternantes)
DP	Differential Pulse (Pulso Diferencial)
GSH	Glutathiona reduzida
HMDE	Hanging Mercury Drop Electrode (Eletrodo de Mercúrio de Gota Pendente)
HySS	<i>Hyperquad Species Simulation</i>
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
MCR	Multivariate Curve Resolution (Resolução Multivariada de Curvas)
SMDE	Static Mercury Drop Electrode (Eletrodo de Mercúrio de Gota Estática)
SVD	Singular Value Decomposition (Decomposição em Valores Singulares)

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Principais convenções e simbologias adotadas na expressão das constantes de estabilidade.

APÊNDICE B – Parâmetros utilizados na medida voltamétrica do sistema GSH-Zn²⁺

APÊNDICE C – Parâmetros utilizados na medida voltamétrica do sistema GSH-Cd²⁺

APÊNDICE D – Gráfico de linearidade para o zinco

APÊNDICE E – Gráfico de linearidade para o cádmio

APÊNDICE F – Gráfico de linearidade para a glutathiona reduzida

APÊNDICE G – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo das constantes de protonação da glutathiona

APÊNDICE H – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Zn titulados na proporção 1:1

APÊNDICE I – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Zn titulados na proporção 2:1

APÊNDICE J – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Cd titulados na proporção 1:1

APÊNDICE K – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Cd titulados na proporção 2:1

APÊNDICE L – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de protonação da GSH

APÊNDICE M – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Zn²⁺ e GSH (titulação 1:1)

APÊNDICE N – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Zn²⁺ e GSH (titulação 1:2).

APÊNDICE O – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Cd²⁺ e GSH (titulação 1:1).

APÊNDICE P – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Cd²⁺ e GSH (titulação 1:2).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Métodos de obtenção das constantes de estabilidade	15
2.1.1 Medida potenciométrica do pH.....	15
2.1.2 Complexos e a medida potenciométrica.....	17
2.1.2.1 Programa <i>Hyperquad</i>	19
2.2 Voltametria e Polarografia	20
2.2.1 Princípio da medida.....	21
2.2.2 Célula voltamétrica.....	21
2.2.3 Voltametria de pulso diferencial.....	21
2.2.4 Complexos e a medida voltamétrica.....	21
2.2.5 Método de Lingane.....	25
2.3 Complexos	27
2.3.1 Formação dos Complexos.....	27
2.3.2 Constantes de estabilidade.....	28
2.3.3 Influência da força iônica nas constantes de estabilidade.....	29
2.3.4 Ácidos e bases duros e moles.....	31
2.3.5 Importância das constantes de estabilidade.....	32
2.4 RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS	33
2.4.1 Estimativa do número de componentes.....	37
2.4.1.1 Decomposição em valores singulares.....	38
2.4.2 O problema dos mínimos quadrados.....	40

2.4.3	Ambiguidade.....	42
2.4.4	Restrições.....	44
2.4.4.1	Não negatividade.....	44
2.4.4.2	Unimodalidade.....	45
2.4.4.3	"Closure".....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Instrumentação.....	46
3.2	Reagentes e Soluções.....	46
3.3	Cuidados com a contaminação.....	46
3.4	Potenciometria.....	47
3.4.1	Titulações potenciométricas.....	47
3.4.1.1	Padronização da solução de KOH.....	48
3.4.1.2	Calibração do sistema potenciométrico.....	49
3.4.1.3	Tratamento dos dados potenciométricos.....	49
3.5	Voltametria.....	50
3.5.1	Ajuste dos parâmetros instrumentais.....	50
3.5.2	Procedimentos na obtenção das medidas voltamétricas.....	50
3.5.3	Tratamento dos dados voltamétricos.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Escolha do sistema metal–ligante.....	52
4.2	Titulações potenciométricas.....	55
4.2.1	Produto iônico da água.....	56
4.2.2	Determinação das constantes de protonação do ligante.....	57
4.2.3	Titulação potenciométrica do sistema GSH-Zn.....	60

4.2.4 Titulação potenciométrica do sistema GSH-Cd.....	63
4.2.5 Sigma (σ).....	66
4.2.6 Resíduos.....	67
4.2.7 Parâmetros de risco (<i>dangerous parameters</i>).....	68
4.3 Comportamento voltamétrico das espécies.....	68
4.3.1 Escolha das concentrações relativas nas medidas voltamétricas.....	70
4.4 Resolução multivariada de curvas no estudo dos complexos.....	71
4.4.1. Obtenção da matriz de dados experimentais.....	71
4.4.2. Estimativa inicial do número de componentes.....	72
4.4.3. Otimização pelos mínimos quadrados alternantes.....	73
4.4.4 Escolha do <i>software</i> adequado.....	74
4.4.5 Estudo do sistema glutationa-zinco (GSH-Zn).....	75
4.4.5.1 Decomposição em valores singulares para o sistema GSH-Zn.....	76
4.4.5.2 Obtenção dos voltamogramas e dos perfis de concentração dos componentes puros para o sistema GSH-Zn.....	77
4.4.5.2.1 Geração das estimativas iniciais para o sistema GSH-Zn.....	77
4.4.5.2.2 Ajuste do modelo bilinear pelos mínimos quadrados alternantes para o sistema GSH-Zn.....	78
4.4.6 Estudo do sistema glutationa-cádmio (GSH-Cd).....	82
4.4.6.1 Decomposição em valores singulares para o sistema GSH-Cd.....	82
4.4.6.2 Obtenção dos voltamogramas e dos perfis de concentração dos componentes puros para o sistema GSH- Cd.....	83
4.4.6.2.1 Geração das estimativas iniciais para o sistema GSH-Cd.....	83
4.4.6.2.2 Ajuste do modelo bilinear pelos mínimos quadrados alternantes para o sistema GSH-Cd.....	84
4.5 Estudo potenciométrico versus estudo voltamétrico por MCR.....	86

5 CONCLUSÕES.....	90
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICES.....	104

1 INTRODUÇÃO

O estudo da interação entre metais de transição e compostos de natureza peptídica é de grande importância, uma vez que metais, na forma de cátions, podem atuar de forma decisiva em importantes mecanismos biológicos. Os íons destes metais apresentam uma alta afinidade com grupos tiol (-SH) e tem sido associados ao distúrbio de muitas funções metabólicas (MENDIETA, 1996; HULTBERG, 2004; FILHO, 2006; RICCI, 2006; LEVERRIER, 2007). Estes cátions tem demonstrado grande capacidade de interação com alguns aminoácidos que participam de várias funções enzimáticas, estrutura de proteínas e receptores. O tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, também conhecido como glutathiona (GSH), é uma das mais abundantes moléculas biológicas de baixo peso molecular que contém em sua estrutura o grupo tiol, atuando na eliminação de radicais livres, como precursor de ftalocianinas e na defesa do organismo contra intoxicação de metais (BELCASTRO, 2009). Uma importante característica da GSH associada a sua capacidade de coordenar-se a íons metálicos reside na sua potencial capacidade de reduzir a concentração de Cd^{2+} no citosol, diminuindo seu potencial tóxico (TWISS, 2001; ZHANG, 2006). Além da interação com cádmio, a glutathiona tem demonstrado estar envolvida em mecanismos de transporte e estoques de Zn^{2+} intracelular (KREZEL, 2003). A intensidade destas interações podem ser avaliadas através da determinação das constantes de estabilidade das diferentes espécies que se formam em função dos vários equilíbrios químicos que se estabelecem.

As constantes de estabilidade de complexos formados entre um metal e um ligante podem ser determinadas por vários métodos, sendo que o potenciométrico e, posteriormente, o espectroscópio são os que mais se destacaram nas últimas quatro décadas. O princípio do método potenciométrico reside na titulação de uma solução que contenha uma proporção conhecida entre ligante e metal com uma solução padrão de uma base utilizando um eletrodo de pH. Dependendo da proporção em que ambos (ligante e metal) encontram-se dentro da célula de titulação, o metal terá capacidade de se coordenar a uma maior ou menor quantidade de moléculas do ligante. Quando ocorre a formação do complexo, o ligante é desprotonado em um ou mais sítios de ligação (caso possua mais de um), e estes prótons desalojados (íons

H⁺) são então titulados com a solução da base. Além do uso do eletrodo de pH, esta titulação pode ser realizada utilizando um eletrodo íon-específico para o cátion, isto é, um eletrodo que responda apenas a atividade de um único íon metálico. No entanto esta alternativa tem sido pouco utilizada devida a dificuldade de obtenção de eletrodos desta natureza.

A partir dos dados obtidos com a curva de titulação (volume de titulante *versus* pH) é possível, através de métodos matemáticos, determinar as constantes de estabilidade das espécies formadas em solução. A abordagem matemática mais utilizada no cálculo das constantes tem sido o da minimização da soma dos quadrados dos resíduos entre a curva experimental e a curva teórica, esta última obtida a partir de valores de pH calculados em função de um modelo proposto para equilíbrio das espécies em solução (MARTELL, 1992). Para realizar esta operação são utilizados programas computacionais específicos. *BEST* (MARTELL, 1992) e *Hyperquad* (GANS, 1996) são os que mais se destacam.

A potenciometria constitui a base dos métodos de determinação da maioria das constantes de estabilidade conhecidas. Para que as constantes sejam calculadas, há uma exigência de grande conhecimento prévio a respeito do sistema químico em estudo, além da necessidade de seguir uma extensa rotina de procedimentos que antecedem a titulação entre metal e ligante (determinação do p_{Kw} , avaliação da contaminação da base titulante por CO₂, padronização do titulante, calibração do eletrodo antes de cada titulação, alta pureza dos reagentes). Aliado a isto, o procedimento da titulação é bastante moroso, pois devem ser obtidos, em média, 50 pontos ou mais para cada proporção ligante-metal titulada, no mínimo, em triplicata.

Uma alternativa ao método potenciométrico, a resolução multivariada de curvas (do inglês *Multivariate Curve Resolution* – MCR), tem apresentado bons resultados na investigação de equilíbrios metal-ligante (TAULER, 1993; TAULER, 1995). Uma de suas grandes vantagens é a necessidade de pouco, ou nenhum conhecimento prévio acerca dos equilíbrios investigados (ESTEBAN, 2000). O método consiste em uma série de operações matemáticas que possibilitam obter o sinal de cada componente puro em uma mistura quando os mesmos estão sobrepostos. Estes sinais podem ser obtidos a partir de medidas espectroscópicas

(TAULER, 1993), voltamétricas (ESTEBAN, 2000) ou qualquer outra medida que tenha natureza multivariada, inclusive uma imagem (GEMPERLINE, 2006).

A voltametria tem se mostrado como uma boa fonte de dados para o estudo de equilíbrio em soluções aquosas envolvendo metais e moléculas de natureza biológica. Para que o MCR seja aplicado a dados voltamétricos deve haver um deslocamento do potencial de meia onda do metal quando está na presença do ligante. Os valores de corrente devem estar dispostos em uma matriz de dados de modo que cada coluna ou linha corresponda a uma série de voltamogramas obtidas a diferentes proporções metal ligante. A decomposição inicial da matriz de dados apresenta apenas significado matemático, devido ao problema da ambiguidade, o que tem sido resolvido com a introdução de restrições ao modelo, fazendo-o convergir para uma solução que obedeça a critérios pré-determinados.

Segundo Esteban et al. (2006), o desenvolvimento de métodos quimiométricos aplicados a dados obtidos por técnicas eletroanalíticas tem sido muito pequena quando comparados à espectroscopia e a análise de imagens. Este fato desperta interesse na medida em que possibilita que a pesquisa na resolução multivariada de curvas aplicada a dados voltamétricos seja explorada.

Considerando as características de cada método, o presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo comparativo entre o método potenciométrico e a resolução multivariada de curvas a partir de dados voltamétricos na investigação de equilíbrios químicos. Para tal, foi escolhido o sistema glutaciona-zinco e glutaciona-cádmio para obter todos os conjuntos de medidas, uma vez que estudos prévios (MENDIETA, 2000; DÍAZ-CRUZ, 2000; FERRETTI, 2007; LEVERRIER, 2007) mostraram que ambos sistemas dão uma boa resposta analítica na potenciometria e na voltametria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Métodos de obtenção das constantes de estabilidade

Qualquer método que possa ser usado para determinar com razoável exatidão a concentração de, pelo menos, uma das espécies em equilíbrio serve como fonte de informação necessária, juntamente com a composição analítica conhecida da solução experimental, para calcular as concentrações de todas as espécies e, por consequência, suas constantes de equilíbrio. Quando um número suficiente destas medidas do equilíbrio ocorre sob condições definidas, é possível obter os valores das constantes de estabilidade que se ajustam a estas condições (MARTELL, 1992). Desta forma, vários métodos podem servir como fonte de aquisição de dados para determinar as constantes de estabilidade, dentre as quais pode-se mencionar a potenciometria, a espectrofotometria, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a voltametria, condutividade iônica, distribuição entre duas fases, eletroforese, eletroforese capilar, entre outras.

Dentro do rol das técnicas citadas, apenas a potenciometria e voltametria serão detalhadas em função do objetivo proposto pelo trabalho.

2.1.1 Medida potenciométrica do pH

A utilização do eletrodo de vidro para medir o pH é o exemplo mais comum de um eletrodo íon seletivo. Uma montagem bastante usual utiliza um eletrodo combinado de pH que acopla em um mesmo aparato cilíndrico um eletrodo de vidro e o de referência (Figura 01). A parte sensível aos íons H^+ é um bulbo de vidro de paredes finas, localizado na extremidade inferior, constituindo parte do eletrodo indicador. O eletrodo de referência externo é um eletrodo de Ag/AgCl em forma espiral. O de referência interno, também de Ag/AgCl tem forma alongada e está

localizado no centro do eletrodo combinado. Os dois eletrodos de referência medem a diferença de potencial através da membrana de vidro. O tampão poroso representado na parte inferior da figura 01 serve como ponte salina.

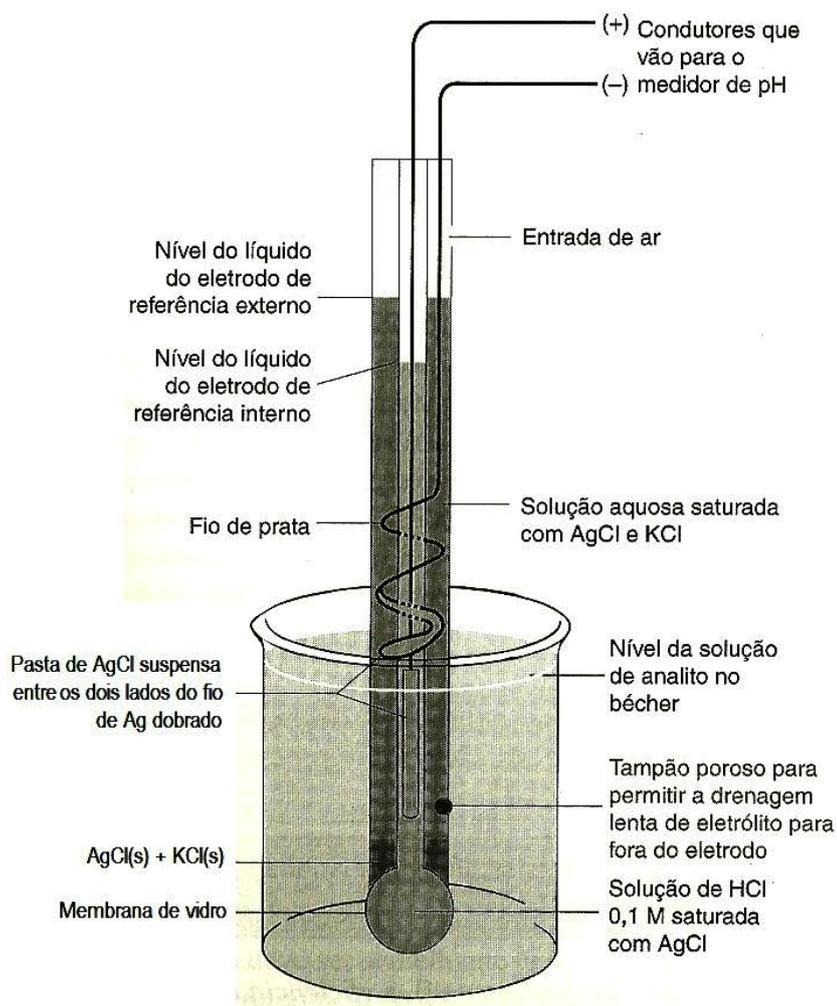


Figura 01 – Componentes de um eletrodo combinado

Fonte: HARRIS, 2005.

A diferença de potencial entre os eletrodos de Ag/AgCl interno e externo depende da concentração do íon cloreto em cada compartimento do eletrodo e da diferença de potencial através da membrana de vidro. Sendo a concentração de Cl^- fixa em cada compartimento do eletrodo e a concentração de íons H^+ fixa apenas no interior da membrana de vidro, somente a concentração de H^+ externa é variável.

Assim, o potencial do sistema responderá proporcionalmente às mudanças na concentração do íon H^+ presentes na solução externa, isto é, a solução cujo pH se quer determinar (HARRIS, 2005). O diagrama de barras da célula formada entre eletrodo de referência e o eletrodo indicador está representado na figura 02.

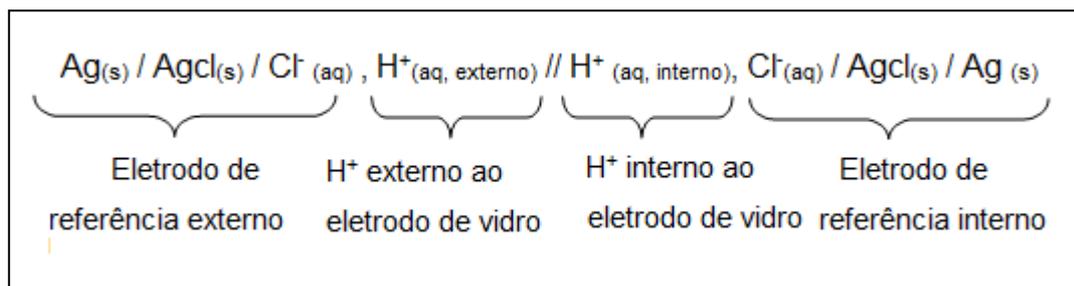


Figura 02 – Diagrama de barras do eletrodo combinado.

2.1.2 Complexos e a medida potenciométrica

A potenciometria é uma técnica bastante apropriada para a avaliação do equilíbrio de complexos metálicos. Embora medidas de concentração de íons metálicos possam ser feitas com eletrodos específicos para íons, ou com eletrodos metálicos, é usual o emprego do eletrodo de vidro de alta exatidão para medidas da concentração do íon hidrogênio em um procedimento de titulação potenciométrica. Neste procedimento, uma solução padrão de uma base é adicionada em incrementos a uma solução ácida bem caracterizada do ligante na ausência e na presença de uma conhecida concentração do íon metálico. Na maioria dos casos, o pH varia entre 2 e 12, durante tempo no qual 50-100 leituras de equilíbrio são obtidas, constituindo a curva de equilíbrio potenciométrico (MARTELL, 1992).

Uma grande vantagem do uso de medidas com eletrodos íon-seletivos, é que uma série de dados pode ser facilmente coletada através de titulações. A partir da composição analítica inicial, mudanças parciais com adições da base feitas com auxílio de uma bureta, permitem a determinação da atividade dos íons em solução (ABATE, 1999).

A determinação de constantes de equilíbrio de complexos metal-ligante em meio aquoso requer o conhecimento, com grande exatidão, do pK_w específico para a temperatura e meio iônico usado. Este termo refere-se ao valor negativo do logaritmo decimal do produto iônico da água ($-\log [H^+] \times [OH^-]$), e pode ser obtido durante a calibração do eletrodo, trabalhando no intervalo de pH dentro do qual a resposta do eletrodo de vidro é rigorosamente Nernstiana, ou seja, quando o potencial varia linearmente com o pH.

A determinação da interação do ligante com o próton e do metal com o ânion hidroxila também é importante, no entanto em metais com a interação hidróxido-metal fraca, a mesma pode ser negligenciada, uma vez que o uso das constantes de hidrólise disponíveis na literatura pode acarretar erros insignificantes de cálculo (BERTHON, 1995).

A constante de protonação do ligante pode ser calculada a partir da obtenção do perfil de pH do ligante sozinho. Para a determinação de $\log \beta$, um ou mais perfis de pH são medidos para o sistema contendo uma ou mais razões molares de metal/ligante. Quando este é uma competição aproximada entre o número de grupos doadores efetivos do ligante e o número de coordenação (em solução) do íon metálico, razões molares 1:1 e 1:2 normalmente são suficientes. O perfil de pH assim obtido é empregado para calcular a constante de estabilidade do complexo formado em solução.

A partir da aquisição destes perfis de pH, as constantes podem ser refinadas utilizando programas computacionais adequados. Destacam-se para este propósito os programas *BEST* (MARTELL, 1992) e *Hyperquad* (GANS, 1996; ALDERIGHI, 1999).

Estes programas realizam o refinamento das constantes de estabilidade pelo ajuste iterativo não linear dos mínimos quadrados das curvas de equilíbrio, através de um conjunto de equações de balanço de massa simultâneas para todos os componentes expressos em termos de constantes de equilíbrio conhecidas e desconhecidas. Com o uso apropriado destes *softwares* é possível obter um alto grau de discriminação na seleção de espécies químicas (VOGEL, 1992). O programa *BEST* (MARTELL, 1992) foi um dos primeiros programas desenvolvidos com o propósito de refinar as constantes de formação. Entretanto, com a evolução computacional (de *software* e *hardware*) ocorrida nas últimas décadas, outros

programas foram desenvolvidos, disponibilizando interfaces mais amigáveis, proporcionando métodos mais rápidos para ajuste entre a curva experimental e as constantes. Neste sentido tem se destacado o programa *Hyperquad*, desenvolvido por Gans et al. (1996) que, além suportar dados potenciométricos, permite a entrada de dados de espectroscopia.

2.1.2.1 Programa *Hyperquad*.

O programa *Hyperquad2006* permite o refino de constantes de estabilidade oriundas de dados potenciométricos e espectrofotométricos. O refinamento é realizado a partir de um programa compilado em linguagem FORTRAN (Hyp32.exe) realizando uma ou mais iterações até que seja alcançada a convergência. Assim que a tarefa é concluída, uma janela é aberta para mostrar os resultados no arquivo de saída, assumindo que o refinamento tenha ocorrido com sucesso.

A função objetivo pode ser descrita em uma notação de matriz como

$$\mathbf{u} = \mathbf{r}^T \mathbf{W} \mathbf{r} \quad (1)$$

em que \mathbf{r} é o vetor de resíduos, ($\mathbf{r} = \mathbf{y}_{\text{observado}} - \mathbf{y}_{\text{calculado}}$, sendo $\mathbf{y}_{\text{observado}}$ a representação das medidas em mV, pH ou absorvância) e \mathbf{W} a matriz de pesos. Para minimizar a função objetivo, é utilizado o Método de Gauss-Newton-Marquadt, que pode ser representado pela equação

$$(\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J} + \lambda \mathbf{D}) \Delta \mathbf{p} = \mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{r} \quad (2)$$

onde \mathbf{J} é a matriz Jacobiana e $\Delta \mathbf{p}$ é o vetor de deslocamento aplicado aos parâmetros. \mathbf{D} contém os elementos diagonais de $\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J}$ e λ é o parâmetro de Marquardt (GANS, 1996).

Além da função de refino das constantes, há alguns programas auxiliares que acompanham o programa principal, como o *HySS (Hyperquad Simulation Species)*, uma ótima ferramenta para construção dos diagramas de distribuição das espécies.

Há uma versão atualizada do programa *Hyperquad* (a versão 2008) em que a função de refino de constantes a partir de dados de absorbância foi retirada e incluída em um programa a parte.

2.2 Voltametria e Polarografia

A voltametria consiste em um conjunto de técnicas analíticas que se fundamentam na medida da corrente produzida em função da aplicação de potenciais conhecidos. Dentro de uma célula eletroquímica (Figura 03), o fluxo desta corrente se dá junto ao eletrodo de trabalho, e ocorre em função da eletrólise de uma espécie química. Seus valores, quando associados aos respectivos valores de potencial em um diagrama, geram uma curva denominada de voltamograma. O protocolo utilizado na obtenção do sinal analítico conduz a diferentes técnicas, cada uma com características e nomes específicos, como a voltametria de pulso, voltametria de retificação faradaica, voltametria de transformada de Fourier, polarografia, voltametria de onda quadrada, entre outras (HARRIS, 2005; BARD, 2008).

Segundo as normas da IUPAC, o termo polarografia deve ser utilizado quando uma curva de corrente versus potencial é registrada com um eletrodo de trabalho cuja superfície é periódica ou continuamente renovada. O eletrodo de mercúrio gotejante (do inglês, *Dropping Mercury Electrode* – DME) e o eletrodo de mercúrio de gota estática (do inglês, *Static Mercury Dropping Electrode* – SMDE), posteriormente desenvolvido, são os exemplos clássicos da polarografia. A utilização dos demais eletrodos é enquadrada na voltametria, como o de filme de mercúrio, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodos constituídos por metais nobres como ouro e platina, entre outros eletrodos (KAPOOR, 1991; BARD, 1998; SCHNEIDER, 2010).

2.2.1 Princípio da medida

O princípio da medida na voltametria e polarografia envolve, essencialmente, a obtenção da corrente com a mudança linear do potencial. O potencial aplicado nos eletrodos da célula de medida é idêntico ao fornecido pela fonte de potenciais e, com mesma velocidade, é alterado para valores mais positivos ou negativos (varredura). Quando o potencial para a oxidação ou redução do analito é alcançado, flui uma corrente entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. A corrente limitante obtida durante uma medida pode ser considerada como a soma das correntes de difusão e migração, desde que outros fatores interferentes não estejam presentes (KAPOOR, 1991).

A reprodutibilidade em uma medida voltamétrica é controlada pela velocidade de difusão da espécie eletroativa de interesse em direção ao eletrodo. Para tal deve-se minimizar a convecção efetuando a medida com a solução em repouso. Já os efeitos interferentes da corrente de migração são minimizados pela adição de um eletrólito inerte em elevada concentração (eletrólito suporte).

2.2.2 Célula voltamétrica

As medidas voltamétricas e polarográficas são obtidas em uma célula com eletrodos de trabalho bem característicos, com superfície de aproximadamente 110 mm^2 , nos quais, através de uma passagem de corrente, aplica-se uma densidade de corrente relativamente alta (KAPOOR, 1991).

As montagens mais atuais utilizam células em que são acoplados três eletrodos, o de trabalho, o de referência e o contra eletrodo (Figura 03). A aplicação do potencial desejado é imposta entre o eletrodo de trabalho e o de referência, no entanto a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. O objetivo disto é impedir a eletrólise de espécies eletroativas no eletrodo de referência, preservando o seu potencial, mesmo sob condições de alto fluxo de corrente dentro

da célula. Além disto, este tipo de acoplamento também permite eliminar a resistência da ponte salina e o consequente potencial *ohmico* da gota (BARD, 1998).

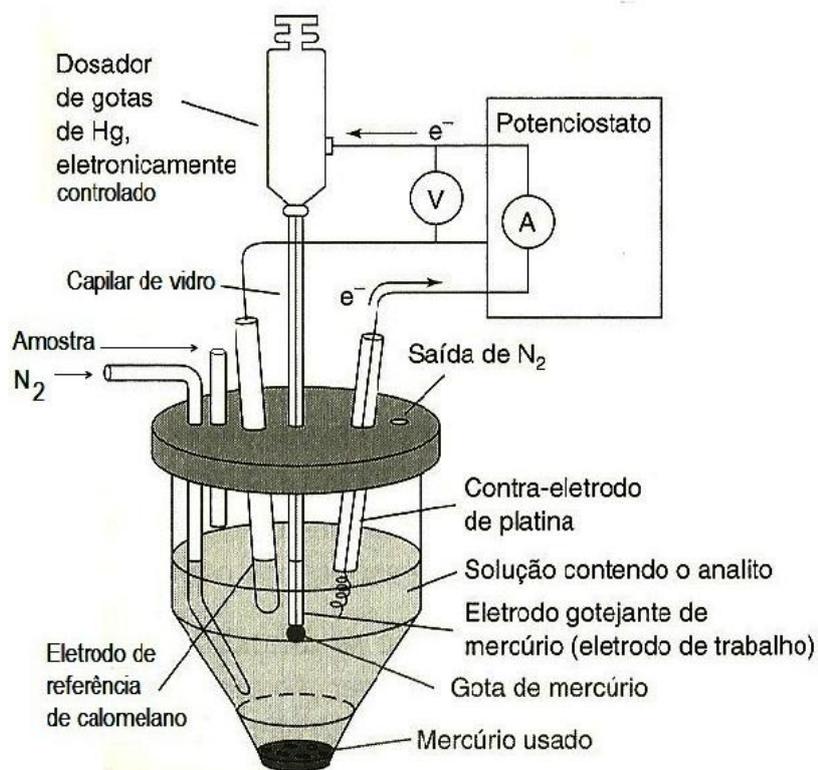


Figura 03 – Representação de uma célula voltamétrica acoplada com três eletrodos

Fonte: HARRIS, 2005.

Além do sistema de eletrodos, os equipamentos atuais são dotados de um sistema de agitação mecânica e de fluxo controlado de nitrogênio gasoso. A finalidade da agitação é assegurar a homogeneidade da solução antes de efetuar a medida, enquanto a corrente de gás visa eliminar a presença de oxigênio, o qual pode se reduzir no eletrodo de trabalho, alterando o valor da corrente.

2.2.3 Voltametria de pulso diferencial

Nesta técnica, pequenos pulsos (2 – 100 mV) são superpostos em intervalos fixos em uma rampa linear de potencial. A maior porção da corrente de fundo é eliminada e apenas a sua componente faradaica (devida à reação redox no eletrodo) é registrada, melhorando significativamente o limite de detecção.

A medida é realizada tomando duas amostras de corrente, uma antes da aplicação do pulso (i_1) e outra ao final do tempo da gota (i_2). À medida que a varredura de potenciais se aproxima do potencial de meia onda (potencial específico para cada espécie eletroativa simbolizado por $E_{1/2}$), o valor da segunda medida (i_2) aumenta significativamente em relação a i_1 . Desta forma, plotando-se Δi ($\Delta i = i_2 - i_1$) *versus* o potencial aplicado (E) é possível obter um voltamograma em forma de pico ou de sino. O alto poder de resolução e a sensibilidade alcançados na voltametria de pulso diferencial são baseados na eliminação da corrente capacitiva (devida à atração e repulsão entre íons e o eletrodo polarizado), permitindo alcançar limites de detecção da ordem de 10^{-8} M (KAPOOR, 1991).

Todas as medidas voltamétricas utilizadas neste trabalho foram obtidas por pulso diferencial. Em consequência disto as demais técnicas não serão detalhadas. Uma descrição das principais técnicas de obtenção do sinal voltamétrico pode ser encontrada em bibliografia especializada (KAPOOR, 1991; BARD, 2008).

2.2.4 Complexos e a medida voltamétrica

A medida voltamétrica realizada em um íon metálico na presença de um complexante é determinada por fenômenos que ocorrem em três diferentes regiões da célula voltamétrica (DÍAZ-CRUZ, 2000).

O primeiro refere-se ao corpo da solução (local em que está presente a maior parte da amostra não afetada pelo processo eletródico), onde há um equilíbrio químico no qual a concentração da cada espécie é constante.

O segundo diz respeito à camada de difusão (uma fina camada que envolve o eletrodo), onde as concentrações das espécies são afetadas pelo processo eletródico e mudam progressivamente em função do tempo, potencial aplicado, e a distância do eletrodo. Esta mudança na concentração é determinada, principalmente, pela taxa de consumo das espécies no eletrodo, pela velocidade de difusão e pela influência das reações que podem converter uma espécie em outra à medida que são transportadas ao longo da camada de difusão. A influência deste último fenômeno é determinada pela relação entre a cinética de reações de associação – dissociação dos complexos e o tempo gasto pela medida voltamétrica. Se esta cinética é muito mais lenta que a medida, não haverá conversão entre as espécies na camada de difusão e cada espécie pode ser transportada independentemente para o eletrodo. Os complexos que se encaixam nesta situação são considerados eletroquimicamente inertes. Por outro lado, se a cinética é muito mais rápida que a medida, cada variação na concentração de qualquer espécie é prontamente corrigida pela associação ou dissociação de outras espécies. Desta forma, ocorrerá uma contínua interconversão de espécies que satisfaz todas as constantes de estabilidade ao longo da camada de difusão, produzindo um único sinal proporcional à concentração total da espécie metálica. Neste caso os complexos são considerados lábeis (DÍAZ-CRUZ, 2000; ESTEBAN, 2003).

O terceiro relaciona-se com a superfície do eletrodo, local onde ocorre a medida da corrente, a qual é proporcional ao fluxo de espécies que são ali reduzidas. Este fluxo é determinado pela taxa de transferência de elétrons na superfície do eletrodo e também pela taxa de transporte das espécies eletroativas em suas vizinhanças.

Em decorrência destes fenômenos, podem ocorrer deslocamentos nos picos de voltamogramas de íons metálicos causados pela adição de um ligante, permitindo o estudo de complexos e a determinação de constantes de estabilidade. Esta mudança ocorre em direção a potenciais mais negativos uma vez que, para romper a interação metal-ligante e reduzi-lo é necessária uma maior energia do que aquela imposta para reduzir o metal livre (GRABARIC,1996). Além disto a velocidade de difusão do metal em direção ao eletrodo diminui, pois o complexo é maior que o metal sozinho (DÍAZ-CRUZ, 2000; ESTEBAN, 2000; ESTEBAN, 2006).

Esteban et al. (2000) demonstraram que, mesmo em alguns casos onde a mudança de potencial ocasionada pela adição de um ligante é muito sutil (se comparada a do íon metálico livre), ainda é possível obter os perfis dos complexos formados. Entretanto, isto é alcançado pelo uso de técnicas quimiométricas específicas, as quais serão abordadas posteriormente neste trabalho.

Dentre as formas de como dados voltamétricos podem ser utilizados para o estudo de complexos, pode-se destacar o método de Lingane como sendo um dos precursores. Este método se baseia em uma derivação da equação de Nernst que leva em conta as proporções com que metal e ligante formam o complexo.

2.2.5 Método de Lingane

Em 1941, J. J. Lingane publicou um método desenvolvido para calcular as constantes de estabilidade de complexos inorgânicos inertes a partir de medidas voltamétricas no eletrodo de mercúrio, que também ficou conhecido como *Método de redução ao estado metálico* (ROSE, 1964; KAPOOR, 1991).

O método fundamenta-se na mudança do potencial de redução de um íon metálico no eletrodo de mercúrio para valores mais negativos quando a ele é adicionado um ligante. Considerando a equação (3)



que pode ser analisada ocorrendo em duas etapas



em que K corresponde às respectivas constantes de formação, M é o metal, L o ligante, ML_m o complexo formado e ne o número de elétrons envolvidos na redução. Lingane derivou destas reações a relação existente entre o potencial na gota de

mercúrio E, o potencial de meia onda $E_{1/2}$, a corrente i e a corrente limitante i_d como mostrado na equação (6).

$$E_{25^\circ\text{C}} = E_{1/2} - \frac{0,0591}{n} \log \frac{i}{i_d - i} \quad (6)$$

O gráfico de E *versus* $\log (i/i_d - i)$ será uma reta para um potencial reversível e a inclinação será $0,0591/n$. A partir das equações (3), (4) e (5) Lingane estabeleceu que

$$E_{1/2} = E^\circ - \frac{0,0591}{n} \log K - \frac{0,0591}{n} \log \frac{K_{ML}}{K_{MHg}} - \frac{m \cdot 0,0591}{n} \log [L] \quad (7)$$

onde E° é o potencial padrão do metal da amálgama do eletrodo, a razão K_{ML}/K_{MHg} depende das condições experimentais e das características do eletrodo, m é número de ligantes coordenados ao metal e $[L]$ é a concentração do ligante. Em consequência disto a inclinação da reta, obtida no gráfico de $E_{1/2}$ *versus* $\log [L]$, é $-0,0591m/n$, a partir do qual m pode ser encontrado. Por outro lado, a constante de estabilidade pode ser encontrada pela equação

$$\underbrace{E_{1/2} - (E_{1/2})_s}_{\mathbf{y}} = - \underbrace{\frac{0,0591}{n} \log K}_{\mathbf{b}} - m \underbrace{\frac{0,0591}{n}}_{\mathbf{a}} \underbrace{\log [L]}_{\mathbf{x}} \quad (8)$$

em que $(E_{1/2})_s$ é o potencial na ausência do ligante. Colocando-se em um diagrama o termo do lado esquerdo da igualdade da equação (8) contra $[L]$, obtém-se uma reta

cuja interceptação no eixo das ordenadas fornece $(-0,0591/n) \log K$ e, conseqüentemente, podemos encontrar o valor de K (ROSE, 1964).

Este método foi bastante utilizado para investigar a existência de muitos complexos, como o íon biplumbito (HPbO_2^-). Entretanto, o método pode ser aplicado em sistemas onde apenas uma espécie complexa está presente. Nos casos em que há formação de mais de um complexo, o método ainda pode ser utilizado, desde que as constantes de estabilidade sejam muito diferentes entre si (KAPOOR, 1991).

2.3 Complexos

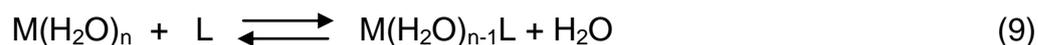
2.3.1 Formação dos complexos

Ainda que o conceito de compostos complexos seja amplo, considera-se uma reação de formação de complexos aquela em que uma ou várias moléculas são deslocadas por outras espécies químicas, estas espécies químicas unidas ao íon central se denominam ligantes (L), enquanto que o número máximo de átomos doadores dos ligantes (n) se denomina número de coordenação do íon central. De acordo com o número de sítios de ligação envolvidos na formação do complexo, o ligante pode ser monodentado, bidentado, tridentado e polidentado. Quando o ligante participa do complexo com no mínimo dois grupos funcionais, ele é denominado quelante e complexo formado quelato. Os quelatos são mais estáveis que complexos com ligantes monodentados, pois a dissociação deste tipo de complexo implica na ruptura de duas ligações em vez de uma (LEE, 2003; HARRIS, 2005).

A formação do complexo é o resultado de uma interação ácido-base de Lewis, na qual o átomo central com um orbital vago atrai um par de elétrons de um átomo doador do ligante. Para isto, o íon central deve dispor de orbitais simetricamente adequados, estericamente disponíveis e de baixa energia. O ligante deve ter átomos (N, O, S, etc.) com pares eletrônicos não compartilhados.

2.3.2 Constantes de estabilidade

A reação entre um íon metálico e um ligante pode ser representada de forma geral pela equação



O termo constante de estabilidade cumulativa (β) serve para designar a constante de equilíbrio para formação de um complexo em particular, a partir dos componentes M e L, podendo ser representada por:

$$\beta = \frac{[M(H_2O)_{n-1}L]}{[M(H_2O)_n][L]} \quad (10)$$

sendo, no equilíbrio, $[M(H_2O)_{n-1}L]$ a concentração do complexo formado, $[M(H_2O)_n]$ a concentração do íon metálico e $[L]$ a concentração do ligante (MARTELL, 1992). A maior parte das publicações científicas tem omitido, por uma questão de simplicidade, as "n" moléculas de água que hidratam o íon metálico, representando-o apenas pelo seu símbolo (Cd, Zn, Ag, etc.).

Medidas de variação da concentração livre de somente uma espécie com a composição geral da solução podem, em princípio, levar a valores da constante de estabilidade. As variações de propriedades adequadas com a composição da solução podem, entretanto, ser exploradas como fonte de informações sobre os complexos que são formados. Por exemplo, medidas potenciométricas podem ser designadas de maneira que sua força eletromotriz forneça uma medida da concentração do íon metálico não complexado (ROSSOTI, 1974).

Na formação sucessiva de complexos de índice de coordenação superior a unidade, podem ser consideradas as seguintes reações e constantes:



É oportuno salientar que ainda não há uma uniformidade total no modo como as constantes são representadas ou designadas, podendo haver variações entre algumas publicações. As notações mais comuns de K e β estão apresentadas no apêndice A.

As constantes K_1 , K_2 e K_3 são denominadas constantes sucessivas de formação de cada complexo. Os índices indicam a etapa de complexação, bem como o número de ligantes unidos ao metal.

Em muitos casos é conveniente utilizar as constantes cumulativas (β), que para o complexo ML_3 é dada pela relação



2.3.3 Influência da Força iônica nas constantes de estabilidade

As constantes de equilíbrio para formação de complexos em solução a uma dada temperatura são usualmente representadas em função do quociente de atividade (constante de estabilidade termodinâmica) e deveriam ser independentes do meio iônico, ou em função do quociente de concentração (constante de estabilidade estequiométrica), que são válidas somente em uma solução de composição particular. Se a constante de estabilidade estequiométrica for determinada na presença de um grande excesso de um eletrólito forte e inerte, e as soluções em estudo forem bastante diluídas, é possível assumir que os coeficientes de atividade são independentes da concentração das espécies reagentes e dependem somente da natureza e concentração do eletrólito principal. Constantes

de estabilidade estequiométricas obtidas sob estas condições são também quantidades termodinâmicas, referentes ao estado padrão no qual todos os coeficientes de atividade são unitários.

Se no tratamento matemático do equilíbrio químico se utilizar a constante termodinâmica, K_t , esta não se modifica com a força iônica, já que é constante e independente dos fatores de atividade. Entretanto a constante de equilíbrio K , não termodinâmica, está relacionada com K_t pelos coeficientes de atividade das espécies que interferem no equilíbrio (MARTI, 1994). Para a reação:



a relação entre K e K_t é:

$$K_t = \left[\frac{\gamma_C \gamma_D}{\gamma_A \gamma_B} \right] \cdot K \quad (16)$$

Sendo K_t constante, só será K , se o termo correspondente aos coeficientes de atividade (γ) o for.

Se em uma reação química houver só espécies moleculares não carregadas, os coeficientes de atividade são unitários, e a constante de equilíbrio será igual a termodinâmica, não dependendo da força iônica do meio (MARTI, 1994).

A adoção do então chamado método do meio iônico constante, valores dos coeficientes de atividade podem permanecer efetivamente constantes. De acordo com este método, um grande excesso de um sal, eletrólito de baixa valência é adicionado a solução sob investigação (ex. NaCl, NaClO₄ ou KNO₃). Estes íons monovalentes, que devem ser quimicamente inertes ao sistema químico em estudo, determinam a força iônica da solução e o conjunto de coeficientes de atividade para todos os íons e moléculas formados nos sistemas sob investigação serão constantes. Na prática, isto se mantém enquanto a concentração equivalente dos compostos investigados não exceder aproximadamente 10 % da concentração do

eletrólito suporte. Isto corresponde ao limite superior de uma “janela” experimental, na qual os coeficientes de atividade podem ser incorporados ao valor de β , e as concentrações químicas podem ser usadas no lugar das atividades (MARTELL, 1992).

2.3.4 Ácidos e bases duros e moles

Segundo esta teoria, os íons metálicos podem ser divididos em dois grupos, dependendo da estabilidade de seus complexos com determinados ligantes.

Os metais do tipo "A" , que incluem os íons pequenos dos grupos 1 e 2 assim como os elementos de transição situados mais a esquerda na tabela periódica, em particular aqueles em estados de oxidação mais elevados. Estes metais formam complexos mais estáveis com doadores de oxigênio e nitrogênio (amônia, aminas, cetonas e álcoois), com fluoreto e cloreto.

Os metais do tipo "B" incluem os íons dos metais de transição localizados á direita da classificação periódica e os complexos de metais de transição em baixo estado de oxidação. Estes se coordenam preferencialmente com ligantes como iodeto, tiocianato e cianeto (LEE, 2003).

Esta classificação empírica foi útil na previsão das estabilidades relativas de complexos. Pearson, que a desenvolveu, estendeu o conceito para uma grande variedade de interações ácido-base. Assim, os metais do tipo "A" são pequenos e pouco polarizáveis e combinam-se preferencialmente com ligantes de mesma característica, os quais foram denominados de ácidos e bases duras respectivamente. Da mesma forma, os metais do tipo "B" e os ligantes maiores e mais polarizáveis, com quem se combinam preferencialmente, receberam a denominação de ácidos e bases moles respectivamente. A partir disto, ele estabeleceu a relação de que ácidos duros tem preferência de reagir com bases duras e ácidos moles tem preferência de reagir com bases moles. Esta regra incorpora, por exemplo, as reações do tipo ácido-base mais comuns (H^+ é um ácido duro e OH^- e NH_3 são bases duras), além de várias reações que envolvem a

formação de complexos simples e de complexos com ligantes que forma ligações pi (COWAN, 1993; LEE, 2003).

É possível correlacionar, de um modo geral, a capacidade de complexação dos metais pelo enunciado considerando a afinidade entre ácidos e bases duros e entre ácidos e bases moles. Entretanto, este princípio não deve ser encarado como exclusivo, pois sob condições adequadas, ácidos moles podem complexar com bases duras ou ácidos duros com bases moles, resultando em complexos de baixa estabilidade, uma vez que ambos os componentes são incompatíveis (MOTULSKY, 1995; POLLI, 2004; VOGEL, 2005). A tabela 01 mostra os principais ácidos e bases duros e moles.

Tabela 01– Ácidos e bases duros e moles

Ácidos duros	Ácidos moles	Ácidos intermediários
H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Al ³⁺ , BF ₃ , Al(CH ₃) ₂ , AlCl ₃ , Sc ³⁺ , Ti ⁴⁺ , VO ²⁺ , WO ⁴⁺ , Ce ³⁺ , Lu ³⁺ , CO ₂ , SO ₃	Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Cu ⁺ , Au ⁺ , Hg ⁺ , Cd ²⁺ , (Hg ₂) ²⁺ , Tl ⁺ , B(CH ₃) ₃ , B ₂ H ₆ , [Fe(CO) ₅], [Co(CN) ₅] ³⁻	Cr ³⁺ , Co ³⁺ , Fe ³⁺ , MoO ³⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , SO ₂ , NO ⁺ , Ru ²⁺
Bases duras	Bases moles	Bases intermediárias
NH ₃ , RNH ₂ , N ₄ H ₄ , H ₂ O, ROH, R ₂ O, OH ⁻ , NO ³⁻ , ClO ₄ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , F ⁻ , Cl ⁻ , CH ₃ COOH ⁻	H ⁻ , CN ⁻ , SCN ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , I ⁻ , RS ⁻ , R ₂ S, CO, B ₂ H ₆ , C ₂ H ₄ , R ₃ P, P(OR) ₃	SO ₄ ²⁻ ,imidazol, piridina

Adaptado de LEE, 2003.

2.3.5 Importância das constantes de estabilidade

As constantes de estabilidade para equilíbrios do tipo metal-ligante e próton-ligante proporcionam dados para muitas análises quantitativas em sistemas industriais, biológicos, geoquímicos e ambientais. Seus valores estão relacionadas à variação de energia livre, uma medida fundamental da força motriz de uma reação química. Esta relação pode ser demonstrada pela equação

$$\Delta G^0 = -2,303 RT \log K \quad (17)$$

onde ΔG^0 é variação da energia livre, R é uma constante ($R=8,314 \text{ J/kmol}$), T a temperatura e K a constante de equilíbrio (BERTHON, 1995). Isto demonstra que as constantes quantificam a estabilidade relativa de reagentes e produtos em um sistema em equilíbrio (MARTELL, 1992, BERTHON, 1995; LEVERRIER, 2007).

Cálculos com base em constantes de estabilidade podem prever, dentro da confiabilidade dos resultados, a dependência da composição da solução (metal ou composição do ligante) em função do pH e as proporções estequiométricas de metal e ligante. Desta forma, a distribuição do metal entre ligantes concorrentes e de ligantes entre metais concorrentes e do próton pode ser investigada (MARTELL, 1992; LEVERRIER, 2007).

2.4 RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS

A Resolução Multivariada de Curvas (do inglês, *Multivariate Curve Resolution* - MCR) compreende um conjunto de técnicas matemáticas que visam descrever a contribuição individual dos componentes puros dentro de um conjunto de dados. O método consiste, essencialmente, em decompor uma matriz de dados **X** no produto de duas matrizes de dimensões menores **C** e **S** (TAULER, 1993a; TAULER 1993b; MENDIETA, 1996; ESTEBAN, 2000; DÍAZ-CRUZ, 2000; JAUMOT, 2002; JIANG, 2002, ESTEBAN 2006, GUTERRES, 2006). Genericamente isto pode ser expresso na equação:

$$\mathbf{X} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (18)$$

onde o sobrescrito T denota a transposta da matriz e **E** é a matriz de resíduos.

Na equação (18), a partir da decomposição do conjunto de dados **X**, obtém-se **C**, que contem os perfis de concentração dos componentes puros, **S**, a matriz com os sinais individuais de cada componente e, como já mencionado, a matriz **E**, que compreende a variação nos dados não explicada em **C** e **S**, ou seja, a falta de

ajuste do modelo. Cada par de valores $\mathbf{c}_i; \mathbf{s}_i^T$ define a contribuição de cada componente para dar origem ao conjunto total de dados \mathbf{X} . É importante definir, dentro deste contexto, componente como sendo qualquer espécie capaz de dar uma resposta pura, distinta e real (GEMPERLINE, 2006). O conjunto de dados \mathbf{X} é formado por uma série de medidas, que devem apresentar linearidade entre o sinal e a concentração ou outra grandeza que esteja sendo avaliada (PUSTY, 2006; BRONW, 2009). Estes sinais podem ser espectros obtidos a partir de titulações [TAULER, 1993; ABDOLAHHI, 2010) ou de técnicas hífenadas (TAULER, 1993; TAULER, 1995; BRO, 1997; TAULER, 2001, JAUMOT, 2005; SÁNCHEZ-PONCE, 2005; ZHANG, 2006; LEITÃO 2007; JAUMOT, 2010), voltamogramas (DÍAZ-CRUZ, 1997; MENDIETA, 1999; DÍAZ-CRUZ, 2000; ESTEBAN, 2000; GARRIGOSA, 2007; CHEN, 2008) ou qualquer medida que tenha natureza multivariada (GEMPERLINE, 2009, PUSTY, 2006; BROWN, 2009)

Lawton e Sylvestre são citados como os precursores desta metodologia (BROWN, 2009), que tem evoluído como uma excelente alternativa na resolução de sinais sobrepostos, uma vez que não requerem qualquer método anterior de calibração nem a hipótese de um modelo físico químico *a priori* (GEMPERLINE, 2006). Devido a grande versatilidade desta ferramenta, sua aplicação tem se tornado ampla, mostrando-se eficaz na avaliação de dados provenientes de testes de solubilidade (RAJKÓ, 2009), no estudo de biomarcadores (CHEN, 2008), na descrição da estrutura espacial de proteínas (GEMPERLINE, 2006), no estudo de dados de análises ambientais multivariados dispostos em grandes arranjos (OZEKI, 2004; TAULER, 2007), na resolução de imagens espectroscópicas (GEMPERLINE, 2006) e no estudo de interações metal-ligante (DÍAZ-CRUZ, 1997; ESTEBAN, 2000; DÍAZ-CRUZ, 2000; JAUMOT, 2002; ESTEBAN, 2007).

O objetivo principal na resolução de um sistema químico com vários componentes é obter informação útil a partir de dados brutos, isto é, descrever as contribuições individuais para a variação dos dados obtidos a partir de uma série de medidas. Tais dados devem estar dispostos em uma tabela ou matriz de dados \mathbf{X} $I \times J$, onde I representa o número de linhas e J o número de colunas.

O avanço da instrumentação analítica tem aumentado o poder de aquisição de informações, gerando conjuntos de dados volumosos que procuram descrever o comportamento Químico ou Físico Químico de sistemas ou processos. Entretanto,

por não serem seletivas, estas informações não descrevem a composição ou o comportamento dos seus diferentes compostos separadamente (TAULER, 2007). Tal problema tem sido habitualmente resolvido pelo uso de técnicas de separação (e.g., cromatografia, eletroforese capilar ou análise por injeção em fluxo) ou por tratamentos químicos realizados antes da medida propriamente dita, o que pode demandar tempo e custo para uma análise, além de poder interferir de forma indesejável nos compostos de interesse. Neste contexto, os métodos de resolução multivariada tem se destacado como uma alternativa altamente eficaz, permitindo a substituição de tratamentos químicos prévios por um conjunto de operações matemáticas e por algoritmos.

Para que se obtenham os resultados esperados a partir do método MCR é importante dispor os dados adquiridos de forma adequada. Para tal, os mesmos devem ser organizados em uma matriz de forma que tenhamos em uma direção as medidas propriamente ditas (absorvâncias, correntes, etc.) e, em outra direção, a variação da composição do sistema (concentrações, tempos de retenção, etc).

A figura 04 mostra como os dados podem ser dispostos para efetuar uma resolução multivariada de curvas. As linhas desta matriz podem ser, por exemplo, valores de correntes obtidas por voltametria (DÍAZ-CRUZ, 1997; ESTEBAN, 2000; DÍAZ-CRUZ, 2000; SAITO, 2001; JAUMOT, 2002; ESTEBAN, 2007) ou espectros (TAULER, 1993). Cada linha corresponderia a uma varredura a diferentes concentrações relativas de duas ou mais espécies ou a diferentes tempos de retenção em uma coluna cromatográfica (TAULER, 1993a; TAULER, 1993b; MANNE, 1995; JIANG, 2004; ABDOLAHHI, 2007; TAULER, 2007). Temos então um conjunto de medidas, não seletivas, que deverá ser resolvido de forma a se obter os dados referentes aos componentes puros. Um exemplo prático de um conjunto de dados multivariados pode ser observado na figura 05, que representa uma série de voltamogramas obtidos pela varredura de diferentes proporções entre um ligante e um íon metálico.

$$X = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & a_{1j} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2j} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{i1} & a_{i2} & \dots & a_{ij} \end{pmatrix}$$

Figura 04 – Exemplo genérico de uma matriz de dados

Na figura 05 é mostrada uma série de varreduras de potenciais que podem ser identificados por um conjunto de picos sobrepostos, dando um forte indício da presença de vários compostos no decorrer de cada medida, no entanto os voltamogramas mostram pouca informação útil. Assim, a aplicação de um método matemático apropriado pode se constituir uma boa ferramenta que permita obter tais informações.

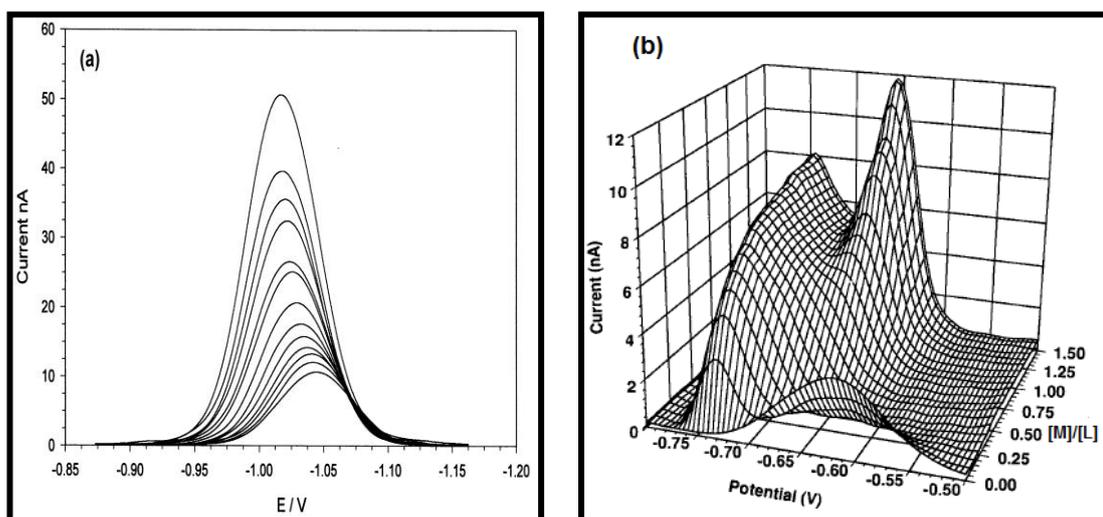


Figura 05 – Exemplo de uma série de voltamogramas obtidos para diferentes proporções metal-ligante. (a) Diagrama bidimensional (ESTEBAN, 2000); (b) diagrama tridimensional (MENDIETA, 1996).

No que diz respeito à resolução multivariada de curvas a dados voltamétricos é importante destacar a real necessidade de que a corrente (sinal da voltametria) seja a soma individual de cada espécie química presente no sistema. Uma vez que nas medidas espectroscópicas a linearidade do sinal é normalmente alcançada dentro da região espectral onde a lei de Beer é seguida, na voltametria isto não é tão comum. Fenômenos que ocorrem na interface eletrodo/solução podem interferir de forma significativa na medida, principalmente quando se combinam grandes diferenças na mobilidade das espécies eletroativas e na natureza dos processos de eletrodo (DÍAZ-CRUZ, 2000; ESTEBAN, 2000; BROWN, 2009).

2.4.1 Estimativa do número de componentes

É importante na execução do método de resolução multivariada de curvas, obter uma estimativa do número de componentes do sistema, isto é, o total de contribuições químicas individuais responsáveis pela variação dos sinais. No caso da voltametria, a matriz de dados deve estar organizada de maneira que os valores das correntes, obtidas a potenciais igualmente espaçados, fiquem dispostos em linhas, assim, cada uma das muitas linhas na matriz representará uma varredura obtida por uma determinada proporção metal-ligante. Esta ordenação nos dados nos permite efetuar uma decomposição em valores singulares (do inglês, *Singular Value Decomposition* – SVD) da matriz (MANNE, 1995; RUCKEBUSCH, 2002; ESTEBAN, 2003). Desta forma, é possível determinar o número de contribuições linearmente independentes, no caso de um conjunto de medidas voltamétricas o que se traduz no número de espécies eletroativas independentes capazes de contribuir para o sinal da corrente (DÍAZ-CRUZ, 1997).

2.4.1.1 Decomposição em valores singulares

Seja \mathbf{X} uma matriz ($I \times J$) composta por números reais. Então existe uma matriz ortogonal \mathbf{U} ($I \times I$), e uma matriz ortogonal \mathbf{V} ($J \times J$) que satisfaz a seguinte decomposição:

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^T \quad (19)$$

Os elementos da diagonal ($s_{r,r}$) da matriz \mathbf{S} ($I \times J$) são maiores que zero e todos os outros elementos fora desta diagonal são iguais a zero. A figura 06 ilustra a estrutura da matriz \mathbf{S} quando $I > J$.

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} s_{1,1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & s_{2,2} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & s_{3,3} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \ddots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & s_{R,R} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Figura 06 – Estrutura da matriz \mathbf{S} obtida por decomposição em valores singulares.

Os elementos $s_{r,r}$ são chamados de valores singulares de \mathbf{X} , sendo que estes são positivos, constantes e satisfazem a seguinte relação:

$$s_{1,1} \geq s_{2,2} \geq s_{3,3} \dots \geq s_{r,r} \geq \dots \geq s_{R,R} \geq 0 \quad (20)$$

O valor singular $s_{R,R}$, que é o último valor singular diferente de zero, informa o posto R da matriz \mathbf{X} . O posto de uma matriz é definido como o número de linhas linearmente independentes da matriz \mathbf{X} . A determinação do posto da matriz está associada à determinação do número de componentes do modelo bilinear. A decomposição em valores singulares pode ser vista como uma expansão da matriz \mathbf{X} , da mesma forma que as expansões de Taylor para um polinômio. Se R é o posto da matriz \mathbf{X} , então esta matriz pode ser representada como a soma da contribuição do produto dos vetores \mathbf{u}_r por \mathbf{v}_r para todo $r = 1, 2, \dots, R \leq \min(I, J)$, conforme mostra a equação a seguir:

$$\mathbf{X} = \sum_{r=1}^R s_{r,r} \mathbf{u}_r \mathbf{v}_r^T = \overline{\mathbf{U}}_R \overline{\mathbf{S}}_R \overline{\mathbf{V}}_R^T \quad (21)$$

onde, $\mathbf{U} = [\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \dots, \mathbf{u}_R]$ tem a dimensão de $I \times R$, e $\mathbf{V} = [\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_R]$ tem dimensão de $J \times R$. A matriz \mathbf{S}_R é diagonal de dimensão R com os elementos da diagonal iguais aos valores singulares $s_{r,r}$. As matrizes $\overline{\mathbf{U}}$, $\overline{\mathbf{S}}$ e $\overline{\mathbf{V}}$ são denominadas de matrizes truncadas.

A decomposição em valores singulares de uma matriz \mathbf{X} pode ser interpretada como uma compressão do número de variáveis necessárias para descrever \mathbf{X} , pois $R \leq \min(I, J)$. A informação contida nas variáveis originais é comprimida em um modelo contendo R variáveis latentes (GUTERRES, 2006).

De um ponto de vista matemático, o posto de uma matriz é o número de linhas ou colunas linearmente independentes, ou seja, o número de vetores que não podem ser escritos como combinação linear de outros vetores. Em se tratando de medidas voltamétricas, isto representa o número de espécies eletroativas presentes no sistema em estudo.

2.4.2 O problema dos mínimos quadrados

Seja \mathbf{X} uma matriz $I \times J$ formada pelas variáveis independentes e \mathbf{y} um vetor $I \times 1$ formado pela variável dependente. Um modelo linear que relaciona \mathbf{y} com \mathbf{X} é expresso pelo sistema de equações:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{e} \quad (22)$$

onde \mathbf{b} é o coeficientes da função linear que relaciona cada coluna (variável) de \mathbf{X} com \mathbf{y} e os elementos do vetor \mathbf{e} são os resíduos do modelo, ou seja à porção dos dados que não pode ser descrita pelo produto \mathbf{Xb} .

Um sistema de equações lineares pode apresentar umas das seguintes características:

- a. Número de linhas iguais ao número de colunas ($I = J$);
- b. Número de linhas maior que número de colunas ($I > J$);
- c. Número de linhas menor que número de colunas ($I < J$);

Além disto pode-se ter ainda:

- d. Posto (\mathbf{X}) $\leq \min(I, J)$.

O problema dos mínimos quadrados (do inglês, *leasting square* - LS) consiste em encontrar um vetor de coeficientes \mathbf{b} para o qual, o produto \mathbf{Xb} é a melhor aproximação de \mathbf{y} . Este problema é enunciado da seguinte forma: “Dada uma matriz real \mathbf{X} de dimensão $I \times J$ com posto(\mathbf{X}) $\leq \min(I, J)$ e dado um vetor \mathbf{y} de dimensão $J \times 1$, encontre um vetor \mathbf{b} que minimiza a soma quadrática dos resíduos $\mathbf{y} - \mathbf{Xb}$.

É possível notar, de acordo com a equação (23), que o vetor de resíduos é calculado como:

$$\mathbf{e} = \mathbf{y} - \mathbf{Xb} \quad (23)$$

e o problema dos mínimos quadrado consiste em obter um modelo linear que minimiza a soma quadrática dos resíduos. O enunciado do problema dos mínimos quadrados é simbolicamente representado por:

$$\min_{\mathbf{b}} \|\mathbf{y} - \mathbf{Xb}\|_2^2 \quad (24)$$

Para um sistema linear com $I > J$ e posto $(\mathbf{X}) = J$, a solução dos mínimos quadrados pode ser calculada da seguinte forma:

$$\mathbf{X}^T \mathbf{y} = \mathbf{X}^T \mathbf{Xb} \quad (25)$$

de modo que:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (26)$$

A equação (26) é a solução dos mínimos quadrados e pode ser implementada diretamente em “pacotes computacionais” como MATLAB, *software* R e Scilab. Todavia em linguagens de programação como Fortran ou C, a solução dos

mínimos quadrados é calculada através do método de decomposição de Cholesky, ou do método de decomposição QR (BJÖRK, 1996 apud GUTERRES, 2006). Estes métodos encontram-se disponíveis também nos *softwares* Matlab, Scilab e R. Deve-se salientar, ainda, que a inversão da matriz de covariância $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$, não é um método numérico eficiente e, dependendo do número de condição desta matriz, a solução obtida pode ser instável, mesmo quando $\text{posto}(\mathbf{X}) = J$.

Uma das situações mais encontradas em química, é a de resolver um sistema de equações lineares onde $I < J$ ou $I > J$ sendo que o posto $(\mathbf{X}) < \min(I, J)$. Estes sistemas são conhecidos por sistemas com deficiência de posto. Neste caso, uma forma mais estável de calcular a solução para o problema dos mínimos quadrados é usar o método SVD tal como mostrado a seguir:

$$\mathbf{b} = \bar{\mathbf{V}}\bar{\mathbf{S}}^{-1}\bar{\mathbf{U}}^T\mathbf{y} \quad (27)$$

onde \mathbf{U} , \mathbf{V} e \mathbf{S} são as matrizes truncadas definidas na equação (21).

Um teorema importante é que se o posto da matriz \mathbf{X} é menor que I ou J , então o problema dos mínimos quadrados não tem uma solução única. Mas entre todas as soluções possíveis, há uma única solução que minimiza o comprimento euclidiano de \mathbf{b} . Esta solução é denominada de “norma mínima” (GUTERRES, 2006).

2.4.3 Ambiguidade

A decomposição matemática de uma matriz de está sujeita à ambiguidade (LAWTON, 1997 e SYLVESTRE, 1974 apud GEMPERLINE, 2006). Isto significa que muitos pares de matrizes do tipo \mathbf{C} e \mathbf{S} descritos na equação (18) podem reproduzir o conjunto de dados da matriz \mathbf{X} com a mesma qualidade no ajuste, ou seja, a matriz original de dados pode ser obtida usando perfis de componentes diferentes em sua

forma (ambiguidade rotacional) ou em magnitude (ambiguidade de intensidade) daqueles procurados como verdadeiros (GRABARIC, 1996; GUTERRES, 2006).

Os dois tipos de ambiguidade podem ser explicados matematicamente. A principal equação associada aos métodos de resolução ($\mathbf{X}=\mathbf{CS}^T$) pode ser transformada conforme as equações:

$$\mathbf{X} = \mathbf{C} (\mathbf{T}\mathbf{T}^{-1}) \mathbf{S}^T \quad (28)$$

$$\mathbf{X} = (\mathbf{C}\mathbf{T}) (\mathbf{T}^{-1} \mathbf{S}^T) \quad (29)$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{C}' \mathbf{S}'^T \quad (30)$$

onde $\mathbf{C}' = \mathbf{C}\mathbf{T}$ e $\mathbf{S}'^T = (\mathbf{T}^{-1} \mathbf{S}^T)$ descrevem a matriz \mathbf{X} de forma tão correta quanto as verdadeiras matrizes \mathbf{C} e \mathbf{S}^T o fazem, entretanto \mathbf{C}' e \mathbf{S}'^T não são as soluções procuradas. O problema da ambiguidade rotacional pode fazer com que o número de soluções produzidas pelo método de resolução seja tão grande quanto o número de matrizes \mathbf{T} possa existir. Em muitos casos isto pode representar um conjunto infinito de soluções, a menos que \mathbf{C} e \mathbf{S} sejam forçadas a obedecer a determinados critérios, o que pode ser feito sob a forma de restrições (GEMPERLINE, 2006).

A ambiguidade de intensidade faz com que os parâmetros do modelo sejam resolvidos para uma escala de intensidade desconhecida, em que as matrizes \mathbf{C} e \mathbf{S} estão multiplicadas por um valor constante conforme a equação a seguir:

$$\sum_{r=1}^R \frac{1}{\alpha_r} \mathbf{c} (\alpha_r \mathbf{s}_r^T + \mathbf{E}) = \sum_{r=1}^R \mathbf{c}'_r \mathbf{s}'_r{}^T + \mathbf{E} \quad (31)$$

onde $\mathbf{c}' = (1/\alpha_r)\mathbf{c}$ e $\mathbf{s}' = \alpha_r\mathbf{s}_r$. É possível notar que a multiplicação da matriz \mathbf{S} por uma constante é compensada pela divisão da matriz \mathbf{K} por esta mesma constante. Em

termos práticos a ambiguidade de intensidade impede que possamos identificar a intensidade real dos sinais puros de cada composto (GUTERRES, 2006).

2.4.4 Restrições

Resultados quimicamente significativos, e não apenas matemáticos, podem ser alcançados através do uso de restrições no cálculo de otimização dos perfis de concentração e voltamogramas individuais, ou seja, procurar uma forma de adicionar ao modelo as características e propriedades de evolução do sistema eletroquímico. Para tal, o método de otimização dos mínimos quadrados alternantes tem apresentado ótimos resultados, baseando-se na implementação de restrições ao modelo que dependerão da característica do sistema químico e do método analítico utilizado (DE JUAN, 1997; BRO, 1997; ESTEBAN, 2000; JIANG, 2004; OZEKI, 2004; CHEN, 2008; GUTERRES, 2006).

Uma restrição é uma imposição na solução do modelo matemático. As restrições de cálculo são extensivamente utilizadas com o objetivo de minimizar o problema da ambiguidade de rotação, possibilitando a solução de um método de resolução de curvas a um intervalo pequeno de soluções possíveis (GEMPERLINE, 1999 apud GUTERRES, 2006; GARRIDO 2005, apud GUTERRES 2006). As principais restrições aplicadas aos métodos de resolução são a não negatividade, unimodalidade, “closure” e restrição da forma do sinal.

2.4.4.1 Não negatividade

A utilização da restrição de não negatividade leva o sistema a convergir para uma resposta em que os valores dos sinais (correntes no caso da voltametria) obtidos para os voltamogramas puros e das concentrações assumam apenas valores maiores que zero (TAULER, 1992; GUTERRES, 2006).

2.4.4.2 Unimodalidade

A restrição de unimodalidade admite a presença de apenas um máximo para o pico de cada perfil. No caso da voltametria, o conhecimento da forma característica de um voltamograma obtido por medidas realizadas a partir do ligante e do íon metálico puros fornece um bom subsídio para a implementação desta restrição (ESTEBAN, 2000; DÍAZ-CRUZ; 2000).

2.4.4.3 "Closure"

Esta restrição faz com que o sistema obedeça a um critério de balanço de massas. Desta forma, a soma de todas as concentrações de todas as espécies envolvidas no equilíbrio químico é forçada a ser igual a um valor constante (GEMPERLINE, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

- Potenciômetro digital modelo 827 pHLab, Metrohm;
- Balança analítica Sartorius com quatro casas decimais;
- Agitador magnético de bancada IML Labortechnik;
- Frascos plásticos de 13 mL com tampa;
- Frascos plásticos de 250 mL com tampa;
- Banho termostático JULABO V3 (25 – 37°C);
- Bureta automática Dosimat 665 com teclado para programação;
- Célula para titulação potenciométrica;
- Micropipetas Digipet (10 – 100 µL);
- Micropipetas Digipet (100 - 1000µL);
- Polarógrafo processador Metrohm 746 VA Trace Analyser.

3.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e a água empregada no preparo das soluções foi purificada pelo sistema de Mili-Q, com resistividade de 18,2 $\Omega \cdot \text{cm}$.

3.3 Cuidados com a contaminação

Em todas as etapas do trabalho foram utilizados apenas materiais plásticos (polietileno e polipropileno) para armazenar as soluções a fim de evitar

contaminação com chumbo e outros metais provenientes da composição do vidro. Estes materiais, além da célula voltamétrica, foram armazenados em soluções alcoólicas de ácido nítrico 10% em volume por dois dias antes do uso. Depois de retirados desta solução, foram lavados com água de Milli-Q em abundância, estando prontos para o uso.

3.4 Potenciometria

3.4.1 Titulações Potenciométricas

As titulações e calibrações para as medidas potenciométricas foram realizadas em uma célula de parede dupla termostalizada ($25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$), com capacidade de 80 mL, com força iônica constante de 0,1 M de KCl e atmosfera inerte obtida por um fluxo constante de gás nitrogênio (N_2) (Figura 07). O sistema era mantido fechado com uma tampa de teflon com quatro orifícios, um para a colocação do eletrodo combinado, um para o borbulhamento de nitrogênio, um para a adição do titulante e o último para a saída de nitrogênio. O sistema foi mantido sob agitação magnética desaerando por 15 minutos antes e durante toda a titulação. A adição do titulante (solução de KOH 0,0851 M) foi realizada com incrementos de 0,04 mL até que o pH dentro da célula de titulação alcançasse um valor próximo a 11. As titulações entre cada um dos dois íons metálicos e o ligante (glutathiona) foram efetuadas nas proporções 1:1 e 1:2. Além disto, foram feitas em triplicatas e a média destes valores foi utilizada no cálculo das constantes.

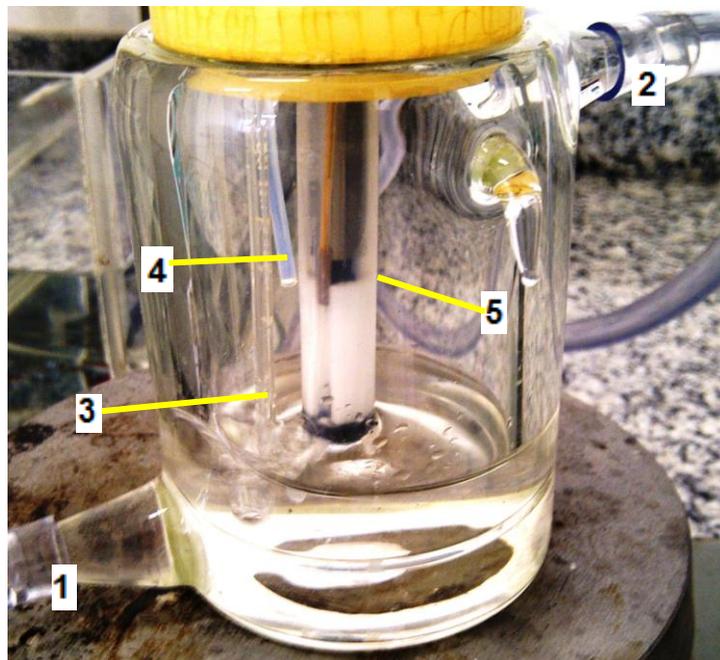


Figura 07 – Célula de titulação potenciométrica. (1) Entrada de água; (2) Saída de água; (3) Nitrogênio gasoso; (4) Adição do titulante; (5) Eletrodo combinado.

3.4.1.1 Padronização da solução de KOH

As titulações foram realizadas adicionando-se ao ligante sozinho e na presença do metal uma solução de KOH de concentração próxima a 0,1 M padronizada com biftalato de potássio.

A solução de hidróxido de potássio foi obtida a partir da diluição de uma solução 50 % em massa desta base, que foi preparada com um dia de antecedência, o que provocaria a precipitação de eventuais quantidades de carbonato que pudessem se formar. Tomando-se 7,5 mL desta solução e diluindo-a a 1 litro com água previamente fervida, obteve-se a solução de concentração 0,1 M. A partir disto esta foi padronizada com biftalato de potássio, que foi previamente

seco em estufa a 110 °C por uma hora, utilizando fenolftaleína como indicador (HARRIS, 2005).

3.4.1.2 Calibração do sistema potenciométrico

O sistema eletrodo e pHmetro foi calibrado antes de cada titulação utilizando duas soluções tampão Merck, uma com pH=4,00 e outra com pH=7,00. O método de Gran foi usado para avaliar o grau de contaminação da solução de KOH empregada como titulante.

A utilização do método de Gran para avaliar a contaminação por CO₂ consiste em uma titulação ácido base em que são registrados valores de pH antes e após o ponto final. Sendo V₀ o volume inicial de ácido na célula de titulação e V_b o volume de base adicionada, é possível plotar, no eixo das ordenadas, V₀ + V_b^{±pH} (utilizando -pH para região ácida e +pH para região básica) contra o volume da base, no eixo das abscissas. Obtém-se, desta forma, duas linhas que interceptam o eixo das abscissas, cujos valores não devem diferir em mais de 2%.

3.4.1.3 Tratamento dos dados potenciométricos

A partir dos dados obtidos pelas titulações para o ligante sozinho e na presença dos íons metálicos Zn²⁺ e Cd²⁺ separadamente, estes foram carregados no programa *Hyperquad*, a partir do qual foi possível refinar os valores das constantes de estabilidade. O *software HySS* (pertencente ao mesmo pacote de programas) foi empregado para construir as curvas de distribuição das espécies. O *software HySS* pode ser aberto a partir do programa *Hyperquad*, incorporando todos os dados obtidos no refino das constantes de estabilidade.

3. 5 Voltametria

3.5.1 Ajuste dos parâmetros instrumentais

Voltamogramas de pulso diferencial (DP) foram obtidos com um polarógrafo Metrohm 746 acoplado a um Stand 694, que possui um multieletrodo de mercúrio regular, utilizando um fio de platina como eletrodo auxiliar, sendo todos os potenciais aplicados contra um eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl 3 mol/L. Todas medidas voltamétricas foram efetuadas em uma célula polarográfica padrão (Figura 03) utilizando o eletrodo no modo SMDE (eletrodo de mercúrio de gota estática). O tempo de medida foi ajustado em 20 ms, o tempo de pulso 40 ms, a amplitude do pulso de 50 mV e velocidade de varredura de 6,67 mV/s. Mais alguns parâmetros utilizados nas medidas estão detalhados nos apêndices B e C. Os parâmetros aqui utilizados foram escolhidos em função de trabalhos anteriores em que foram realizadas medidas voltamétricas de GSH na presença de íons metálicos (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 2000).

3.5.2 Procedimentos na obtenção das medidas voltamétricas

Para obter um conjunto de voltamogramas para cada um dos dois pares metal-ligante (glutaciona- Zn^{2+} e glutaciona- Cd^{2+}) foram adicionados, inicialmente, 10 mL de solução tampão borato (pH=8,5) em KCl 0,1 M (eletrólito suporte) dentro da célula de medida com auxílio de uma pipeta volumétrica. Antes do registro do primeiro voltamograma a solução era desaerada sob agitação mecânica com um fluxo de nitrogênio gasoso durante 5 min. A primeira varredura era então realizada

apenas com o tampão e o eletrólito suporte, a fim de obter a linha base. Em seguida era adicionada uma solução padrão do metal de forma que sua concentração na célula fosse 50 μM , obtendo assim um voltamograma só na presença íon metálico. A partir de então era iniciada uma titulação voltamétrica em que eram adicionadas alíquotas do ligante, obtendo-se para cada adição um voltamograma. Cada uma destas adições era feita de modo a aumentar, dentro da célula, a concentração do ligante em um valor correspondente a 1/10 da concentração do íon metálico. Isto é, em cada adição do ligante, sua concentração molar aumenta 5 μM enquanto a de Zn^{2+} ou Cd^{2+} permanecia constante. Para o sistema glutatona- Zn^{2+} as varreduras foram realizadas entre -900 e -1200 mV, enquanto para o sistema glutatona cádmio entre -500 e -800 mV.

As medidas voltamétricas foram realizadas na temperatura do laboratório ($25 \pm 0,5^\circ\text{C}$), que foi mantida dentro desta faixa pelo uso de um aparelho de ar condicionado.

3.5.3 Tratamento dos dados voltamétricos

Depois de obtidos os dois conjuntos de voltamogramas, os valores das respectivas correntes de fundo foram subtraídas dos demais valores de corrente registrados nos mesmos potenciais. Depois disto os dados foram submetidos a técnica de resolução multivariada de curvas a fim de recuperar os voltamogramas e perfis de concentração das espécies puras, além de calcular as constantes de estabilidade, utilizando-se para isto o *software* R.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Escolha do sistema metal–ligante

A escolha do sistema para estudo baseou-se, primeiramente, em uma premissa básica para a implementação da metodologia proposta: aminoácido e metais devem ter uma afinidade tal que consigam formar complexos estáveis capazes de dar uma resposta analítica na potenciometria e na voltametria. Para que seja possível fazer uma comparação entre métodos potenciométricos e métodos de resolução de curvas multivariadas, é fundamental que possam ser medidos em uma ampla faixa de proporções entre metal e ligante.

Dentro destes parâmetros, o tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, também conhecido como glutathiona reduzida (Figura 08), mostrou-se uma boa opção na obtenção de dados potenciométricos e voltamétricos. A escolha deste composto baseou-se em dados de trabalhos que reportaram ser este uma espécie eletroativa que fornece uma boa resposta analítica na voltametria (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 1997; ESTEBAN, 2000; DÍAZ-CRUZ, 2000; MLADENOV, 2004; ESTEBAN, 2006; FILHO, 2006; RICCI, 2006; FEROCI, 2007). Além disto, a glutathiona tem demonstrado uma considerável capacidade de formar complexos com diferentes cátions metálicos, principalmente com os de metais de transição (FILHO, 2006; FERRETTI, 2007, LEVERRIER, 2007).

É importante destacar que nas medidas voltamétricas deve existir uma linearidade entre a corrente e a concentração do analito, condição que é comum a boa parte dos íons metálicos, mas não a todas as substâncias de natureza peptídica. Pelo fato de algumas constantes de estabilidade de complexos envolvendo a GSH e íons metálicos já terem sido determinadas, tanto por MCR a partir de medidas voltamétricas (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 1998), como por titulações potenciométricas (ORAM, 1996; ARMAS, 2001; EL-KOSASY, 2005), a glutathiona foi o ligante escolhido para o desenvolvimento deste trabalho, uma vez que os dados constantes em trabalhos anteriores puderam servir como referência

para o estudo dos dois métodos empregados na investigação de equilíbrios químicos.

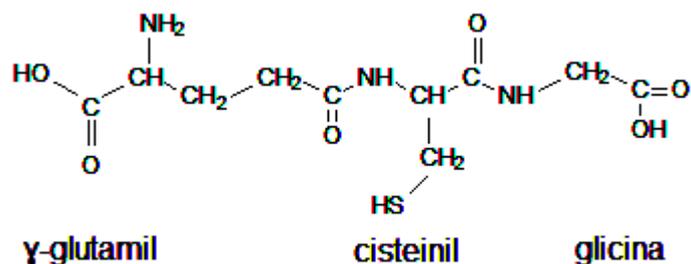


Figura 08 – Fórmula estrutural da glutationa

A GSH desempenha funções fisiológicas importantes, atuando em mecanismos de transporte de membrana (BALLATORI, 2009), na proteção contra danos oxidativos (SIES, 1999; HULTBERG, 2004), na desintoxicação de metais pesados (BELCASTRO, 2009), e como veículo no transporte de metais e íons complexos (FERRETTI, 2007). Por possuir em sua estrutura um grupo tiol, a glutationa possui uma considerável afinidade por íons metálicos e, sendo ela uma molécula de relevada importância nos organismos vivos, torna-se importante o estudo destas interações (BERTHON, 19995; FILHO, 2006; LEVERRIER, 2007).

A investigação de um complexo entre um ligante e um metal consiste na determinação das suas constantes de estabilidade (ou de formação) a partir das quais é possível propor um modelo para os vários equilíbrios que podem ocorrer, as estequiometrias destes complexos (ML, ML₂, M₂L₂, MHL, etc., por exemplo) e a curva de distribuição das espécies ou perfis de concentração, o que deve ser realizado sob condições experimentais bem conhecidas como pH, temperatura, força iônica, tipo de eletrodo, etc. As constantes de formação servem como um parâmetro eficaz na expressão da afinidade de um ligante por um íon metálico em solução, dando uma indicação quantitativa do sucesso ou falha na proposição de um modelo (MARTELL, 1992).

Após a escolha de um ligante adequado, partiu-se para a escolha dos íons metálicos que poderiam formar complexos estáveis com a GSH, sobretudo com a possibilidade de apresentarem variações nas medidas conforme variam as proporções das concentrações entre ambos. Estas variações nas medidas correspondem, na voltametria, a mudanças no potencial de redução no eletrodo de mercúrio e na potenciometria a mudanças nos perfis de pH obtidos através das curvas de titulação.

Via de regra os elementos metálicos na forma de seus respectivos sais ou óxidos (compostos inorgânicos) não são a melhor fonte de biodisponibilidade destes elementos. Uma forma biodisponível de íons metálicos são seus complexos, formados da interação entre o íon metálico e seu respectivo ligante que constitui uma molécula orgânica.

Zinco (Zn^{2+}) e cádmio (Cd^{2+}), cátions cujos sinais voltamétricos são de simples obtenção, apresentam uma boa relação linear entre a corrente e a concentração (apêndices D e E), se mostrando satisfatórios para a obtenção das medidas voltamétricas. Além disto, existem na literatura trabalhos que reportam estudos de complexos formados entre estes metais e glutathiona, tanto por dados obtidos na voltametria (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 2000; ESTEBAN 2006), como por potenciometria (CORRIE, 1976; FERRETTI, 2007).

O zinco é considerado um elemento essencial, atuando em sistemas enzimáticos importantes de animais e plantas. Uma pessoa adulta contém cerca de 2 g desse metal. Entre as enzimas que dele dependem estão a anidrase carbônica, presente nas células vermelhas, que participa do processo de respiração; a carboxipeptidase, que atua no processo de digestão; a fosfatase alcalina, que atua em processos de liberação de energia; desidrogenases e aldolases, que tomam parte do metabolismo de glicídeos e a álcool desidrogenase que atua no metabolismo do álcool (LEE, 2003). Há dados que comprovam que o Zn^{2+} pode atuar como cofator de, no mínimo, 34 enzimas que catalisam reações de grande importância metabólica (DÍAZ-CRUZ, 1998). O estudo da interação entre zinco e glutathiona é importante, uma vez que este peptídeo tem demonstrado estar envolvido no transporte e estoques de Zn^{2+} intracelular e, juntamente com a histidina, atuar na sua homeostase (KREZEL, 2003). Além disto, Gelinsk e

colaboradores (2003) reportaram que complexos entre glutathiona e Zn^{2+} podem servir como blocos de construção na síntese de pequenos peptídeos.

O cádmio, diferentemente do zinco, destaca-se biologicamente pela sua toxicidade. Ele acumula-se nos rins, alterando seu funcionamento, além de poder substituir o zinco em certas proteínas (DÍAZ-CRUZ, 1997; ANTUNES; 2002), tornando-as inativas (LEE, 2003). É um elemento de destacada importância industrial, sendo empregado na proteção do aço contra corrosão, em pilhas e baterias comerciais e como pigmento em tintas (LEE, 2003).

Dentre os muitos ligantes que ocorrem dentro das células, os íons cádmio podem ligar-se a glutathiona, a qual está presente em concentrações da ordem de mmol/L no citosol. Isto poderia diminuir a quantidade de Cd^{2+} livre e, conseqüentemente, sua toxicidade (HUGHES, 1991; TWISS, 2001), o que caracteriza a importância do estudo da interação GSH- Cd^{2+} na elucidação destes mecanismos.

Ambos os metais, zinco e cádmio, pertencem ao mesmo grupo da tabela periódica e apresentam facilidade de formar complexos com ligantes que tenham oxigênio, nitrogênio e enxofre em suas estruturas (FERRETTI, 2007; LEVERRIER, 2007). Sabendo-se que ligantes desta natureza estão classificados como bases moles e intermediárias e os íons Cd^{2+} e Zn^{2+} classificados como ácidos moles e intermediários, é possível enquadrar dentro da teoria de ácidos e bases duros e moles a afinidade entre estas espécies.

4.2 Titulações potenciométricas

A partir das titulações realizadas neste trabalho, os perfis de pH puderam ser obtidos através da adição de volumes conhecidos de uma solução de KOH previamente padronizada, tornando possível uma avaliação da intensidade da interação metal ligante e determinar suas constantes de estabilidade.

A ocupação de sítios de coordenação no ligante pelo cátion metálico envolve a saída de íons hidrogênio do ligante (desprotonação). Assim, de acordo com a afinidade que ligante e metal tem para formar cada espécie, o ligante vai sendo

desprotonado com maior ou menor intensidade, o que pode ser monitorado através da medida do pH. Este fenômeno pode ser representado pela equação:



onde x representa o número de íons hidrogênios desalojados em função da coordenação com o metal.

4.2.1 Produto iônico da água

O produto iônico da água é um parâmetro importante a ser considerado, pois trata-se de uma constante que depende do sistema utilizado e, como tal, deve ser determinado para as condições experimentais em que serão realizadas as várias determinações potenciométricas (BERTAGNOLLI, 2008).

A importância do produto iônico da água reside no fato de que seu valor pode ser considerado como constante não só em água pura como também em soluções aquosas diluídas, tais como as encontradas comumente em análise qualitativa inorgânica. Isso significa, por exemplo, que se um ácido for dissolvido em água (o qual, em dissociação, produz íons hidrogênio), a concentração dos íons hidrogênio pode aumentar à custa, unicamente, da concentração dos íons hidroxila.

A determinação do produto iônico da água baseou-se na titulação de um ácido fraco com uma base forte no meio iônico considerado. Sendo conhecidas as constantes de protonação do ácido, o produto iônico da água pode ser determinado usando um programa computacional adequado para a titulação potenciométrica. O programa *Hyperquad* mostrou-se eficaz para o cálculo do produto iônico da água neste trabalho. O valor de K_w assim determinado serve também como um teste de qualidade do sistema de medidas. Com o uso dos dados da titulação

potenciométrica de soluções de ácido acético com a solução de KOH, o pK_w foi refinado encontrando-se o valor -13,87.

4.2.2 Determinação das constantes de protonação do ligante

Antes de realizar as titulações do ligante na presença dos íons metálicos, é importante determinar as constantes de protonação do ligante, pois, como já mencionado, este fato está diretamente ligado a disponibilidade de sítios para coordenação do metal. A curva de titulação obtida entre a glutatona e solução padrão de hidróxido de potássio é mostrada na figura 09.

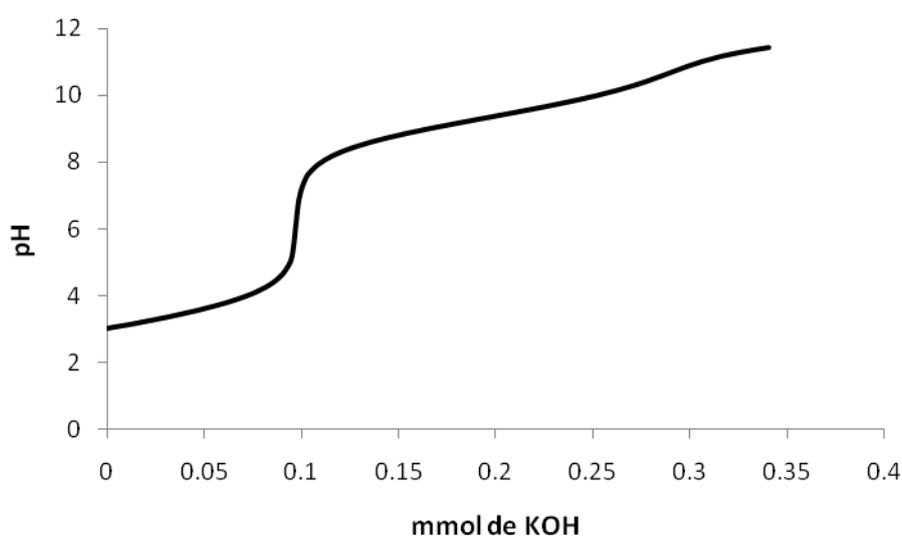


Figura 09 – Curva de titulação de 10 mmol de glutatona com KOH 0,0851 M, T= 25°C e força iônica 0,1 M de KCl

A glutatona comporta-se, em geral, com um ligante do tipo H_3L , ou seja, possui três sítios de ligação, cada um com diferentes constantes de protonação. Dois destes sítios correspondem aos grupos carboxila e um, bem menos ácido, correspondente ao grupo tiol (-SH) (GELINSKY, 2003; LEVERRIER, 2007). FERRETTI et al. (2007), a partir de medidas obtidas por espectroscopia de

ressonância magnética nuclear, propuseram um modelo do tipo H_4L^+ para este ligante, considerando a protonação do seu grupo amino do terminal γ -glutamil.

O conhecimento da estrutura química do ligante é fundamental, pois disto depende o sucesso do modelo proposto, tanto para os cálculos das constantes de protonação, quanto para as constantes de estabilidade. Um modelo onde a glutamina fosse considerado como um ligante com apenas um hidrogênio ionizável (LH), provavelmente levaria a resultados distantes dos verdadeiros. Os resultados obtidos para os valores das constantes de protonação estão dispostos na tabela 02.

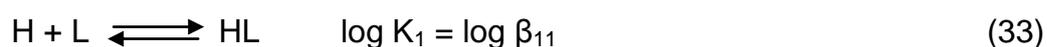
Tabela 02 – Constantes de protonação da glutamina.

Espécie	log β	log β^*
HL	9,77	9,47
H ₂ L	18,51	18,18
H ₃ L	21,85	21,74

β – valor calculado neste trabalho, T= 25°C e força iônica 0,1 M de KCl.

β^* – valor de referência (FERRETTI, 2007)

Os valores mostrados na tabela 02 referem-se aos logaritmos decimais das constantes de estabilidade cumulativas, isto é, log β_{11} corresponde a primeira constante de protonação (log K_1). Assim, o valor log β_{21} corresponde a soma dos logaritmos da primeira e segunda constantes de protonação (log $K_1 + \log K_2$) e log β_{31} corresponde a soma das três constantes parciais (log $K_1 + \log K_2 + \log K_3$), conforme demonstram as equações a seguir:



A partir destas relações entre as constantes, pode-se obter os valores de cada uma das constantes parciais de protonação, sendo $\log K_1=9,77$; $\log K_2= 8,75$ e $\log K_3= 3,34$. Uma descrição mais detalhada da relação matemática que envolve as constantes e de como podem ser designadas está descrita no apêndice A. Após o refino das constantes, é possível, a partir do modelo proposto para o sistema em equilíbrio, construir o diagrama de distribuição das espécies.

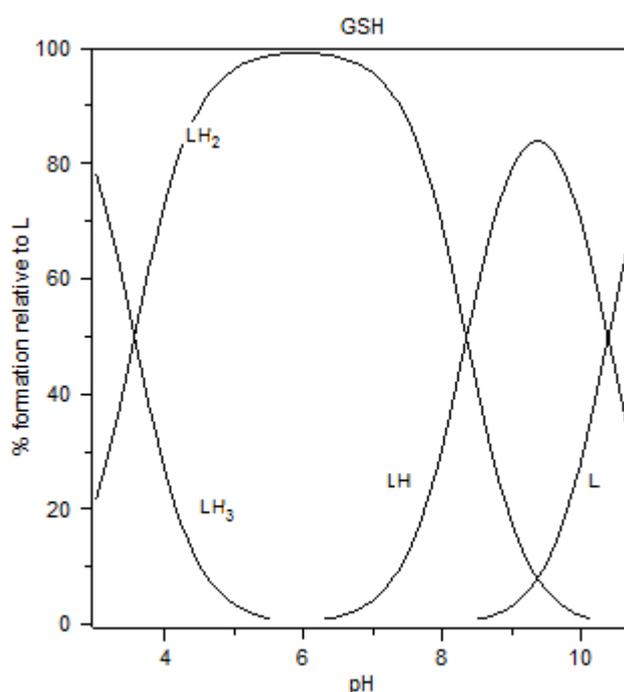


Figura 10 – Diagrama de distribuição das espécies da glutatona na ausência dos cátions metálicos obtidos com uso do *software HySS*. As frações de cada espécie correspondem à porcentagem da fração total de ligante (L).

O diagrama de distribuição das espécies mostra a quantidade relativa de cada espécie em função da variação do pH. Na figura 10 é possível observar no início da titulação, além da presença da espécie H_3L , uma fração considerável da espécie H_2L , formada pela primeira ionização da glutatona. À medida que o pH aumenta, pelas as adições de KOH, a fração de H_2L na célula aumenta em função da contínua retirada do próton da espécie H_3L . Seguindo com a adição da base,

próximo ao valor de $\text{pH}=7$, começam a se formar as primeiras quantidades da espécie HL simultaneamente à diminuição da fração de H_2L , e próximo a $\text{pH}=9$ começam a se formar as primeiras frações do ligante totalmente desprotonado (L).

4.2.3 Titulação potenciométrica do sistema GSH-Zn

As titulações envolvendo o sistema GSH-Zn foram realizadas nas proporções metal-ligante de 1:1 e 1:2, utilizando uma solução padronizada de hidróxido de potássio como titulante. As curvas obtidas estão apresentadas na figura 11.

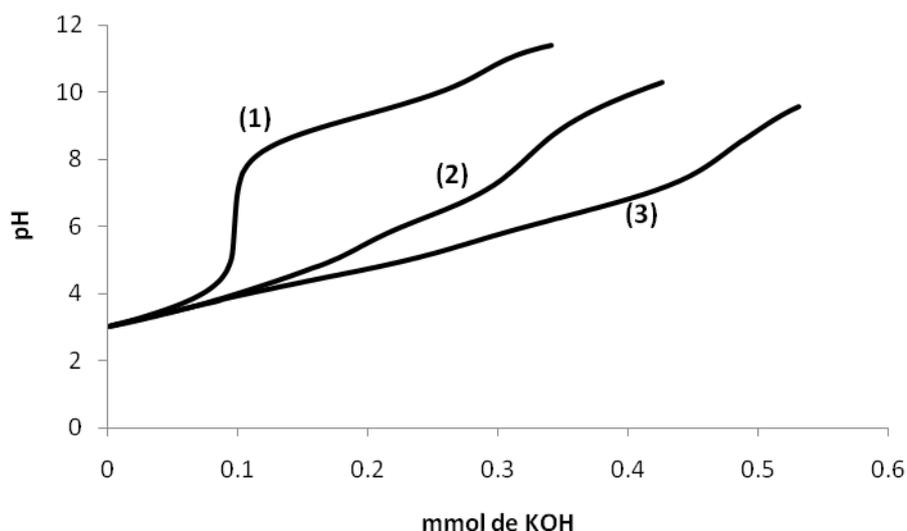


Figura 11– Curvas de titulação da GSH na presença do íon Zn^{2+} . Curva (1): 10 mmol de GSH; curva (2): 10 mmol de GSH + 5 mmol de Zn^{2+} ; curva (3): 10 mmol de GSH + 10 mmol de Zn^{2+} . $T=25^\circ\text{C}$ e força iônica 0,1 M de KCl.

A partir da análise da figura 11, é possível observar duas curvas distintas para o mesmo sistema metal-ligante. O que as diferencia é a proporção em que são titulados dentro da célula potenciométrica, sendo a curva (2) relativa à proporção metal-ligante 1:2 e a curva (3) à proporção 1:1. Em (3) o sistema foi titulado proporcionalmente com o dobro da quantidade de metal, se comparado a (2), isto

significa que, havendo maiores frações de Zn^{2+} para mesma quantidade do ligante, mais prótons são desalojados e, conseqüentemente, serão necessárias maiores quantidades do titulante para neutralizá-los. Os valores encontrados para as constantes de estabilidade das espécies formadas entre zinco e glutathiona estão mostrados na tabela 03.

Tabela 03 – Constantes de estabilidade do sistema GSH-Zn titulado nas proporções 1:1 e 1:2.

Espécie	log β	log β^*
MHL	16,46**	14,21
ML	12,06**	7,94
MH ₂ L ₂	32,84***	29,03
MHL ₂	26,50***	21,72
ML ₂	19,87***	12,39

β – valor calculado neste trabalho, T= 25°C e força iônica 0,1 M de KCl.

β^* – valor de referência (FERRETTI, 2007)

** – valor calculado com titulação GSH-Zn 1:1

*** – valor calculado com titulação GSH-Zn 2:1

O diagrama de distribuição das espécies da figura 12 mostra que a complexação do íon Zn^{2+} começa a ocorrer a partir de valores de pH próximos a 4 em ambas as titulações. A partir deste valor de pH o ligante encontra-se predominantemente sob a forma LH₂ (Figura 12), o que sugere que uma interação entre o metal e a GSH desalojaria um segundo próton, provavelmente do outro grupo carbonila, para se coordenar ao ligante formando as espécies MHL com log β =16,46 e MH₂L₂ com log β =32,84.

Juntamente com a formação da espécie MHL, forma-se a espécie ML (Figura 12) com log β = 12,06, ocorrendo, provavelmente, uma coordenação adicional do íon zinco pelo terminal SH desprotonado (íon tiolato) da fração cisteinil da glutathiona ou pelo terminal amino da fração glutamil (DÍAZ-CRUZ, 2000; FERRETTI, 2007). As espécies MHL₂ e ML₂ começam a se formar a partir de

valores de pH superiores a 5, com valores de $\log \beta$ iguais a 26,50 e 19,87, respectivamente, havendo também uma coordenação do íon zinco pelos terminais SH desprotonados ou pelos grupos amino.

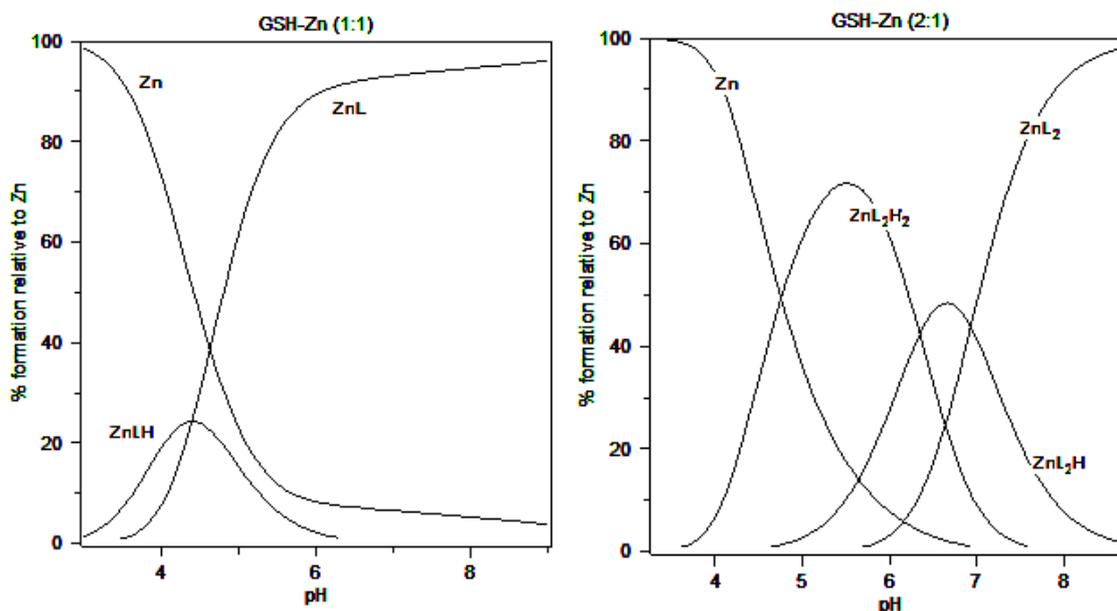
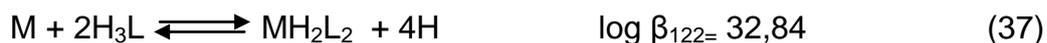


Figura 12 – Diagramas de distribuição das espécies formadas entre glutationa e zinco titulados na proporção 1:1 e 1:2 obtidos com o uso do *software* HySS. As frações de cada espécie correspondem à porcentagem da fração total de metal.

4.2.4 Titulação potenciométrica do sistema GSH-Cd

Tal como no sistema GSH-Zn, as titulações foram realizadas nas proporções GSH-Cd 1:1 e 1:2, utilizando uma solução padrão de KOH como titulante. As curvas obtidas estão apresentadas na figura 13.

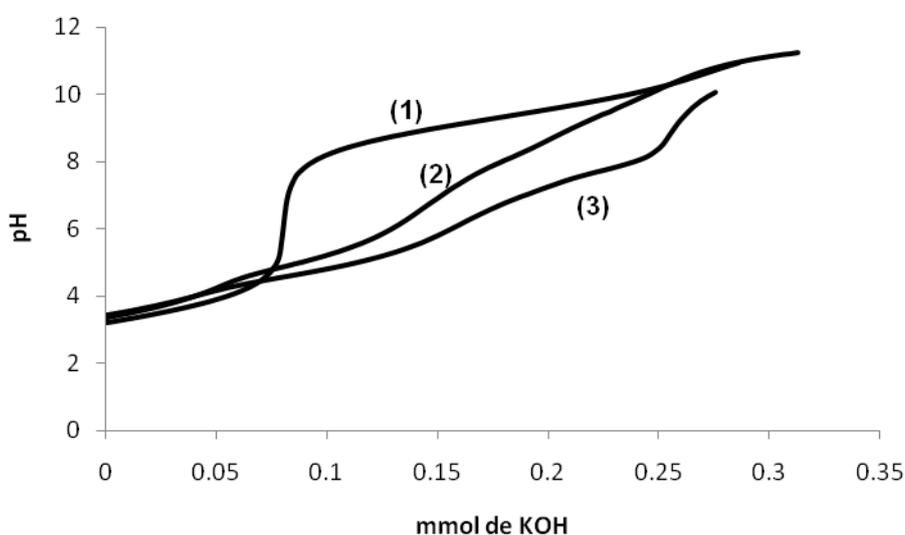


Figura 13 – Curvas de titulação da GSH na presença do íon Cd^{2+} . Curva (1): 10 mmol de GSH; curva (2): 10 mmol de GSH + 5 mmol de Cd^{2+} ; curva (3): 10 mmol de GSH + 10 mmol de Cd^{2+} . $T=25^{\circ}\text{C}$ e força iônica 0,1 M de KCl.

Durante a titulação na proporção 1:1 houve turvação da solução dentro da célula a partir de pH próximo a 7,0, cuja provável causa pode ser explicada pela formação de $\text{Cd}(\text{OH})_2$. A introdução desta espécie no modelo de equilíbrio no programa *Hyperquad* foi satisfatória, contribuindo para o melhor ajuste possível entre as curvas experimental e teórica. Os valores encontrados para os modelos propostos nas titulações realizadas nas duas proporções são mostrados na tabela 04.

Tabela 04 – Constantes de estabilidade do sistema GSH-Cd titulado nas proporções 1:1 e 1:2.

Espécie	log β	log β^*
MHL	15,96**	15,7
MHL	15,61***	15,7
ML	7,91**	8,5
MH ₂	-14,31**	-20,34
MH ₂ L ₂	30,56***	30,0
MHL ₂	22,11***	22,1

β – valor calculado neste trabalho, T= 25°C e força iônica 0,1 M de KCl.

β^* – valor de referência (LEVERRIER, 2007)

** – valor calculado com titulação GSH-Cd 1:1

*** – valor calculado com titulação GSH-Cd 2:1

A partir dos dados obtidos da titulação realizada na proporção GSH-Cd 1:1 foi possível ajustar o modelo prevendo a formação dos complexos MHL, com $\log \beta=15,96$ e ML, com $\log \beta=7,91$. O hidróxido de cádmio, representado por MH₂ também foi incluído no modelo e teve sua constante de formação refinada junto às dos demais complexos, obtendo-se o valor de $\log \beta= -14,31$. As curvas de distribuição das espécies mostram que antes de pH=4 há a formação do complexo MHL (Figura 14), faixa na qual a glutatona encontra-se predominantemente sob a forma LH₂ (Figura 10), o que é um bom indicativo da capacidade do cádmio de desalojar 2 hidrogênios da glutatona para formar o complexo (LEVERRIER, 2007). A partir do pH próximo a 6,5 forma-se a espécie ML, coincidindo com a faixa de pH em que a glutatona encontra-se predominantemente sob a forma HL juntamente com pequenas frações de L. As espécies previstas no modelo ajustado com os dados da titulação GSH-Cd 1:1 estão diretamente relacionadas com a proporção entre o ligante e metal dentro da célula, pois a estequiometria dos três complexos neste modelo também são, igualmente, de uma molécula do ligante para um íon metálico (MENDIETA, 1996).

As equações que designam os $\log \beta$ das espécies MHL, ML e MH₂ são mostradas a seguir.

Pela habilidade do cádmio em formar complexos a valores de pH baixos, é possível que, na titulação 1:1, a quantidade de ligante livre na solução a partir de pH próximo a 6,4 seja pequena em relação ao metal. Havendo pouco ligante disponível para complexar o Cd^{2+} e com o contínuo aumento do pH, a hidroxila encontraria, desta forma, frações do metal livres capazes de formar o $\text{Cd}(\text{OH})_2$. Já na titulação na proporção GSH-Cd 2:1 não há turvação da solução, pois a proporção de ligante presente é o dobro, o que garante uma fração do ligante livre para complexar o metal mesmo a valores de pH mais altos.

Conhecendo o produto de solubilidade (K_{ps}) do hidróxido de cádmio, cujo valor é $4,5 \times 10^{-15}$ ($\text{p}K_{ps}=14,35$), é possível informar este dado ao *software HySS* e obter, junto aos perfis dos complexos, o perfil das frações do produto insolúvel formado durante a titulação potenciométrica (Figura 14, GSH-Cd 1:1)

A inclusão da espécie MHL também foi importante para a obtenção do melhor ajuste entre as curvas quando a curva experimental foi obtida a partir da titulação entre glutatona e cádmio na proporção 2:1. Tal como na titulação 1:1, esta espécie começa a se formar em valores de pH abaixo de 4 e só a partir do pH próximo a 5 começam a se formar as espécies MH_2L_2 e MHL_2 .



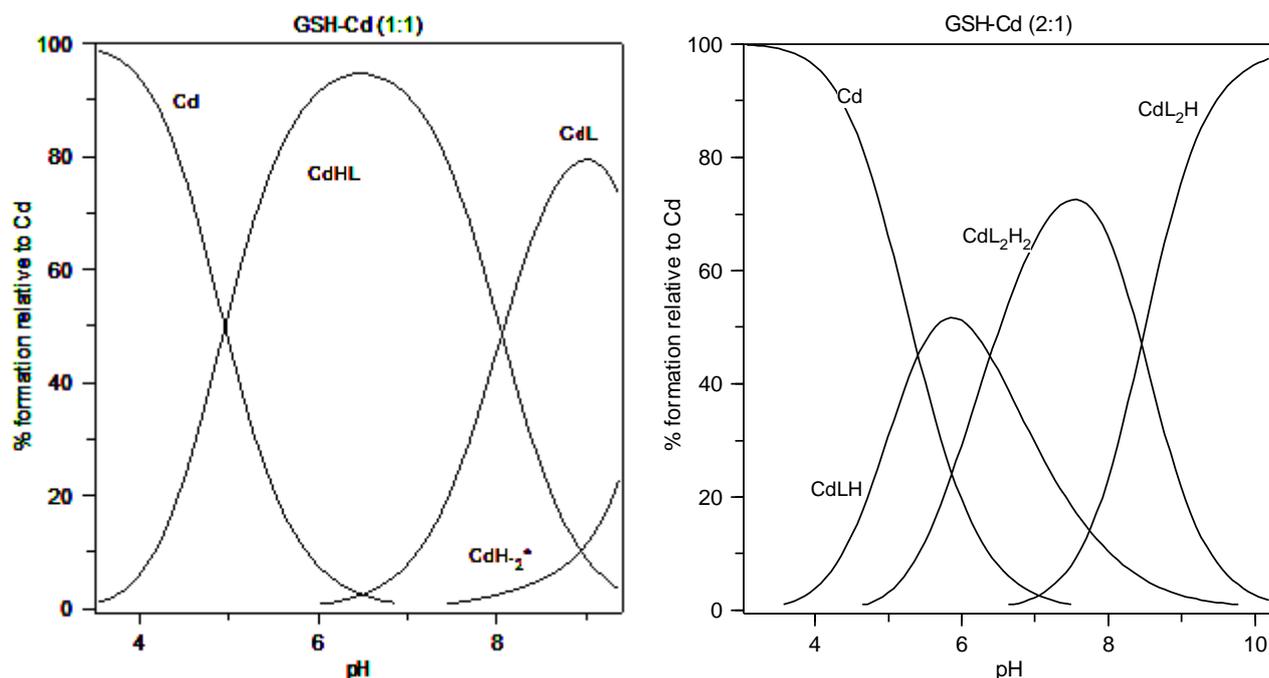


Figura 14 – Diagramas de distribuição das espécies formadas entre glutathione e cádmio titulados na proporção 1:1 e 1:2 obtidos com o uso do *software HySS*. As frações de cada espécie correspondem à porcentagem da fração total de metal.

4.2.5 Sigma (σ)

O sigma é uma medida da qualidade do ajuste do modelo, e pode ser definido pela equação

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i W_i r_i^2}{m - n}} \quad (46)$$

em que m é número de pontos de dados e n é número de parâmetros. Quando os ponderadores (W) são corretamente designados, σ tem um valor próximo a 1. Como o sigma é uma estatística simples, ele muito pouco pode dizer a respeito dos vários

equilíbrios que podem coexistir em solução e sua grande utilidade se deu em tempos em que a computação não permitia o ajuste gráfico da curva em detalhes.

Uma das grandes funcionalidades agregadas ao programa *Hyperquad* é possibilidade do ajuste gráfico entre a curva teórica e experimental. Desta forma, é possível adicionar ou retirar espécies do modelo, alterar os valores de $\log \beta$, descartar pontos da curva de titulação ao mesmo tempo em que é possível buscar visualmente o melhor ajuste entre as duas curvas.

Tabela 05 – Valores de sigma (σ) obtidos durante o refino das constantes de estabilidade.

Sistema	Proporção ligante-metal	Valor de sigma (σ)
Glutationa	---	0,1730
Glutationa – zinco	1:1	0,2179
Glutationa – zinco	2:1	0,3734
Glutationa – cádmio	1:1	8,6273
Glutationa – cádmio	2:1	0,4562

4.2.6 Resíduos

Um bom parâmetro para estimar a qualidade do ajuste dos modelos de equilíbrio propostos é o *plot* dos resíduos, que mostra de uma forma bastante clara as diferenças entre o pH observado (curva experimental) e o pH calculado (curva teórica) para cada ponto (ESCODA, 1999).

O ajuste dos mínimos quadrados tem por objetivo encontrar o menor valor da soma ponderada dos quadrados dos resíduos. Existe uma relação entre resíduos e erro experimental, mas ambos se referem a aspectos de natureza distinta. No programa *Hyperquad*, o diagrama dos resíduos é mostrado na mesma janela em que é realizado o ajuste das curvas. Estas estão apresentadas como figuras nos apêndices G, H, I, J e K.

4.2.7 Parâmetros de risco (*dangerous parameters*)

Além do refino das constantes, buscando o menor resíduo entre as curvas experimental e teórica, o programa *Hyperquad* oferece a possibilidade de refinar outros parâmetros, aos quais ele se refere como *dangerous parameters* ou parâmetros de risco. Estes parâmetros são valores que devem ser conhecidos antes da realização do experimento, como a concentração do titulante, as concentrações totais do ligante, do metal e de H^+ . Tais valores devem ser configurados como constantes durante toda a operação de cálculo e só devem ser refinados em situações muito específicas e desde que o valor refinado não se desvie muito do valor original, caso contrário a confiabilidade dos resultados pode ser afetada.

O refino destes parâmetros constitui-se também em um bom indicativo da qualidade do ajuste do modelo de equilíbrio das espécies em solução. Depois de realizados todos os refinamentos e calculadas as constantes, estes parâmetros podem ser refinados e, não apresentando grandes desvios do valor original, podem dar um indicativo da ausência de erros sistemáticos (CANEPARI, 1997).

Neste trabalho, estes parâmetros foram refinados após o cálculo das constantes e a diferença entre os valores originais e os valores refinados situaram-se em uma faixa muito próxima a 2%, podendo-se, desta forma, considerar os desvios dentro da faixa de erro experimental (CANEPARI, 1997).

4.3 Comportamento voltamétrico das espécies

Medidas voltamétricas obtidas por pulso diferencial têm sido utilizadas para o estudo de complexos sob variadas condições, dada a possibilidade de obter informação quantitativa fácil e confiável (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 1997; ESTEBAN, 2000; BRONW, 2009). Para que isto seja possível, é necessário haver uma mudança no potencial de meia onda de uma das espécies investigadas, isto é, o potencial do íon metálico deve ser alterado pela adição de pequenas quantidades do ligante e/ou o potencial do ligante alterado pela adição de pequenas quantidades

do íon metálico. Este deslocamento de potencial ocorre com maior intensidade quando são comparados voltamogramas do metal sozinho e do metal na presença de um ligante.

Os dados obtidos consistem, basicamente, em uma série de curvas de potenciais *versus* corrente que se sobrepõem e, quando analisados de forma bruta, mostram pouca informação a respeito do equilíbrio que se estabelece entre as espécies. A obtenção de informação útil pode ser alcançada submetendo-se os dados a um tratamento matemático adequado. No caso deste trabalho, a abordagem matemática utilizada foi resolução multivariada de curvas.

A linearidade do sinal com relação a concentração das espécies é também uma característica que se deve esperar do sistema em estudo. Isto significa que o sinal da amostra deve ser a soma das contribuições de correntes individuais de cada espécie. Tal característica é comum a dados obtidos por métodos espectroscópicos (desde que estejam dentro da região de aderência a Lei de Beer) por exemplo, mas não necessariamente às medidas voltamétrica, devido ao fenômeno interfacial que as envolve. A combinação do fenômeno de transporte de espécies de diferentes mobilidades com um processo de eletrodo de natureza diferente (reversíveis ou quase reversíveis, por exemplo) não asseguram, em princípio, esta condição (BROWN, 2009).

Quando o metal é coordenado por um ligante, estabelecendo o equilíbrio entre duas espécies do tipo $mM + nL \rightleftharpoons M_mL_n$, o complexo formado pode ser eletroquimicamente inerte ou lábil (DÍAZ-CRUZ, 2000; ESTEBAN, 2003).

Os complexos inertes não sofrem uma dissociação significativa durante o intervalo de tempo em que é medido o valor da corrente. Em decorrência disto, desde que o metal e seus complexos possam difundir independentemente em direção ao eletrodo, é possível assumir uma contribuição individual e linear das espécies para cada medida. No entanto se a cinética que envolve a formação de um complexo é muito rápida ele será lábil e qualquer variação na concentração nas proximidades do eletrodo será imediatamente suprida (ROSE, 1964; KAPOOR, 1991; MENDIETA, 1999; ESTEBAN, 2006; GEMPERLINE, 2006; BRONW, 2009).

Os resultados das medidas realizadas neste trabalho mostram que os compostos tem um comportamento mais próximo ao dos complexos inertes, pois os picos de redução dos metais foram significativamente deslocados em direção a

potenciais mais negativos a medida em que novas alíquotas do ligante eram adicionadas.

4.3.1 Escolha das concentrações relativas nas medidas voltamétricas

As concentrações dos analitos usadas nas medidas voltamétricas foram escolhidas segundo dois critérios.

O primeiro deles relaciona-se com a saturação do eletrodo. O princípio básico da voltametria consiste em monitorar a corrente com uma mudança linear do potencial aplicado (varredura). Quando alcançado o potencial de redução ou oxidação de uma espécie, a corrente flui através do eletrodo de trabalho, que no voltamograma pode ser visualizada como o surgimento de um pico (ou de uma onda senoidal), o qual deve ter sua altura proporcional à concentração do analito. No entanto, a altura do pico (valor da corrente) não cresce indefinidamente com o aumento da concentração, há um valor limite no qual ocorre uma saturação do eletrodo, não existindo mais a linearidade entre corrente e sinal. A partir de dados obtidos na literatura, considerou-se como adequada uma faixa situada entre 1 e 100 μM dentro da célula voltamétrica tanto para o ligante quanto para o íon metálico (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 1997; DÍAZ CRUZ, 2000; MLADENOV, 2004; FEROCI, 2007). Desta forma estaríamos trabalhando acima do limite de detecção do método e mantendo-se distante de uma eventual saturação na superfície da gota de mercúrio.

O segundo critério levou em conta a possibilidade da obtenção de vários voltamogramas para o mesmo sistema, obtidos por uma ampla faixa de proporções entre o metal e o ligante.

4.4 Resolução multivariada de curvas no estudo dos complexos

A resolução multivariada de curvas compreende um conjunto de técnicas matemáticas que visam descrever as contribuições individuais dos componentes em um conjunto de dados cujos sinais ou medidas estão sobrepostos. Estas técnicas matemáticas podem variar de acordo com as características do sistema em estudo. Sistemas em que as espécies químicas são independentes não recebem exatamente o mesmo tratamento matemático daqueles em que se estabelece um equilíbrio químico.

Este trabalho desenvolveu-se seguindo quatro operações descritas em MCR-ALS:

- a. obtenção da matriz de dados experimentais;
- b. estimativa inicial do número de componentes;
- c. formulação de uma estimativa inicial da matriz de concentrações;
- d. otimização pelos mínimos quadrados alternantes (TAULER, 1993a; MENDIEATA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 1997; ESTEBAN, 2000; OZEKI, 2004; LEITÃO, 2007; GUTERRES, 2006).

4.4.1. Obtenção da matriz de dados experimentais

Para execução do MCR-ALS foram realizadas 30 titulações voltamétricas adicionando alíquotas de GSH sobre uma solução contendo o cátion metálico a fim obter diferentes proporções entre metal e ligante, originando um conjunto de dados multivariado. Os dados foram dispostos em uma matriz de dados em que as correntes (I) foram colocadas em colunas cuja quantidade deveria corresponder ao número de proporções metal/ligante analisadas. A figura 15 exemplifica como deve ficar esta matriz.

Ainda nesta etapa é interessante subtrair o valor da corrente obtida apenas com o eletrólito suporte dos demais valores de corrente nos mesmos potenciais em que a varredura foi feita na presença das espécies em estudo. Esta subtração da corrente de fundo assume que a capacitância da dupla camada não deve mudar de forma significativa na presença dos compostos de interesse (ESTEBAN, 2003).

	U (mV)	-300	-302	-304	-306	-308	-310	-312	...
<i>[M]/[L] (0)</i>	I (nA)	4,49	4,65	4,78	4,96	5,17	5,43	5,73	...
<i>[M]/[L] (0,0625)</i>	I (nA)	5,96	6,34	6,68	7,04	7,44	7,88	8,35	...
<i>[M]/[L] (0,125)</i>	I (nA)	8,01	8,48	8,92	9,39	9,88	1,04	1,09	...

Figura 15 – Exemplo de arranjo de dados voltamétricos para MCR-ALS. Cada linha corresponde a valores de corrente obtidos para diferentes proporções metal-ligante.

4.4.2. Estimativa inicial do número de componentes

Por meio da decomposição em valores singulares (SVD), pode-se estimar o número de componentes através do posto da matriz, que corresponde ao número de colunas linearmente independentes. A partir do gráfico dos valores singulares mais significativos associados às variações na matriz de dados inicial, pode ser feita uma avaliação visual simples e os maiores valores singulares correspondem à estimativa do número de componentes, pois se considera que eles estão associados às maiores fontes de variação nos dados.

Tratando-se de medidas voltamétricas, os dados são interpretados como diferentes centros eletroativos oxidados ou reduzidos durante a aplicação dos potenciais (varredura) (ESTEBAN, 2000). Não havendo contribuições importantes derivadas da linha de base ou presença de interferentes, cada valor singular pode estar relacionado a uma espécie química diferente (TAULER, 1993a; DÍAZ-CRUZ, 2000; CHEN, 2008; GUTERRES, 2006).

4.4.3. Otimização pelos mínimos quadrados alternantes

Durante a análise com MCR, freqüentemente, os elementos das matrizes **C** e **S** não são conhecidos e precisam ser calculados usando apenas a informação disponível na matriz **X**, correspondente aos valores de corrente obtidos experimentalmente. As estimativas para os parâmetros do modelo da equação (18) podem ser feitas por vários métodos da Resolução Multivariada de Curvas sendo que um dos mais importantes e versáteis é o método dos Mínimos Quadrados Alternantes – ALS.

O método ALS é um problema de otimização, em que estimativas das matrizes **C** e **S** são calculadas através dos método dos mínimos quadrados de acordo com a seguinte sequência:

1. Faça um estimativa inicial para **C**, então:
2. Calcule: $\mathbf{C} = \mathbf{X}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$
3. Calcule: $\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{X}$
4. Calcule o modelo: $\mathbf{X}^* = \mathbf{C}\mathbf{S}^T$
5. Calcule o resíduo: $\mathbf{R} = \mathbf{X} - \mathbf{X}^*$
6. Calcule a soma quadrática dos resíduos: $SQR = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J r_{ij}^2$
7. Se $SQR > \epsilon$, repita os cálculos a partir do passo 2.

Com o método ALS, tanto os voltamogramas quanto os perfis de concentração dos compostos puros presentes em equilíbrio podem ser obtidos usando apenas medidas feitas no sistema sob investigação, sem que se tenha qualquer outro tipo de informação. Devido a esta característica este método de modelagem empírica é classificado como “*soft method*”. Apesar disto, se há algum outro tipo de informação conhecida sobre as características dos parâmetros do modelo, esta pode ser inserida dentro do procedimento de cálculo do ALS na forma de uma restrição, que faz com que os elementos conhecidos sejam calculados de

acordo com critérios previamente definidos. As restrições mais usadas nos ‘soft methods’ estão descritas no item 2.4.4.

4.4.4 Escolha do *software* adequado

Há vários programas computacionais de análise numérica que possibilitam resolver sinais de natureza multivariada como os obtidos neste trabalho. Estes possuem funções matemáticas que são ativadas via linha de comando, permitindo o desenvolvimento de algoritmos, criação de gráficos em duas e três dimensões, programação, criação de “toolboxes”, rotinas, etc (JAUMOT, 2005; JALALI-HERAVI, 2010; JAUMOT, 2010). Suas funcionalidades têm sido constantemente aperfeiçoadas por seus desenvolvedores, permitindo que tarefas como otimizações matemáticas, controle de sistemas e simulações possam ser realizadas com grande eficiência. Um dos *softwares* mais conhecidos nesta área é o MATLAB, porém apresenta um alto custo e, por vezes, torna-se inacessível por questões de limitação financeira.

Uma alternativa à questão de programas computacionais de alto custo tem sido a utilização de *software* de distribuição gratuita, a partir dos quais se podem alcançar resultados tão confiáveis quanto àqueles obtidos por *softwares* pagos. Entre os mais conhecidos estão o SCILAB, "R" e OCTAVE. Neste trabalho foi utilizado inicialmente o SCILAB e em seguida o R, optando-se pelo uso deste último por ser um programa mais estável, executar as tarefas de forma mais rápida e dinâmica e por possuir um alto poder de programação. A estabilidade do programa é uma característica importante, uma vez que matrizes de grandes dimensões são submetidas a várias operações. Tais operações são executadas repetidamente e, ao longo de certo período de operação, o programa deve ser estável a ponto de não travar ou fechar espontaneamente, o que pode levar a perda de horas de trabalho. Neste sentido o R se mostrou bastante superior.

Quando o programa é executado, seu console é aberto automaticamente, dentro do qual se encontra o *prompt* onde podem ser inseridas as linhas de comando. Assim que é definido o diretório de trabalho, isto é, o diretório no qual

estão os arquivos que o usuário pretende utilizar, tarefas como importar dados, executar linhas de comando salvas em sessões anteriores, carregar pacotes de programações, etc., podem ser desenvolvidas.

Cada comando tem uma sintaxe específica, devendo-se tomar o cuidado de distinguir as letras maiúsculas das minúsculas (*case sensitive*). No trabalho com o programa R, os dados foram importados a partir de arquivos de texto que, a partir de um comando específico o reconhece como uma matriz. A partir deste ponto, a matriz dos dados contendo os valores das correntes pode ser submetida a análise matemática que, por conveniência deve ser preparada anteriormente de acordo com os objetivos desejados e as características do sistema em análise.

4.4.5 Estudo do sistema glutaciona-zinco (GSH-Zn)

O conjunto de voltamogramas obtidos a várias proporções metal/ligante para o sistema glutaciona-zinco está mostrado na figura 16, através de um diagrama do tipo "3D".

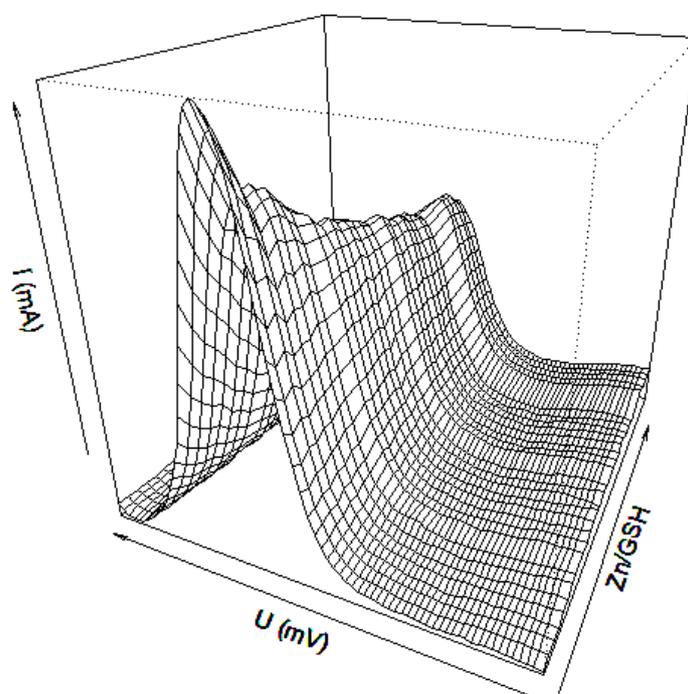


Figura 16 – Gráfico "3D" de vários voltamogramas obtidos em diferentes proporções metal-ligante para o sistema GSH-Zn

4.4.5.1 Decomposição em valores singulares para o sistema GSH-Zn

Ao ser executada no *software* R, a decomposição em valores singulares retorna um vetor **d** cuja extensão é igual ao número de linhas da matriz de dados inicial, contendo seus respectivos valores singulares em ordem decrescente.

Estes dados são melhor interpretados se colocados em um diagrama, tornando possível observar quais valores singulares são significativos e obter uma estimativa do número de componentes (Figura 17).

O diagrama da figura 17 indica a existência de três valores singulares significativos, o que sugere ser este o número de contribuições individuais para obtenção dos sinais multivariados, ou seja, o número de componentes. A análise deste gráfico revela dois componentes bastante significativos, sendo que o primeiro ajusta 80% e a segunda 14 % da variação dos dados. Há a possibilidade de haver um terceiro componente significativo ajustando 1,4 % da variação dos dados. Os demais componentes não devem ser considerados significativos, pois a porcentagem de variação entre eles é aproximadamente constante e muito próxima de zero.

Entretanto ainda há pouca ou nenhuma informação a respeito do comportamento do equilíbrio metal/ligante durante as medidas, havendo a necessidade de tratamentos matemáticos adicionais para que seja possível recuperar os perfis dos componentes puros (MENDIETA, 1996; ESTEBAN, 2000).

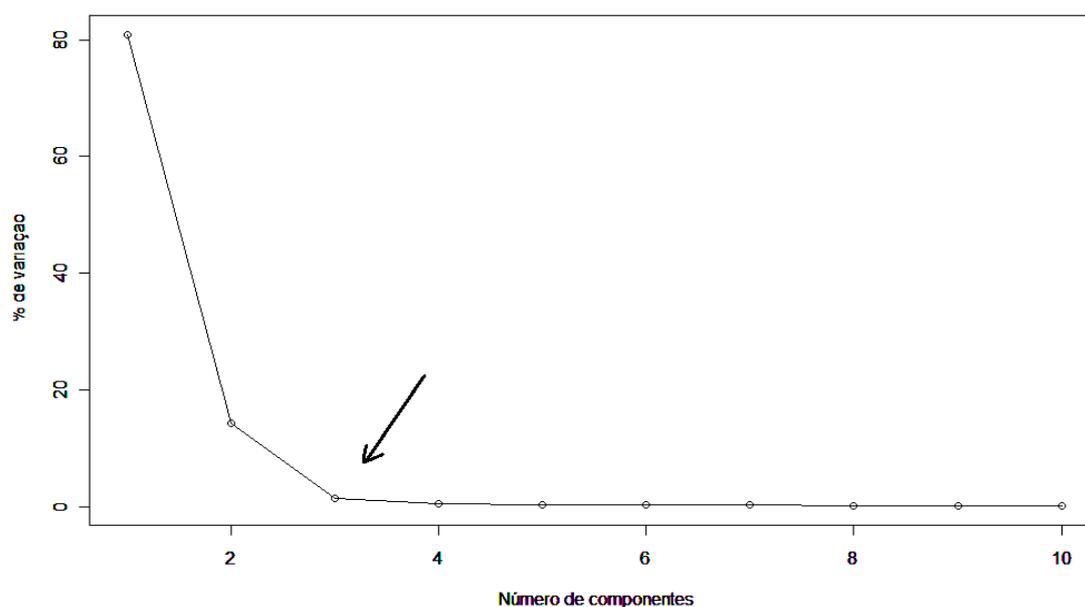


Figura 17 – Diagrama dos valores singulares obtidos a partir de medidas voltamétricas feitas com sistema GSH-Zn. Os valores estão expressos como porcentagem da soma de todos os valores singulares.

4.4.5.2 Obtenção dos voltamogramas e dos perfis de concentração dos componentes puros para o sistema GSH-Zn

4.4.5.2.1 Geração das estimativas iniciais para o sistema GSH-Zn

A inicialização do processo iterativo de otimização para obtenção dos perfis de concentração (**C**) e dos voltamogramas puros (**S**) demanda uma matriz ou um conjunto de perfis que se aproximem, mesmo que grosseiramente, dos perfis que se espera obter como resultado final (ESTEBAN, 2006; BROWN, 2009; GEMPERLINE, 2006). Ela fornece a estimativa inicial para que se processem repetidas operações matemáticas em ciclos até que um critério bem definido seja alcançado, ao que se denomina iteração.

Uma função matemática que simula voltamogramas mediante o ajuste de parâmetros empíricos foi empregada como método de inicialização do ajuste do

modelo bilinear pelo método MCR. A figura 18 mostra os voltamogramas usados como inicialização.

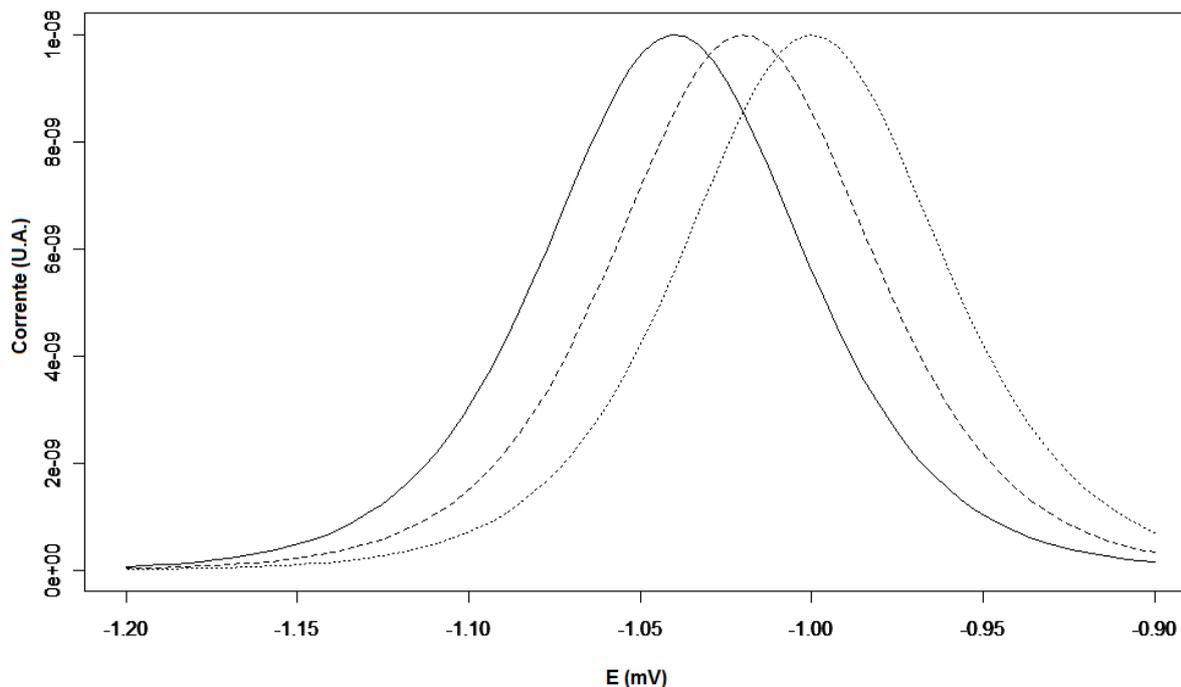


Figura 18 – Diagrama com as estimativas iniciais para o início dos ciclos de iterações.

Neste caso, algum conhecimento a respeito do sistema químico em estudo, tais como as variáveis que podem influenciar na obtenção do sinal analítico, como se comportam ou deveriam se comportar as espécies químicas durante a medida, etc., são informações bastante valiosas.

4.4.5.2.2 Ajuste do modelo bilinear pelos mínimos quadrados alternantes para o sistema GSH-Zn

Um dos problemas existentes na resolução de sinais multivariados é o da ambiguidade. Ele reside no fato de que solução obtida a partir da decomposição $\mathbf{X} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E}$ provavelmente não apresente significado químico para as matrizes (\mathbf{C}) e

(**S**), mas apenas matemático, uma vez que existem muitas soluções possíveis. Assim, os valores obtidos para estas matrizes podem estar em uma magnitude muito distante dos valores reais (ambiguidade de intensidade) e a forma dos sinais diferente daquela que corresponderia a cada componente puro (ambiguidade rotacional) (TAULER, 1993a; TAULER, 1993b; ABDOLAH, 2010; GUTERRES, 2006).

Este problema pode ser minimizado a partir da inserção de algumas informações sobre o sistema na forma de restrições que, ao serem introduzidas no método de resolução, tal como os mínimos quadrado alternantes (ALS), limitam o número de soluções possíveis, direcionando o processo iterativo para um resultado final o mais próximo possível do verdadeiro. Deste modo, ALS consiste em um método iterativo de resolução de curvas, em que é feito um refinamento a partir de uma estimativa inicial usando algumas restrições relacionadas a características inerentes ao conjunto de dados ou a propriedades do sistema químico (TAULER, 1993a; DE JUAN, 1997).

Na restrição de não negatividade admite-se que o valor das medidas no experimento sejam sempre positivos, tanto para as correntes quanto para as concentrações. Como na voltametria as medidas são valores de correntes obtidas a partir da aplicação de potenciais de valores determinados, esta é uma importante restrição, pois os voltamogramas dos componentes puros são formados por valores de correntes maiores que zero. O *closure* faz com que a soma das concentrações de todas as espécies envolvidas no equilíbrio sejam constantes durante cada processo de iteração, fazendo-se cumprir uma equação de balanço de massa. A restrição de unimodalidade estabelece uma condição para a forma dos sinais, a qual depende do tipo de sinal obtido na medida (DÍAZ-CRUZ, 1997; ESTEBAN, 2006; TAULER, 1993a; TAULER, 1993b, GEMPERLINE, 2006). A figura 19 mostra os perfis de concentração e os voltamogramas dos componentes puros quando a matriz de dados com os valores das correntes é refinada a partir da estimativa inicial, utilizando a restrição de não negatividade para as matrizes **C** e **S**, admitindo-se a existência de três contribuições individuais para variação dos dados.

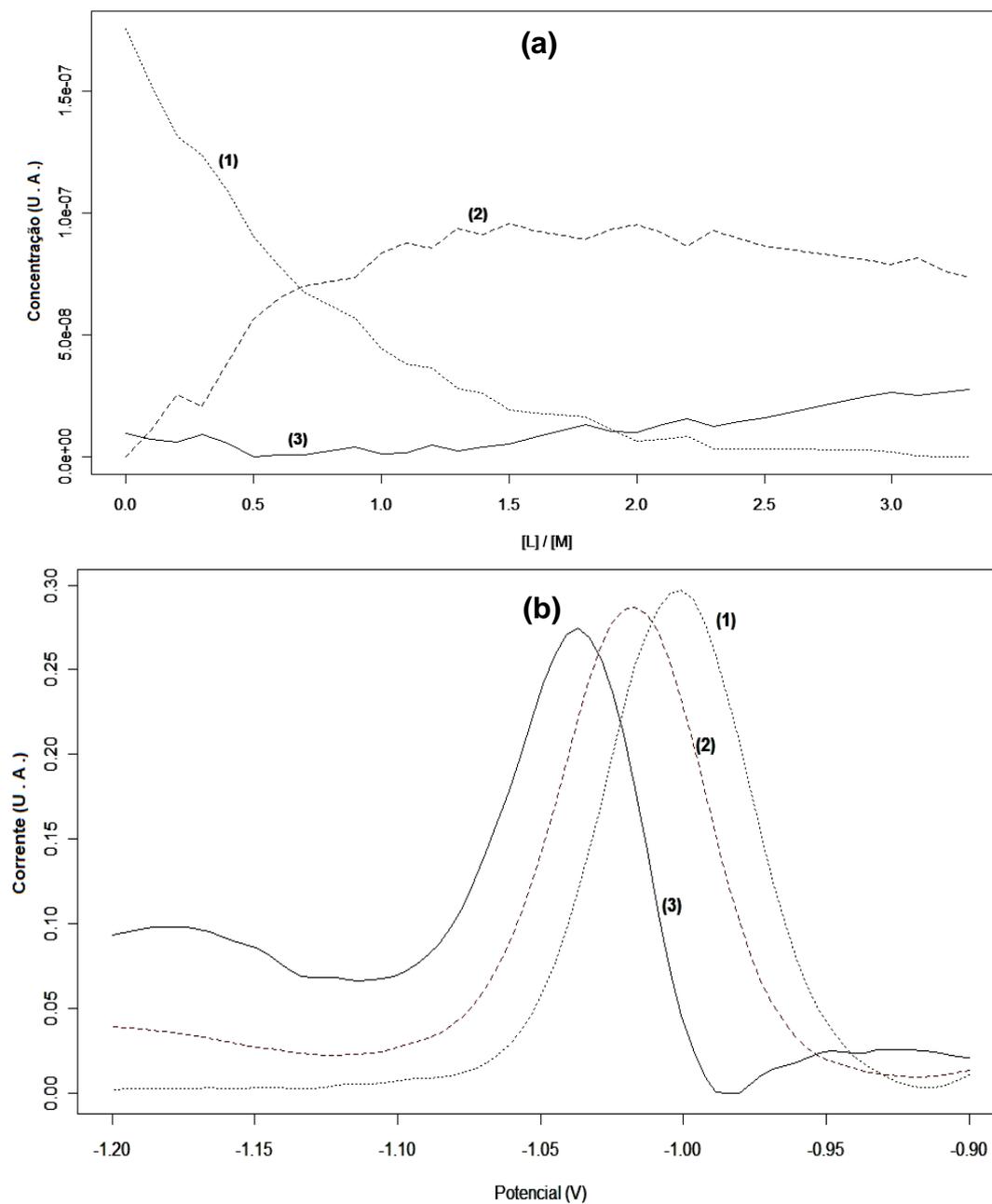


Figura 19 – Recuperação dos perfis de concentração (a) e dos voltamogramas (b) dos componentes puros para o sistema GSH-Zn usando restrição de não negatividade para C e S. Os valores das correntes estão em unidades arbitrárias. $[Zn^{2+}]$ inicial = 5×10^{-5} M, tampão borato pH=8,5 e $[KCl]= 0,1$ M .

Sendo a primeira varredura realizada na presença apenas do íon metálico e as subseqüentes com incrementos de solução de glutathiona, é possível admitir que o componente representado pela linha (1), figura 19, seja o sinal do Zn^{2+} livre. A medida que a concentração deste cátion metálico livre diminui, observa-se o surgimento de dois complexos, um representado pela linha (2) e outro pela linha (3). Há a probabilidade de que o composto representado pela linha (2) seja do tipo ML, conforme demonstra a figura 12 (GSH-Zn 1:1), onde no mesmo pH em que foram registrados os voltamogramas é esta a espécie predominante. Para Díaz-Cruz e colaboradores (2000), estas espécies poderiam também ser do tipo M_2L_2 . A concentração deste componente cresce rapidamente nas primeiras adições de GSH mantendo um platô após a proporção entre as concentrações molares de GSH e Zn^{2+} alcançar o valor 1,5. Em seguida, há um aumento na concentração de um segundo complexo, provavelmente do tipo ML_2 , representado pela linha (2) da figura 19.

Nota-se que há uma correspondência entre as variações de concentração destas espécies, pois, com a estabilização do platô da concentração da primeira espécie, há um contínuo decréscimo na concentração do íon metálico livre, o que pode explicar a formação desta segunda espécie, já que alguma fração do Zn^{2+} não complexado continua a ser consumida pelo ligante para formar outro complexo de estequiometria ML_2 (DÍAZ-CRUZ, 2000).

Considerando-se que a adição de um ligante à solução de um íon metálico tende a deslocar os potenciais para valores mais negativos, pode-se constatar, a partir da análise do diagrama da figura 19b, que a curva (1), tal como na figura 19 a, representa o íon metálico. Na presença do ligante, os potenciais ficam mais negativos, justamente pela interação entre o aminoácido glutathiona e o Zn^{2+} , pois o eletrodo de trabalho deve estar polarizado mais negativamente para deslocar o metal de seu complexo e provocar sua redução (MENDIETA, 1996).

Neste trabalho, como já havia um conhecimento prévio do sistema químico, a otimização com ALS buscou a descrição dos perfis e voltamogramas com três componentes (metal livre e duas espécies complexas) embora a existência de um terceiro componente não fosse tão fortemente sugerida pelo diagrama SVD. Ainda foram testados modelos com 4 e 5 componentes, mas nenhum destes forneceu resultados tão satisfatórios quanto o modelo com três componentes.

4.4.6 Estudo do sistema cádmio-glutationa (GSH-Cd)

O conjunto de voltamogramas obtidos a várias proporções metal/ligante para o sistema glutaciona-cádmio está mostrado na figura 20, através de um diagrama do tipo "3D".

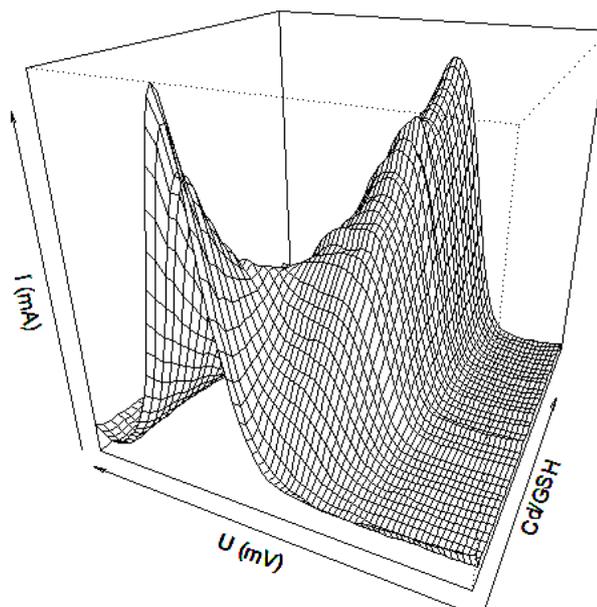


Figura 20 – Gráfico "3D" de vários voltamogramas obtidos em diferentes proporções metal-ligante para o sistema GSH-Cd.

4.4.6.1 Decomposição em valores singulares para o sistema GSH-Cd

A decomposição em valores singulares, que visa obter uma estimativa do número de contribuições individuais para o sistema glutaciona-cádmio, seguiu os mesmos parâmetros do sistema zinco glutaciona (item 4.4.5.1). Analisando o gráfico da figura 21, é possível admitir a existência de três componentes, sendo que o primeiro ajusta 59%, o segundo 27% e o terceiro 7% da variação dos dados. Havia ainda a possibilidade de um quarto componente, no entanto os resultados obtidos

pela otimização por ALS levou a descartar esta opção. Portanto considerou-se a existência de três espécies, sendo estas o metal livre e dois complexos.

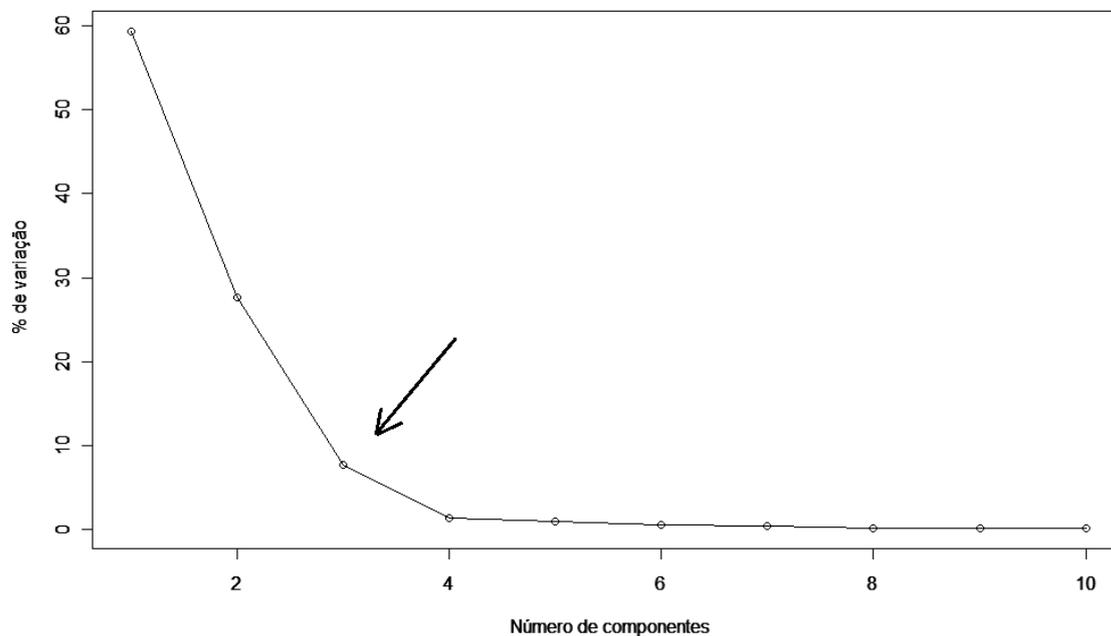


Figura 21 – Diagrama dos valores singulares obtidos a partir de medidas voltamétricas feitas com sistema GSH-Cd. Os valores singulares estão expressos como porcentagem da soma de todos os valores.

4.4.6.2 Obtenção dos voltamogramas e dos perfis de concentração dos componentes puros para o sistema GSH- Cd

4.4.6.2.1 Geração das estimativas iniciais para o sistema GSH-Cd

As estimativas iniciais para resolução dos sinais multivariados pelos mínimos quadrados alternantes para sistema Cd-GSH foram as mesmas do sistema Zn-GSH, tal como descritas no item 4.4.5.2.1.

4.4.6.2.2 Ajuste do modelo bilinear pelos mínimos quadrados alternantes para o sistema GSH-Cd

Diferentemente do sistema glutationa-zinco, melhores resultados foram obtidos utilizando-se a restrição *closure* para a matriz de concentrações e unimodalidade para a recuperação dos voltamogramas puros (Figura 22 b). O diagrama dos valores singulares indica a presença de três componentes com contribuições significativas para a variação nos dados (DÍAZ-CRUZ, 1997). A possível presença de um quarto componente foi descartada, uma vez que sua contribuição não foi significativa quando comparada aos demais.

A análise do diagrama que demonstra a recuperação dos perfis de concentração (Figura 22 a) revela que a linha (1), que começa com um alto valor de concentração e decresce à medida que o valor $[L]/[M]$ vai aumentando (devido a adição de GSH), deve corresponder ao íon metálico livre, que ainda não foi coordenado pelo ligante. Durante a queda da concentração do Cd^{2+} livre surgem dois compostos, representados pelas linhas (2) e (3). Estes compostos são o resultado da coordenação do cádmio pela glutationa (MENDIETA, 1996; DÍAZ-CRUZ, 2000; ANTUNES, 2002; ESTEBAN, 2006). O diagrama dos valores singulares revela que os três componentes usados na resolução por ALS são bastante significativos quanto a suas contribuições individuais para a variação dos dados, fato que se revela nos valores das concentrações obtidas quando estes perfis são recuperados.

De acordo com o diagrama da figura 14 (GSH-Cd 1:1), pode-se observar que a espécie predominante em pH próximo a 8,5 (pH em que foram registrados os voltamogramas) tem composição estequiométrica do tipo ML, o que permite presumir que seja esta a composição principal do primeiro complexo formado. Com a continuação do acréscimo de GSH, tem início a formação de um segundo componente, complexo em que o íon metálico estaria coordenado por duas moléculas do ligante. Este segundo componente provavelmente corresponde a espécie ML_2H , pois em $pH=8,5$ é esta a espécie predominante, conforme mostra figura 14 (GSH-Cd 2:1). No entanto uma espécie do tipo ML_2H_2 ou até mesmo uma fração contendo ML_2H e ML_2H_2 não estariam descartadas.

Os voltamogramas puros corroboram com os perfis de concentração, pois o metal livre, representado na linha (1) encontra-se a potenciais menos negativos que seus complexos, pois o eletrodo de mercúrio precisa estar mais polarizado para deslocar o metal que está coordenado pelo ligante para poder reduzi-lo.

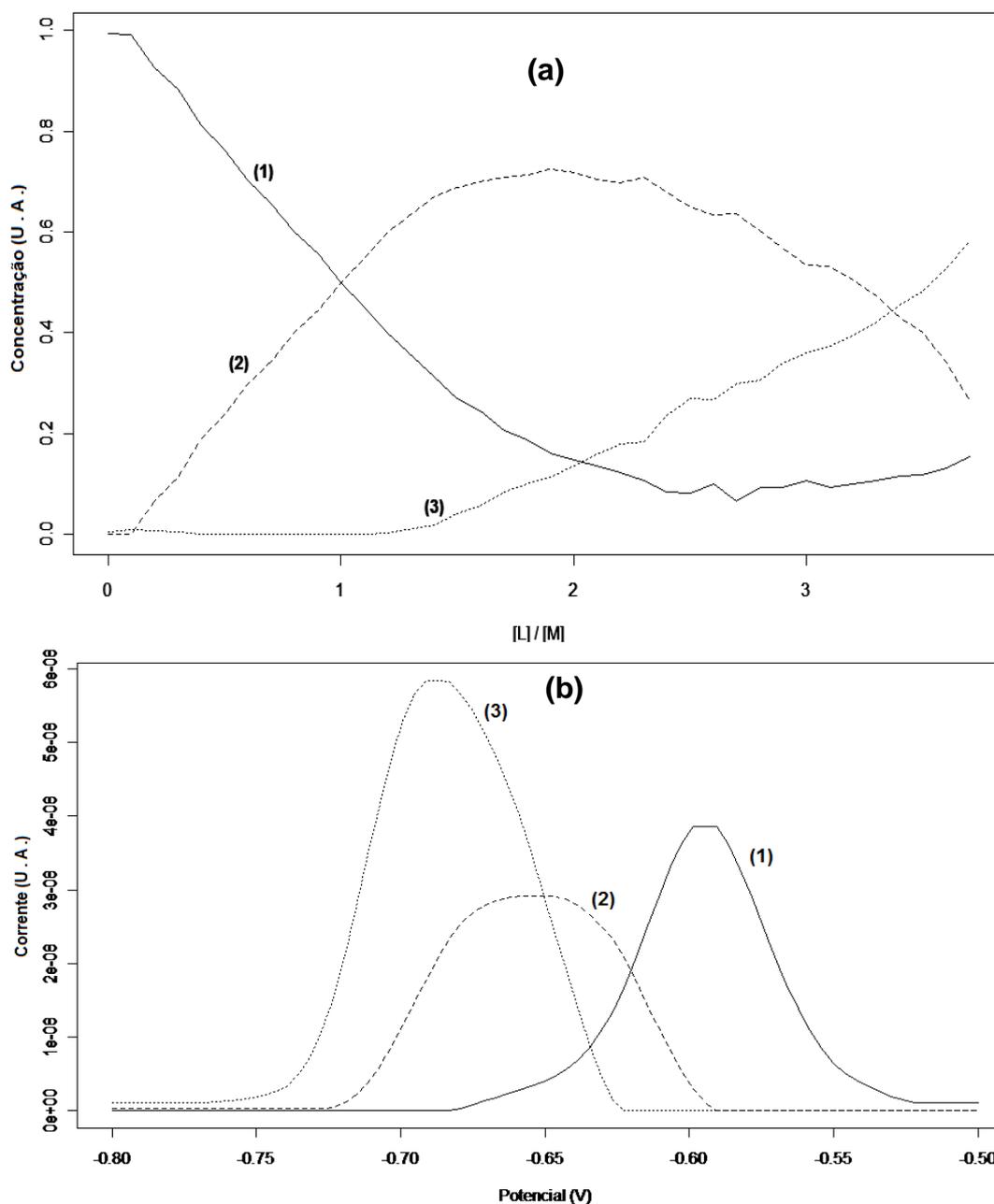


Figura 22 – Recuperação dos perfis de concentração (a) e dos voltamogramas (b) dos componentes puros para o sistema Cd-GSH usando closure para C e unimodalidade para S. Os valores das correntes estão em unidades arbitrárias. $[Cd^{2+}]$ inicial = 5×10^{-5} M, tampão borato pH=8,5 e $[KCl]= 0,1$ M .

4.5 Estudo potenciométrico *versus* estudo voltamétrico por MCR

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a glutatona pode se coordenar aos íons zinco e cádmio formando complexos capazes de serem identificados a partir de dados obtidos por medidas voltamétricas que, posteriormente, foram submetidos a uma análise matemática de natureza multivariada. Estes dados apresentam uma boa correlação com os resultados das medidas potenciométricas e as duas podem atuar de forma complementar. Contudo, existem diferenças fundamentais entre as medidas realizadas em condição de equilíbrio (potenciometria) com aquelas realizadas em modo dinâmico (voltametria). Com relação à primeira, temos na medida potenciométrica a adição do titulante (KOH) à soluções que contenham uma relação molar pré-estabelecida entre o metal e o ligante com concentrações altas de ambos quando comparadas às medidas voltamétricas. Desta forma, a medida potenciométrica fornece informações acerca de um complexo formado segundo uma estequiometria previamente estabelecida. Diferentemente, na medida voltamétrica, informações acerca da formação de complexos são obtidas para uma faixa contínua de proporções entre o metal e o ligante. Uma vez superadas as dificuldades de extrair a informação deste conjunto de dados, tem-se acesso através do uso combinado de potenciometria e voltametria de informação sobre como as espécies apresentam equilíbrios numa ampla gama de concentrações de metal e ligante. Além disso, a medida voltamétrica em si fornece dados para concentrações de metal muito mais baixas do que aquelas utilizadas para medidas potenciométricas permitindo um melhor controle sobre a formação ou não de espécies polinucleares.

Relativamente à obtenção do sinal analítico, a medida potenciométrica é de natureza passiva, onde um potencial é gerado entre o eletrodo de referência e o eletrodo indicador, respondendo às variações na concentração (atividade) de uma espécie que se forma ou é consumida no equilíbrio. Para estas medidas, o tratamento matemático fundamenta-se na minimização das diferenças quadráticas entre as curvas potenciométricas real e teórica para refinar o valor das constantes de estabilidade. A variação no pH do sistema é dependente da proporção metal/ligante, pois a ocupação de sítios de coordenação pelo íon metálico provocará a liberação

de maior ou menor quantidade de íons H^+ , o que afetará diretamente a curva potenciométrica.

Os dados voltamétricos são provenientes de uma medida ativa, na qual, por meio de ajustes instrumentais, submete-se o sistema químico tamponado a uma seqüência de potenciais conhecidos e igualmente espaçados, monitorando-se o valor da corrente que surge devido à oxidação ou redução de espécies químicas no eletrodo de trabalho. De acordo com o que foi abordado durante a discussão dos resultados obtidos por MCR, este método não distinguiu as espécies quanto ao grau de protonação do ligante no complexo formado (se ML, MHL ou MH_2L , por exemplo), embora seja possível prever a proporção com que estes se coordenam.

Uma vez conhecidas as curvas de distribuição das espécies obtidas a partir do modelo ajustado pela potenciometria é possível propor, de acordo com o pH em que os vários voltamogramas são registrados, a composição mais próxima da realidade para o equilíbrio químico entre o íon metálico e o ligante. Desta forma potenciometria e voltametria com abordagem de MCR, se mostram promissoras como o uso de técnicas complementares na investigação de equilíbrios metal-ligante.

A figura 23 mostra como é possível usar os resultados da potenciometria como parâmetro para avaliar o grau de protonação das espécies. Como os voltamogramas foram todos registrados em $pH = 8,5$, no comparativo dos perfis de concentração recuperados por MCR com os diagramas de distribuição das espécies, pode-se sugerir, para o sistema GSH-Zn, que os dois componentes encontrados na voltametria refiram-se a complexos totalmente desprotonados. Portanto, as três fontes de variação nos dados voltamétricos deverão corresponder ao sinal do íon metálico puro (Zn), a um complexo em que o cátion é coordenado por uma molécula do ligante (ZnL) e outro em que é coordenado por duas moléculas do ligante (ZnL_2).

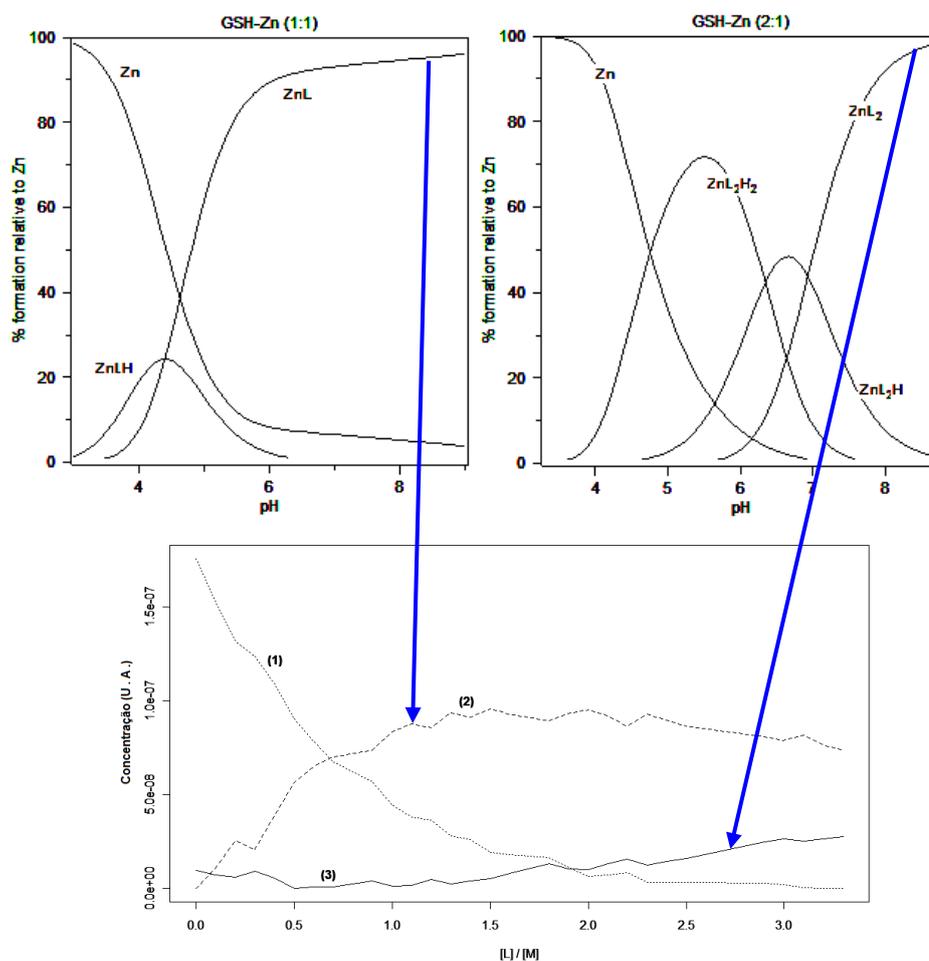


Figura 23 – Comparativo entre as curvas de distribuição das espécies e os perfis de concentração recuperados por MCR para o sistema GSH-Zn.

O mesmo comparativo, agora realizado com o sistema GSH-Cd (Figura 24), permite a visualização de espécies com diferentes graus de protonação. Desta forma, as três fontes de variação de dados podem ser atribuídas ao íon metálico puro, a um complexo em que o cátion é coordenado por uma molécula do ligante (de composição variável entre CdLH e CdL) e outro em que é coordenado por duas moléculas (de composição variável entre CdL₂H₂ e CdL₂H).

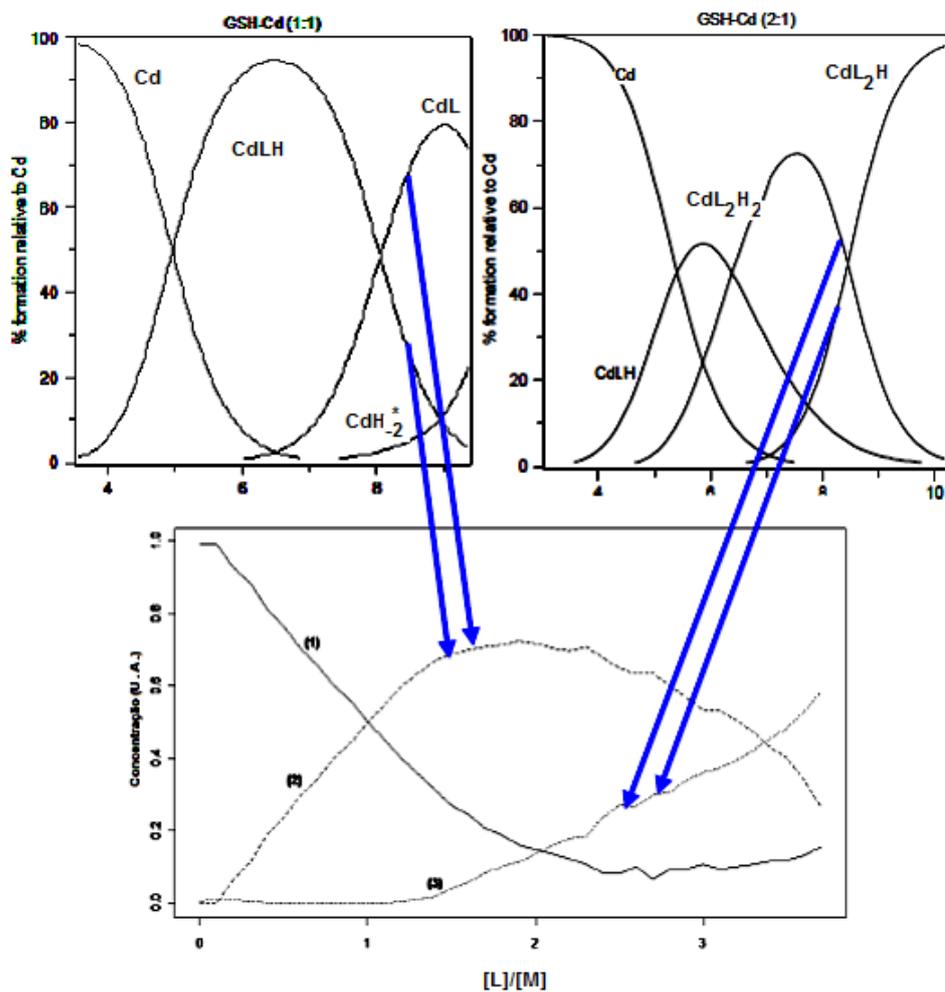


Figura 24 – Comparativo entre as curvas de distribuição das espécies e os perfis de concentração recuperados por MCR para o sistema GSH-Cd.

5. CONCLUSÕES

A resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS) aplicada a dados voltamétricos tem se revelado como uma importante ferramenta no estudo de equilíbrios químicos entre íons metálicos e ligantes. O uso destes métodos junto ao clássico método potenciométrico na investigação destes equilíbrios mostrou que ambas se complementam de forma bastante satisfatória.

O estudo dos complexos entre zinco, cádmio e glutatona a partir das medidas potenciométricas possibilitou a descrição de modelos de equilíbrios químicos bastante completos, a partir dos quais foi possível calcular as constantes de formação das várias espécies que coexistem na solução. O programa *Hyperquad* se constitui em um importante instrumento para o cálculo das constantes de estabilidade devido à facilidade com que sua interface gráfica permite que o modelo de equilíbrio e os valores das constantes de estabilidade sejam ajustados. Uma vez que um ajuste manual entre as curvas experimental e teórica é realizado, os valores de $\log \beta$ podem ser refinados até que sejam alcançados valores cuja soma dos quadrados dos resíduos entre estas curvas sejam os menores possíveis.

As titulações realizadas nas proporções ligante-metal 1:1 e 2:1 forneceram perfis de pH a partir dos quais foi possível propor diferentes modelos de equilíbrio químico e calcular as constantes de estabilidade de várias espécies. Os valores de $\log \beta$ encontrados para os sistemas GSH-Zn e GSH-Cd sugerem uma preferência destes íons metálicos em coordenarem-se a duas moléculas do ligante, pois as constantes tinham valores maiores sempre que calculadas para complexos desta natureza.

O diagrama de distribuição das espécies, obtido pelo programa *HySS* (pertencente ao pacote computacional do *Hyperquad*), foi utilizado para avaliar como as frações de cada espécie se distribuem ao longo da variação do pH. Isto foi grande utilidade, pois se conhecendo as composições das frações existentes em faixas de pH próximas às que os voltamogramas foram registrados, foi possível sugerir para cada um dos perfis de concentração obtidos por MCR, quais são as espécies ali existentes. Além disto, foi possível, através do conhecimento do K_{ps} do produto insolúvel formado, incluí-lo nestas curvas de distribuição.

O método de MCR aplicado a dados voltamétricos permitiu que fossem feitas medidas em concentrações muito menores (da ordem de micromolar), quando comparadas ao método potenciométrico, cujas medidas são realizadas em concentrações na ordem de milimolar. A investigação de equilíbrios químicos nesta menor faixa de concentração é importante na medida em que se encontram mais próximas das condições fisiológicas.

A inclusão das restrições ao método de resolução de curvas é uma etapa que requer um cuidado especial. Por tratar-se de um conjunto de operações que permitem alcançar uma solução final mais próxima da realidade, as restrições devem ser inseridas com critério, procurando-se testar diferentes modelos em que se obtenha um alto grau de ajuste com um significado químico compatível com o sistema em estudo. Neste sentido, o conhecimento das características e princípios de obtenção do sinal analítico é de extrema importância.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolvimento de uma metodologia que possa calcular as constantes de estabilidade a partir dos dados voltamétricos tratados por MCR;
- Investigação dos equilíbrios em condições que próximas das fisiológicas;
- Inclusão de outras restrições aos modelos de MCR-ALS;
- Utilização de outros métodos, como espectroscopia de ressonância nuclear magnética ou de raios-x, na investigação de equilíbrios químicos em paralelo com o método voltamétrico.

REFERÊNCIAS

ABATE, G., MASINI, J.C. Utilização de eletrodos potenciométricos de amálgama em estudos de complexação de substâncias húmicas. **Química Nova**, v. 22, n.5, p. 661, 1999.

ABATE, G.; MASINI, J.C. Acid-Basic and Complexation Properties of a Sedimentary Humic Acid. A Study on the Barra Bonita Reservoir of Tietê River, São Paulo State, Brazil. **Braz. Chem. Soc.**, v. 12 n.1, p. 109-116, 2001.

ABDOLLAHI, H., SAJJADI, S.M. On rotational ambiguity in parallel factor analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, p. 144 – 151, 2010.

ALDERIGHI, L., GANS, P., IENCO, A., PETERS, D., SABATINI, A., VACCA, A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. **Talanta**, v. 184, p. 311-318, 1999.

ANTUNES, M.C., SIMÃO, J.E., DUARTE, A.C., ESTEBAN, M., TAULER, R. Application of multivariate curve resolution to the voltammetric study of the complexation of fulvic acids with cadmium(II) ion. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 291 – 234, 2002.

ARMAS, T. M., MEDEROS, A., GILI, P., DOMÍNGUEZ, S., HERNÁNDEZ-MOLINA, R., LORENZO, P., BARAN, E.J., ARAUJO, M. L., BRITO, F. Speciation in the oxovanadium(IV)/glutathione system. **Polyhedron**, v. 20, p. 799 – 804, 2001.

ASSUMPÇÃO, R.M.V.; MORITA, T. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**, Editora Edgar Blüchr Ltda – EDUSP, 1968, 627 p.

BALLATORI, N., KRANCE S. M., MARCHAN, R., HAMMOND, C. L. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p 13 – 28, 2009.

BARD, A. J., GYÖRGY, I., SCHOLZ, F. **Electrochemical Dictionary**, Springer, 2008, 723 p.

BELCASTRO, M., MARINO, T., RUSSO, N., TOSCANO, M. The role of glutathione in cadmium ion detoxification: Coordination modes and binding properties – A density functional study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 50 -57, 2009.

BERTAGNOLLI, D. C. **Migração de metais por interação das embalagens com Soluções Parenterais**, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BERTHON, G. The Stability constants of metal complexes of Amino Acids with polar side chains. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n.7, p 1117 – 1240, 1995.

BRAIBANTI, A., BRUSCHI, C., FISICARO, E., MARZIA, P. Analysis of variance in determinations of equivalence volume and of the ionic product of water in potentiometric titrations. **Talanta**, v. 33, p. 471 – 480, 1986.

BRO,R., PARAFAC. Tutorial and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.38, p. 149 – 171, 1997.

BRONW, S.D., TAULER, R., WALCZACK, B. **Comprehensive Chemometrics: Chemical And Biochemical Analysis**, Elsevier, 2009. 2896 p.

CANEPARI, S., CARUNCHIO, V., CASTELLANO, P., MESSINA, A. Protonation and silver(I) complex-formation equilibria of some amino-alcohols. **Talanta**, v. 44 n.11, p. 2059-2067,1997.

CARVALHO, C. W. **Determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre os aminoácidos cisteína, n-acetilcisteína e lisina com chumbo em solução aquosa.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 2011.

CHEN, L. Using multivariate curve resolution to improve proteomic mass spectra classification. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 94, p. 123 – 130, 2008.

COWAN, J. A. **Inorganic Biochemistry and Introduction**, VCH, Publishers, 1993, 349 p.

DE JUAN, A., HEYDEN, Y. V., TAULER, R., MASSART, D.L. Assessment of new constraints applied to the alternating least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 346, p. 307 – 318, 1997.

DÍAS-CRUZ, M.S., MENDIETA, A., MONJONELL, A., TAULER, R., ESTEBAN, M. Study of the zinc-binding properties of glutathione by differential pulse polarography and multivariate curve resolution. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 70, p. 91 – 98, 1998.

DÍAZ-CRUZ M. S., DÍAZ-CRUZ J. M., MENDIETA J., TAULER R., ESTEBAN M. Soft and hard-modeling approaches for the determination of stability constants of metal-peptide systems by voltammetry. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 189 – 201, 2000.

DÍAZ-CRUZ, J.M., TAULER, R., GRABARIC, B. S., ESTEBAN, M., CASASSAS, E. Application of Multivariate Curve resolution to the Voltammetric Data. Part 1. Study of Zn(II) Complexation with some polyelectrolytes. **Electroanalytical Chemistry**, v. 393, p. 7-16, 1995.

DÍAZ-CRUZ, M. S., MENDIETA J., TAULER R., ESTEBAN M. Cadmium Binding Properties of Gluthathione: a Chemometrical Analysis of Voltammetric Data. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 66, p. 29 – 36, 1997.

EL-KOSASY, A. M., SHEHATA, M. A., HASSAN N. Y., FAYED, A. S., EL-ZEANY, B. A. Membrane electrodes for the determination of glutathione. **Talanta**, v. 66, n.3, p. 746 – 754, 2005.

ESCODA, M. L., DE LA TORRE, F., SALVADÓ, F. The formation of mixed ligand complexes of Fe(III) with phosphoric and citric acids in 0.5 M NaNO₃ aqueous solutions. **Polyhedron**, v. 18, n. 25 p. 3269-3274, 1999.

ESTEBAN, M., ARIÑO C., DÍAZ-CRUZ J.M., DÍAZ-CRUZ, M.S., TAULER R. Multivariate Curve resolution with alternating least squares optimization: a soft modelling approach to metal complexation studies by voltammetric techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 49 – 61, 2000.

ESTEBAN, M., ARIÑO, C., DÍAZ-CRUZ, J.M. Metal complexation by electroanalytical techniques: hard- and soft-modelling approaches. **Contributions to Science**, v. 2, n. 3, p. 359 – 373, 2003.

ESTEBAN, M., ARIÑO C., DÍAZ-CRUZ, J. M. Chemometrics for the analysis of voltammetric data. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 86 – 92, 2006.

FEROCI, G., FINI, A. Voltammetric investigation of the interactions between superoxide ion and some sulfur amino acids. **Inorganica Chimica Acta**. v. 360, n.3, p. 1023 – 1031, 2007.

FERRETTI, L., ELVIRI, L., PELLINGHELLI, M. A., PREDIERI, G., TEGONI, M. Glutathione and *N*-acetylcysteinyglycine: Protonation and Zn²⁺complexation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 1442 – 1456, 2007.

FILHO, J. R. O., SILVA, W. C., PEREIRA, J. C. M., FRANCO, D. W. Binding of cysteine and glutathione to Ru(II) and Ru(III) centers: Formation and products reactivities. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 2888 – 2895, 2006.

GEMPERLINE, P. **Practical Guide to Chemometrics**, Taylor & Francis, 2006, 520 p.

GANS, P., SABATINI, A., VACCA, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. **Talanta**, v. 43., p. 1739-1753, 1996.

GARRIGOSA, A. M., GUDMÃO, R., ARIÑO, C., DÍAZ CRUZ, J. M., ESTEBAN, M. Determination of complex formation constants by phase sensitive alternating current polarography: Cadmium–polymethacrylic acid and cadmium–polygalacturonic acid. **Talanta**, v.73, p. 776 – 782, 2007.

GELINSKY, M., VOGLER, R., VAHRENKAMP, H. Zinc complexation of glutathione and glutathione-derived peptides. **Inorganica Chimica Acta**, v. 344, p. 230-238, 2003.

GONZÁLEZ-DÁVILA, M.; SANTANA-CASIANO, J.M.; LAGLERA, L.M. Copper adsorption in diatom cultures. **Marine Chemistry**, v. 70, p. 161-170, 2000.

GRABARIC, B.S., GRABARIC, Z., TAULER, R., ESTEBAN, M., CASASSAS, E. Application of multivariate curve resolution to the voltammetric data. Part 3 Factor analysis ambiguities in the study of weak consecutive complexation of metal ion with ligand. **Analytica Chimica Acta**, v. 341, p. 105 – 120, 1997.

GUTERRES, M. R., **Análise multivariada em n-modos: metodologias para o monitoramento de reações químicas**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.

HARRIS, D. C., **Análise Química Quantitativa**, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005, 876 p.

HUGHES, M. N., POOLE, R. K. Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 725-734, 1991.

HULTBERG, C., HULTBERG, M. High glutathione turnover in human cell lines revealed by acivicin inhibition of g-glutamyltranspeptidase and the effects of thiol-reactive metals during acivicin inhibition. **Clinica Chimica Acta**, v. 349, p. 45 – 52, 2004.

JALALI-HERAVI, M., PARASTAR, H., KAMALZADEH, M., TAULER, R., JAUMOT, J. MCRC software: A tool for chemometric analysis of two-way chromatographic data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 104, n.2, p. 155 – 171, 2010.

JAUMOT, J., ESCAJA, N., GARGALLO, R., GONZÁLES, R., PEDROSO, E., TAULER, R. Multivariate curve resolution: a powerful tool for the analysis of conformational transitions in nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n.17, p. 1 – 10, 2002.

JAUMOT, J., GARGALLO, R., DE JUAN, A., TAULER, R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 76, p. 101 – 110, 2005.

JAUMOT, J., TAULER, R. An user friendly MATLAB program for the evaluation of rotational ambiguity in Multivariate Curve Resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, p. 96 – 107, 2010.

JIANG J., LIANGB Y., OZAKI Y. Principles and methodologies in self-modeling curve resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 71, p. 1 – 12, 2004.

KAPOOR, R.C., AGGARWAL, B. S., **Principles of polarography**, John Wiley & Sons, 1991. 185 p.

KREZEL, A., WÓJCIK, J., MACIEJCZYK, M., BAL, W. May GSH and L-His contribute to intracellular binding of zinc? Thermodynamic and solution structural study of a ternary complex. **Chemical Communications**, n. 6, p.704-705, 2003.

LEE. J. D., **Química inorgânica não tão concisa**, tradução da 5ª edição inglesa. Editora Edgard Blücher Ltda., 2003. 527 p.

LEITÃO, J. M. M., DA SILVA, J. C. G. E. PARAFAC2 and MCR-ALS quantification of Diltiazem antihypertensor based on a kinetic spectrophotometric methodology. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 89, p. 90 -96, 2007.

LEVERRIER. P., MONTIGNY, C., CARRIGOS, M., CHAMPEIL, P. Metal binding to ligands: Cadmium complexes with glutathione revisited. **Analytical Biochemistry**, v.371, p. 215-218, 2007.

LI, N.C., DOODY,E. Cadmium and Copper Complexes of Imidazole and 1-Methylimidazole. **Journal of American Chemical Society**, v. 76, n.1, p. 221, 1954.

MANDEVILLE, J., FROEHLICH, E., TAJMIR-RIahi H.A. Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 2, p. 468 – 474, 2009.

MANNE, R. On the resolution problem in hyphenated chromatography. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 27, p. 89 – 94, 1995.

MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J., **Determination and use of stability constant**, 2nd edition, Wiley-VCH, 1992. 200 p.

MARTI, F.B., JIMENO, S.A., CONDE, F.L., MENDEZ, J.H., **Química analítica cualitativa**, Espanha, Paraninfo, 1994, p. 23.

MENDIETA, J., DÍAS-CRUZ, M.S., MONJONELL, A., TAULER, R., ESTEBAN, M. Complexation of cadmium by the C-terminal hexapeptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala from mouse metallothionein: Study by differential pulse polarography and circular dichroism spectroscopy with multivariate curve resolution analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 390, p. 15 – 25, 1999.

MENDIETA, J., DÍAZ-CRUZ, M.S., TAULER, R., ESTEBAN, M. Application of Multivariate Curve resolution to Voltammetric Data. II. Study of Metal-Binding Properties of the Peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 240, p.134 – 141, 1996.

MLADENOV, M., MIRCESKI, V., GJORGOSKI, I., JORDANOSKI, B. Redox kinetic measurements of glutathione at the mercury electrode by means of square-wave voltammetry. The role of copper, cadmium and zinc ions. **Bioelectrochemistry**, v. 65, p. 69 – 76, 2004.

ÖHMAN, L-O. Experimental determination of stability constants of aqueous complexes. **Chemical Geology**, v. 151, p. 41-50, 1998.

ORAM, P. D., FANG X., FERNADO, Q. The Formation Constants of Mercury(II)-Glutathione Complexes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9. p. 709 – 712, 1996.

OZEKI, T., OGAWA, N., Inclusion of chemical constraints in factor analysis to extract a unique set of solutions from spectroscopic and environmental data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 71, p. 61 – 72, 2004.

POLLI, V. R. G., **Determinação das Constantes de Estabilidade dos complexos formados entre os aminoácidos cistina, ornitina e lisina com alumínio em solução aquosa**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

PUSTY, G., MAEDER, M., HUNGERBÜHLER, K. Tutorial on the fitting of kinetics models to multivariate spectroscopic measurements with non-linear least-squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 81, p. 149 – 164, 2006.

RAJKÓ, R. Computation of the range (band boundaries) of feasible solutions and measure of the rotational ambiguity in self-modeling/multivariate curve resolution **Analytica Chimica Acta**, v. 645, p. 18 – 24, 2009.

RAJKÓ, R., NASSAB P. R., SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Self-modeling curve resolution method applied for the evaluation of dissolution testing data: A case study of meloxicam–mannitol binary systems. **Talanta**, v. 79, p. 268 – 274, 2009.

RICCI, F., ARDUINI, F., TUTA, C. S., SOZZO, U., MOSCONE, D., AMINE, A., PALESCHI, G. Glutathione amperometric detection based on a thiol–disulfide exchange reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p. 164 – 160, 2006.

ROSE, J., **Advanced in Physico-chemical Experiments**, Isaac Pitman & Sons, London, 1964. 414 p.

ROSSOTI, H. S. Design and publication of work on stability constants. **Talanta**, v. 21, p. 809-829, 1974.

RUCKEBUSCH, C., DE JUAN, A., DUPONCHEL, L., HUVENNE, J.P. Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 80, p. 209 – 214, 2002.

SABOURY, A.A.; SARRI-SARRAF, N.; SAIDIAN, S. Thermodynamics of binding copper ion by myelin basic protein. **Thermochimica Acta**, v. 381, p. 147-151, 2002.

SAITO, M. A., MOFFET, J. W. Complexation of cobalt by natural organic ligands in the Sargasso Sea as determined by a new high-sensitivity electrochemical cobalt speciation method suitable for open ocean work **Marine Chemistry**, v. 75, p. 49 – 68, 2001.

SÁNCHEZ-PONCE, R., RUTAN, S. C. Steady state kinetic model constraint for Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares analysis **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 50 -58, 2005.

SCHNEIDER, A. B., **Determinação sequencial de cromo, tálio, cádmio, chumbo, cobre e antimônio em concentrado polieletrólítico para hemodiálise por voltametria de redissolução através de um gradiente de pH.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9 e 10, p. 916 – 921, 1999.

TAULER, R. Application of non-linear optimization methods to the estimation of multivariate curve resolution solutions and of their feasible band boundaries in the investigation of chemical and environmental data sets. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, p. 289 – 298, 2007.

TAULER, R., BARCELÓ, D. Multivariate Curve Resolution and calibration applied to liquid chromatography diode array detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 319 – 327, 1993b.

TAULER, R., **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, V. 30, P. 133 – 146, 1995.

TAULER, R., IZQUIERDO-RIDORSA, A., CASASSAS, E., **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 18, p. 293 – 300, 1993a.

TAULER, R. Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution. **Journal of Chemometrics**, v.15, p. 627 – 646, 2001.

TOFT, J. Evolutionary rank analysis applied to multidetector chromatographic structures. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 29, p. 189 – 212, 1995.

TWISS, M. R., ERRÉCALDE, O., FORTIN, C., CAMPBELL, P. G. C., DENIZEAU, F., BERKELAAR, E., HALE, B., VAN REES, K. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 13, p. 9-24, 2001.

VOGEL, A. I., JEFFERY, G.H., BASSETT, J., MENDHAM, J., DENNEY, R.C., **Análise Química Quantitativa**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1992, 712 p.

ZENG, Z., LIANG, Y., JIANG, Z., CHAU, F., WANG, J. Quantification of target components in complex mixtures using alternative moving window factor analysis and two-step iterative constraint method. **Talanta**, v. 74, p. 1568 – 1578, 2008.

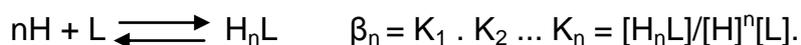
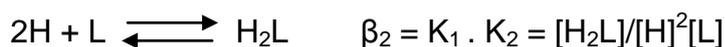
ZHANG, F., HUA, L. Resolution of overlapping capillary electrophoresis peaks by using chemometric analysis: Improved quantification by using internal standard. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 184 – 192, 2006.

ZHANG, Z., BOTTENUS, B., CLARCK, S. B., TIEN, G., ZANONATO, P. L., RAO, L. Complexation of gluconic acid with Nd(III) in acidic solutions: A thermodynamic study **Alloys and Compounds**, v. 444-445, p. 470-476, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Principais convenções e simbologias adotadas na expressão das constantes de estabilidade

- As cargas associadas ao metal, ao ligante, ou aos complexos são omitidas.
- O íon hidroxila é representado por H_{-1} .
- Para um ligante H_nL , no caso de $n > 1$, a protonação é descrita em etapas, sendo que cada etapa terá uma constante (K_1 , K_2 , K_3 , etc.). O produto das constantes das etapas de protonação fornece as constantes cumulativas (designadas por β), como mostra o exemplo a seguir:



Expressando estas constantes de estabilidade em termos de logaritmos decimais, a relação entre as constantes parciais e cumulativas é

$$\log \beta_2 = \log K_1 + \log K_2$$

e

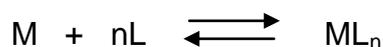
$$\log \beta_n = \log K_1 + \log K_2 + \dots + \log K_n$$

- As constantes parciais e cumulativas para um equilíbrio metal-ligante são expressas de forma semelhante às de protonação do ligante.



$$\beta_n = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_n = [ML_n] / [M][L]^n$$

- As constantes cumulativas são utilizadas para representar a adição de n ligantes ao metal em uma etapa combinada. Assim, para o equilíbrio



a expressão da constante é dada por

$$\beta_n = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_n = [ML_n] / [M][L]^n.$$

- Muitos equilíbrios metal-ligante envolvem, simultaneamente, a adição ou perda de íons hidrogênio ou adição de hidroxilas. A forma usada para representar cada uma destas constantes é descrita a seguir.

a. Adição de ligantes parcialmente protonados ao metal:



b. Adição de um próton ao complexo metal-ligante:

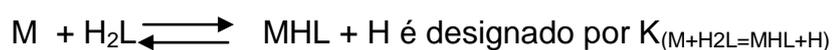


c. Adição simultânea de próton e ligante ao metal. Como estas são constantes cumulativas, são descritas em termos de beta (β):



Normalmente estas constantes cumulativas que envolvem próton, ligante e metal são representadas por $pM + qH + rL \rightleftharpoons M_pH_qL_r$. Deste modo a última reação acima é designada por $\beta(1,2,1)$. Diferentes convenções tem sido utilizadas na literatura, e na maioria das publicações estas convenções são explicadas ao expor os resultados e valores.

d. Perda de um próton de um ligante complexado ou de um ligante complexado que possui dois ou mais grupos doadores de próton.



APÊNDICE B – Parâmetros utilizados na medida voltamétrica do sistema GSH-Zn²⁺

Os parâmetros utilizados nas medidas voltamétricas estão dispostos da mesma forma como são mostrados na tela do aparelho.

Method: gluta

```
=====
=====
```

	Instructions parameters	t/s	Main parameters		Auxiliary	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1	STIR	5.0	Rot.speed	2000 /min		
2	SMDE		Drop size	4		
3	DPMODE		U.ampl	50 mV	t.meas	20.0 ms
			t.step	0.60 s	t.pulse	40.0 ms
4	MEAS	5.0	U.meas	-900 mV		
5	OSTIR	10.0				
6	SWEEP	46.8	U.start	-900 mV	U.step	4 mV
			U.end	-1200 mV	Sweep rate	6.667 mV/s
7	OMEAS		U.standby	mV		
8	END					

Method: gluta

DOCUMENTATION

```
=====
```

APÊNDICE C – Parâmetros utilizados na medida voltamétrica do sistema GSH-Cd²⁺

Method: gluta

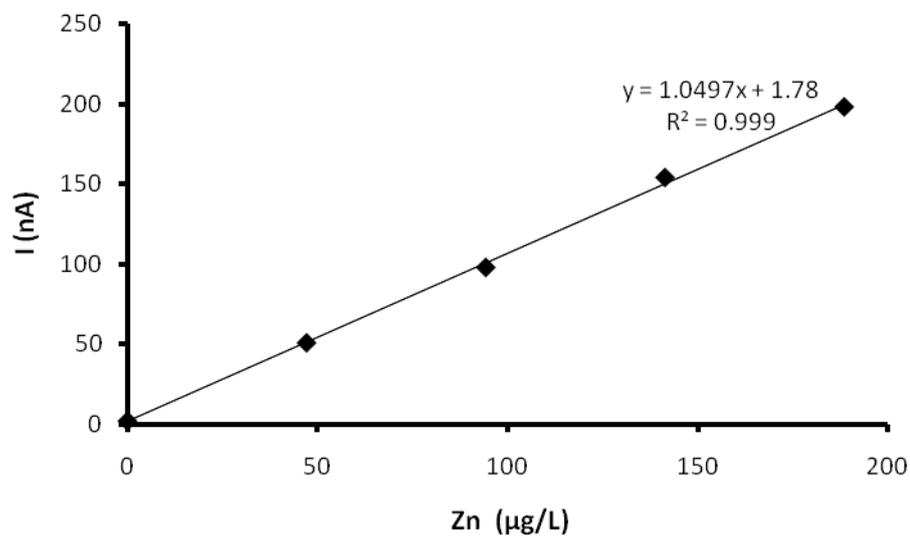
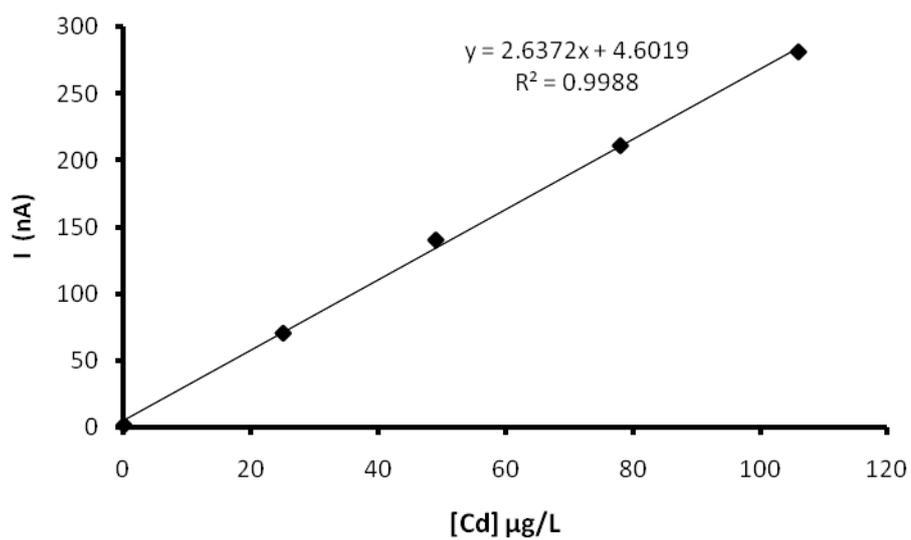
=====

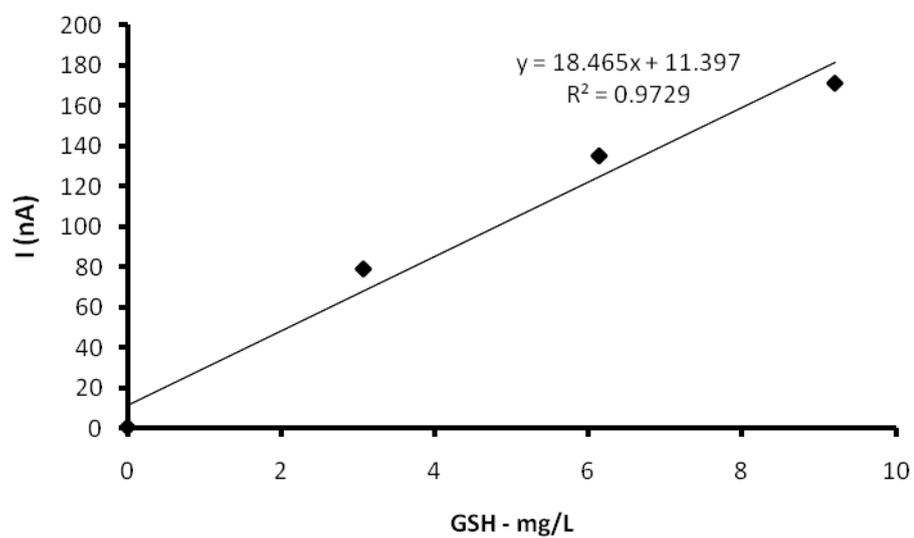
	Instructions parameters	t/s	Main parameters		Auxiliary	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1	STIR	5.0	Rot.speed	2000 /min		
2	SMDE		Drop size	4		
3	DPMODE		U.ampl	50 mV	t.meas	20.0 ms
			t.step	0.60 s	t.pulse	40.0 ms
4	MEAS	5.0	U.meas	-500 mV		
5	OSTIR	10.0				
6	SWEEP	46.8	U.start	-500 mV	U.step	4 mV
			U.end	-800 mV	Sweep rate	6.667 mV/s
7	OMEAS		U.standby	mV		
8	END					

Method: gluta

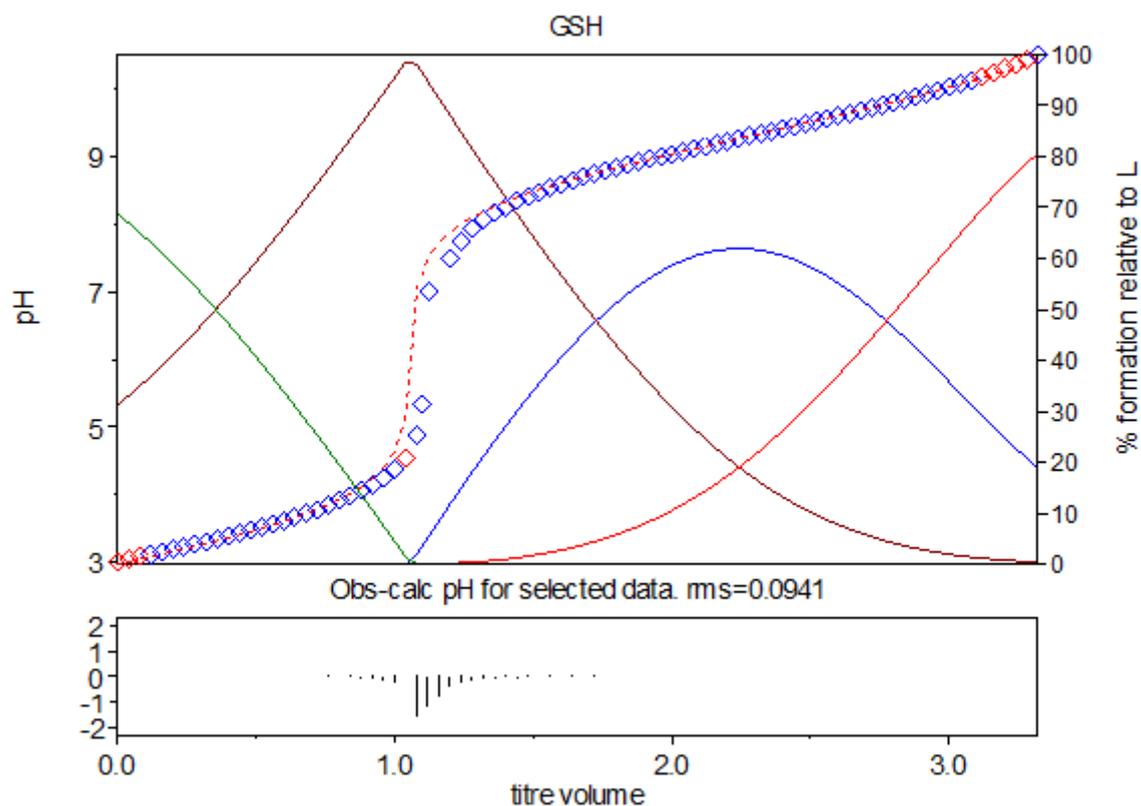
DOCUMENTATION

=====

APÊNDICE D – Gráfico de linearidade para o zinco.**APÊNDICE E – Gráfico de linearidade para o cádmio.**

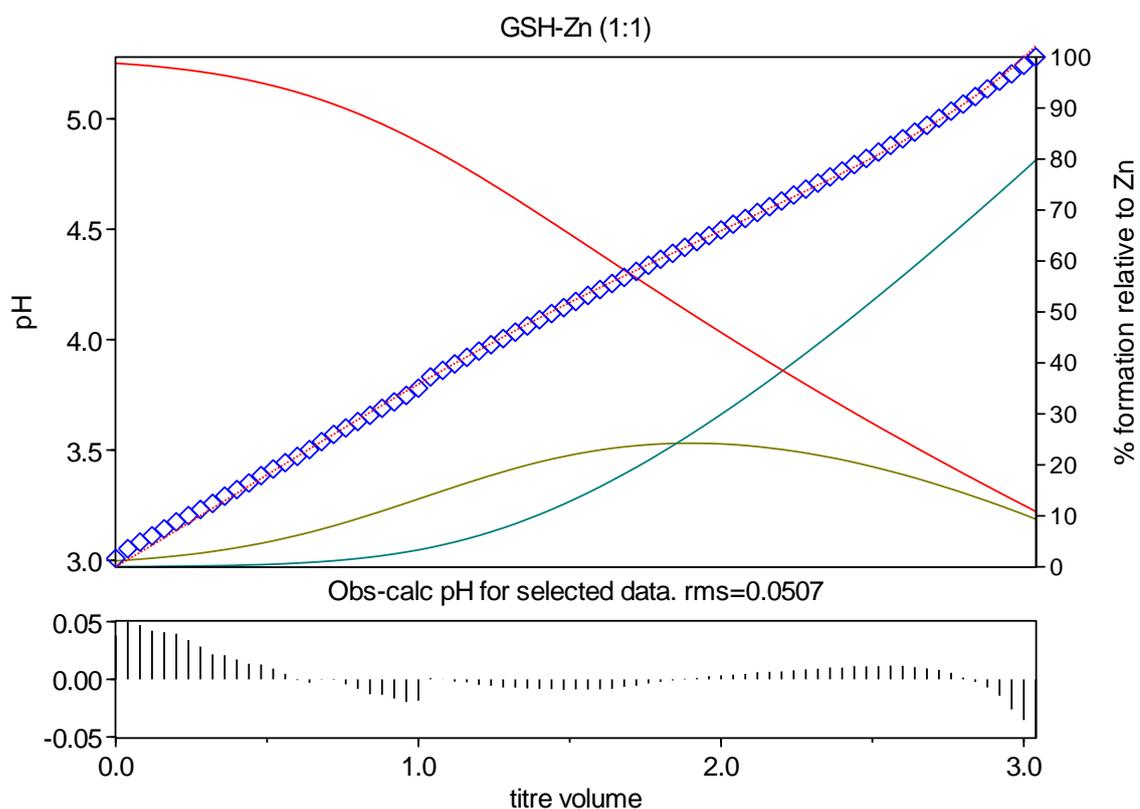
APÊNDICE F – Gráfico de linearidade para a glutatona reduzida

APÊNDICE G – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo das constantes de protonação da glutiona



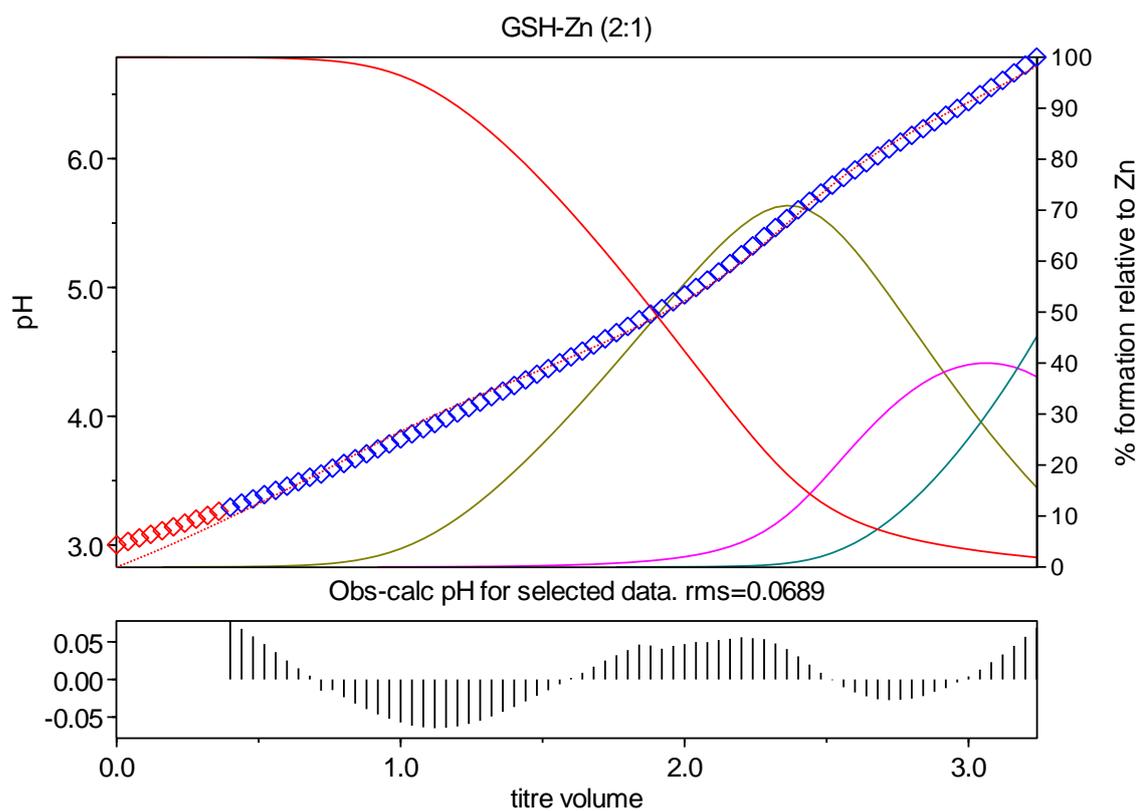
Os losangos azuis são os pontos experimentais e a linha vermelha pontilhada corresponde a curva teórica, obtida pelos valores de pH calculados. Abaixo o diagrama dos resíduos entre as duas curvas e o valor da média quadrática dos resíduos (rms). As demais linhas são uma previsão da distribuição das espécies.

APÊNDICE H – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Zn titulados na proporção 1:1



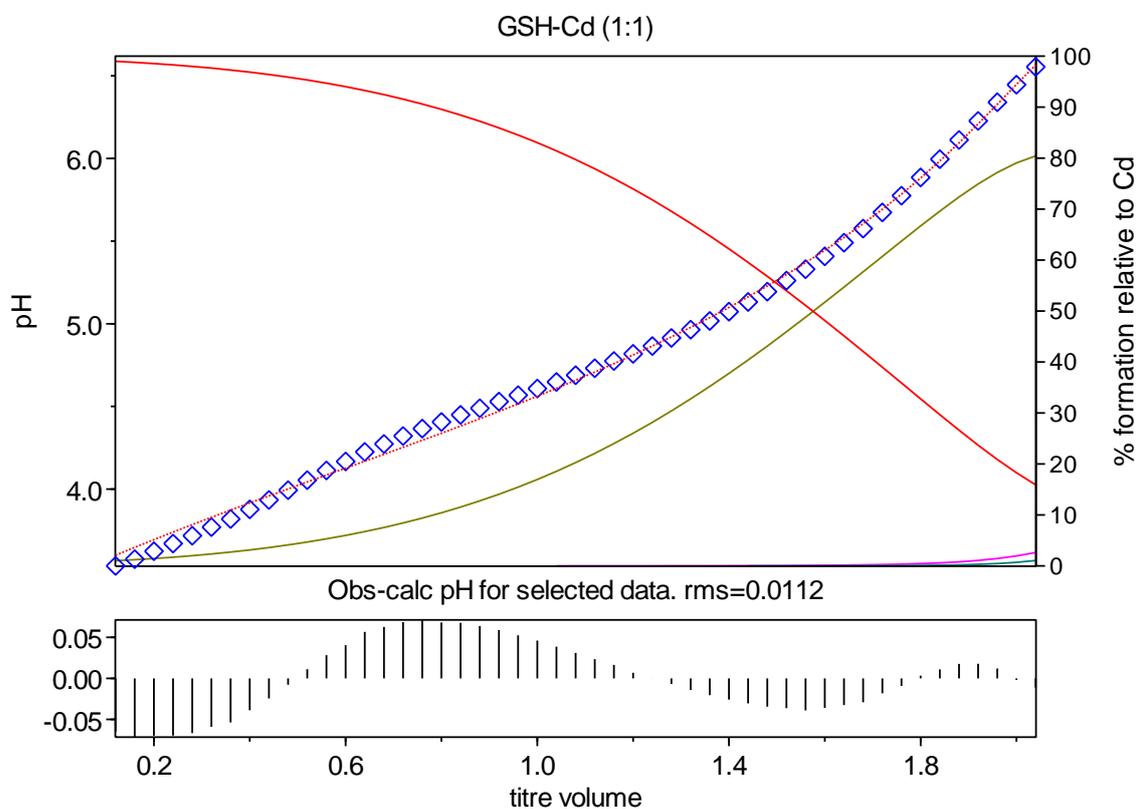
Os losangos azuis são os pontos experimentais e a linha vermelha pontilhada corresponde a curva teórica, obtida pelos valores de pH calculados. Abaixo o diagrama dos resíduos entre as duas curvas e o valor da média quadrática dos resíduos (rms). As demais linhas são uma previsão da distribuição das espécies.

APÊNDICE I – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Zn titulados na proporção 2:1



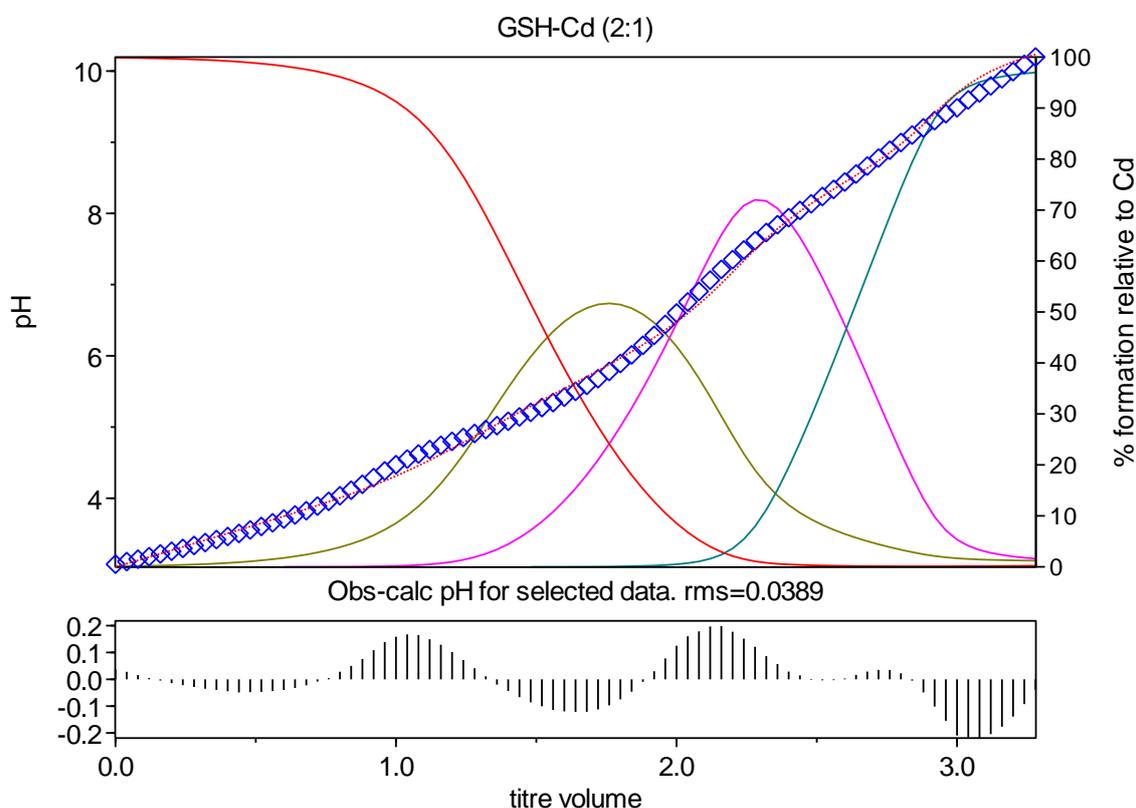
Os losangos azuis são os pontos experimentais e a linha vermelha pontilhada corresponde a curva teórica, obtida pelos valores de pH calculados. Abaixo o diagrama dos resíduos entre as duas curvas e o valor da média quadrática dos resíduos (rms). As demais linhas são uma previsão da distribuição das espécies.

APÊNDICE J – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Cd titulados na proporção 1:1



Os losangos azuis são os pontos experimentais e a linha vermelha pontilhada corresponde a curva teórica, obtida pelos valores de pH calculados. Abaixo o diagrama dos resíduos entre as duas curvas e o valor da média quadrática dos resíduos (rms). As demais linhas são uma previsão da distribuição das espécies.

APÊNDICE K – Janela gráfica utilizada para o ajuste do modelo do sistema GSH-Cd titulados na proporção 2:1



Os losangos azuis são os pontos experimentais e a linha vermelha pontilhada corresponde a curva teórica, obtida pelos valores de pH calculados. Abaixo o diagrama dos resíduos entre as duas curvas e o valor da média quadrática dos resíduos (rms). As demais linhas são uma previsão da distribuição das espécies.

APÊNDICE L – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de protonação da GSH.

- milimoles do ligante: 0,1
- milimoles total de H: 0,3
- Concentração da base: 0,0851 mol/L
- Volume inicial: 20 mL
- Força iônica: 0,1 mol/L (KCl)

1 iteração

sigma = 0.1730

			beta	log beta	desvio padrão
beta	1	1 refinado	5.8473E+009	9.767	0.0093
beta	2	1 refinado	3.2557E+018	18.5126	0.0072
beta	3	1 refinado	7.0643E+021	21.8491	0.0093
beta	-1	0 refinado	1.3413E-014	-13.8725	0.0771

Pontos	V _b	pH	Resíduo
1	0.12	3.118	-0.0238
2	0.16	3.154	-0.0215
3	0.2	3.191	-0.0194
4	0.24	3.229	-0.0175
5	0.28	3.268	-0.0157
6	0.32	3.308	-0.014
7	0.36	3.348	-0.0113
8	0.4	3.39	-0.0095
9	0.44	3.433	-0.0074
10	0.48	3.478	-0.0058
11	0.52	3.523	-0.0025
12	0.56	3.571	-0.0001

13	0.6	3.62	0.0037
14	0.64	3.671	0.0085
15	0.68	3.726	0.0129
16	0.72	3.782	0.0208
17	0.76	3.843	0.0295
18	0.8	3.909	0.0408
19	0.84	3.98	0.0573
20	0.88	4.058	0.0814
21	0.92	4.147	0.1168
22	0.96	4.249	0.1771
23	1	4.371	0.2966
24	1.24	7.752	0.2414
25	1.28	7.928	0.1649
26	1.32	8.06	0.1184
27	1.36	8.167	0.0871
28	1.4	8.258	0.0645
29	1.44	8.338	0.0472
30	1.48	8.41	0.0335
31	1.52	8.475	0.0233
32	1.56	8.535	0.0152
33	1.6	8.591	0.0088
34	1.64	8.644	0.0034
35	1.68	8.695	-0.0017
36	1.72	8.743	-0.0051
37	1.76	8.788	-0.0067
38	1.8	8.833	-0.0093
39	1.84	8.876	-0.0107
40	1.88	8.918	-0.0118
41	1.92	8.96	-0.0134
42	1.96	8.999	-0.0126
43	2	9.039	-0.0132
44	2.04	9.077	-0.0121
45	2.08	9.115	-0.0113
46	2.12	9.153	-0.0107
47	2.16	9.19	-0.0092
48	2.2	9.228	-0.0089
49	2.24	9.265	-0.0077
50	2.28	9.301	-0.0055
51	2.32	9.338	-0.0044
52	2.36	9.375	-0.0032
53	2.4	9.412	-0.0019
54	2.44	9.449	-0.0006
55	2.48	9.486	0.0009
56	2.52	9.524	0.0017
57	2.56	9.561	0.0036

58	2.6	9.6	0.004
59	2.64	9.638	0.0056
60	2.68	9.678	0.0058
61	2.72	9.718	0.0065
62	2.76	9.759	0.0068
63	2.8	9.801	0.0069
64	2.84	9.843	0.0078
65	2.88	9.887	0.0078
66	2.92	9.932	0.0078
67	2.96	9.978	0.0081
68	3	10.028	0.0058
69	3.04	10.078	0.0051
70	3.08	10.13	0.004
71	3.32	10.507	-0.0296

APÊNDICE M – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Zn^{2+} e GSH (titulação 1:1).

- milimoles do ligante: 0,1
- milimoles total de H: 0,3
- milimoles total de Zn: 0,1
- Concentração da base: 0,0851 mol/L
- Volume inicial: 20,8 mL
- Força iônica: 0,1 mol/L (KCl)

2 iterações

sigma = 0.21787

				beta	log beta	desvio padrão	
beta	0	1	1	constante	5.85E+09	9.767	
beta	0	1	2	constante	3.26E+18	18.5126	
beta	0	1	3	constante	7.06E+21	21.8491	
beta	0	0	-1	constante	2.04E-14	-13.6903	
beta	1	1	1	refinado	2.9502E+016	16.4699	0.012
beta	1	1	0	refinado	1.1577E+012	12.0636	0.005

Pontos	V_b	pH	Resíduo
1	0	3.009	-0.0383
2	0.04	3.053	-0.0501
3	0.08	3.083	-0.0474
4	0.12	3.111	-0.0425
5	0.16	3.143	-0.0414
6	0.2	3.175	-0.04
7	0.24	3.203	-0.0345
8	0.28	3.231	-0.029
9	0.32	3.258	-0.0224
10	0.36	3.291	-0.0217
11	0.4	3.321	-0.018
12	0.44	3.351	-0.0144

13	0.48	3.384	-0.0138
14	0.52	3.414	-0.0103
15	0.56	3.443	-0.0058
16	0.6	3.471	-0.0004
17	0.64	3.502	0.0019
18	0.68	3.538	-0.0009
19	0.72	3.571	-0.0009
20	0.76	3.6	0.003
21	0.8	3.629	0.0068
22	0.84	3.657	0.0114
23	0.88	3.689	0.0119
24	0.92	3.718	0.0151
25	0.96	3.747	0.0181
26	1	3.78	0.0168
27	1.04	3.831	-0.0027
28	1.08	3.861	-0.0015
29	1.12	3.89	0.0004
30	1.16	3.92	0.001
31	1.2	3.948	0.0032
32	1.24	3.977	0.0041
33	1.28	4.005	0.0057
34	1.32	4.034	0.0058
35	1.36	4.062	0.0067
36	1.4	4.09	0.0072
37	1.44	4.118	0.0073
38	1.48	4.145	0.0082
39	1.52	4.173	0.0077
40	1.56	4.2	0.0079
41	1.6	4.227	0.0078
42	1.64	4.254	0.0075
43	1.68	4.282	0.0059
44	1.72	4.309	0.0051
45	1.76	4.337	0.0031
46	1.8	4.364	0.0019
47	1.84	4.391	0.0006
48	1.88	4.418	-0.0008
49	1.92	4.444	-0.0013
50	1.96	4.471	-0.0028
51	2	4.497	-0.0034
52	2.04	4.523	-0.004
53	2.08	4.549	-0.0045
54	2.12	4.576	-0.0059
55	2.16	4.602	-0.0063
56	2.2	4.628	-0.0064
57	2.24	4.655	-0.0074

58	2.28	4.682	-0.0081
59	2.32	4.709	-0.0086
60	2.36	4.737	-0.0097
61	2.4	4.764	-0.0094
62	2.44	4.793	-0.0107
63	2.48	4.821	-0.0104
64	2.52	4.85	-0.0105
65	2.56	4.88	-0.011
66	2.6	4.91	-0.0107
67	2.64	4.94	-0.0095
68	2.68	4.971	-0.0083
69	2.72	5.003	-0.007
70	2.76	5.035	-0.0044
71	2.8	5.067	-0.0003
72	2.84	5.101	0.0035
73	2.88	5.136	0.0084
74	2.92	5.171	0.0156
75	2.96	5.204	0.0276
76	3	5.243	0.0369
77	3.04	5.28	0.0523

APÊNDICE N – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Zn^{2+} e GSH (titulação 1:2).

- milimoles do ligante: 0,1
- milimoles total de H: 0,3
- milimoles total de Zn: 0,05
- Concentração da base: 0,0851 mol/L
- Volume inicial: 20,54 mL
- Força iônica: 0,1 mol/L (KCl)

5 iterações

sigma = 0.37341

				beta	log beta	desvio padrão	
beta	0	1	1	constante	5.85E+09	9.767	
beta	0	1	2	constante	3.26E+18	18.5126	
beta	0	1	3	constante	1.07E+22	22.0276	
beta	0	0	-1	constante	1.34E-14	-13.8725	
beta	1	2	2	refinado	6.9024E+032	32.839	0.0239
beta	1	2	1	refinado	3.3696E+026	26.5276	0.0443
beta	1	2	0	refinado	6.8116E+019	19.8332	0.0421

Pontos	V_b	pH	Resíduo
1	0.4	3.293	-0.0777
2	0.44	3.325	-0.0672
3	0.48	3.358	-0.0573
4	0.52	3.391	-0.047
5	0.56	3.424	-0.0363
6	0.6	3.457	-0.0252
7	0.64	3.491	-0.0148
8	0.68	3.526	-0.0051
9	0.72	3.551	0.015
10	0.76	3.597	0.0143
11	0.8	3.633	0.0237
12	0.84	3.67	0.0322
13	0.88	3.708	0.0397
14	0.92	3.746	0.0468

15	0.96	3.785	0.0525
16	1	3.824	0.0576
17	1.04	3.863	0.0618
18	1.08	3.903	0.0641
19	1.12	3.943	0.0655
20	1.16	3.984	0.0648
21	1.2	4.025	0.0632
22	1.24	4.067	0.0598
23	1.28	4.109	0.0557
24	1.32	4.152	0.0501
25	1.36	4.195	0.044
26	1.4	4.238	0.0376
27	1.44	4.282	0.0301
28	1.48	4.326	0.0227
29	1.52	4.37	0.0154
30	1.56	4.415	0.0074
31	1.6	4.461	-0.0011
32	1.64	4.506	-0.008
33	1.68	4.553	-0.0161
34	1.72	4.601	-0.0243
35	1.76	4.649	-0.0314
36	1.8	4.698	-0.0383
37	1.84	4.749	-0.0457
38	1.88	4.793	-0.0445
39	1.92	4.836	-0.0404
40	1.96	4.889	-0.0443
41	2	4.943	-0.0469
42	2.04	5	-0.0499
43	2.08	5.057	-0.0502
44	2.12	5.12	-0.0535
45	2.16	5.185	-0.0555
46	2.2	5.254	-0.0583
47	2.24	5.323	-0.0579
48	2.28	5.395	-0.0575
49	2.32	5.465	-0.0526
50	2.36	5.535	-0.0461
51	2.4	5.603	-0.0371
52	2.44	5.669	-0.0267
53	2.48	5.733	-0.016
54	2.52	5.795	-0.0059
55	2.56	5.854	0.0041
56	2.6	5.912	0.0118
57	2.64	5.968	0.0182
58	2.68	6.022	0.0236
59	2.72	6.076	0.0261

60	2.76	6.129	0.0273
61	2.8	6.181	0.0274
62	2.84	6.233	0.0257
63	2.88	6.286	0.0217
64	2.92	6.337	0.0187
65	2.96	6.39	0.0129
66	3	6.443	0.0068
67	3.04	6.497	-0.0005
68	3.08	6.552	-0.0085
69	3.12	6.608	-0.0169
70	3.16	6.666	-0.0264
71	3.2	6.726	-0.0365
72	3.24	6.788	-0.0467

APÊNDICE O – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Cd^{2+} e GSH (titulação 1:1).

- milimoles do ligante: 0,1
- milimoles total de H: 0,3
- milimoles total de Zn: 0,1
- Concentração da base: 0,0851 mol/L
- Volume inicial: 20 mL
- Força iônica: 0,1 mol/L (KCl)

1 iterations

sigma = 8.62730

				beta	log beta	desvio padrão	
beta	0	1	1	constante	5.89E+09	9.77	
beta	0	1	2	constante	3.61E+18	18.5573	
beta	0	1	3	constante	3.35E+22	22.5252	
beta	0	0	-1	constante	2.04E-14	-13.6903	
beta	1	1	1	refinado	9.1593E+015	15.9619	0.012
beta	1	1	0	refinado	8.0942E+007	7.9082	0.1422
beta	1	0	-2	constante	4.90E-15	-14.31	

Pontos	V_b	pH	Resíduo
1	0.12	3.535	0.0648
2	0.16	3.576	0.0713
3	0.2	3.624	0.0699
4	0.24	3.67	0.0697
5	0.28	3.718	0.0668
6	0.32	3.77	0.0591
7	0.36	3.819	0.0537
8	0.4	3.877	0.0389
9	0.44	3.934	0.0245
10	0.48	3.993	0.0078
11	0.52	4.054	-0.0112
12	0.56	4.113	-0.0283
13	0.6	4.167	-0.0405

14	0.64	4.225	-0.0567
15	0.68	4.273	-0.0627
16	0.72	4.321	-0.0686
17	0.76	4.366	-0.0711
18	0.8	4.406	-0.0682
19	0.84	4.449	-0.0677
20	0.88	4.489	-0.0637
21	0.92	4.529	-0.059
22	0.96	4.568	-0.0525
23	1	4.608	-0.046
24	1.04	4.648	-0.0386
25	1.08	4.689	-0.0311
26	1.12	4.731	-0.0234
27	1.16	4.775	-0.0163
28	1.2	4.818	-0.0069
29	1.24	4.865	0.0001
30	1.28	4.914	0.0067
31	1.32	4.964	0.0142
32	1.36	5.017	0.0205
33	1.4	5.073	0.0259
34	1.44	5.132	0.0305
35	1.48	5.194	0.0346
36	1.52	5.261	0.0364
37	1.56	5.33	0.0391
38	1.6	5.408	0.0361
39	1.64	5.49	0.0326
40	1.68	5.576	0.0292
41	1.72	5.674	0.0182
42	1.76	5.775	0.0093
43	1.8	5.885	-0.0033
44	1.84	5.996	-0.0109
45	1.88	6.112	-0.0176
46	1.92	6.227	-0.0178
47	1.96	6.34	-0.012
48	2	6.446	0.0019
49	2.04	6.554	0.0112

APÊNDICE P – Dados da titulação potenciométrica utilizados para determinar as constantes de estabilidade entre Cd^{2+} e GSH (titulação 1:2).

- milimoles do ligante: 0,1
- milimoles total de H: 0,3
- milimoles total de Zn: 0,05
- Concentração da base: 0,0851 mol/L
- Volume inicial: 20 mL
- Força iônica: 0,1 mol/L (KCl)

1 iteração

sigma = 0.45620

				beta	log beta	desvio padrão	
beta	0	1	1	constante	6.07E+09	9.7832	
beta	0	1	2	constante	3.30E+18	18.5189	
beta	0	1	3	constante	1.61E+22	22.2066	
beta	0	0	-1	constante	7.52E-14	-13.124	
beta	1	1	1	refinado	4.1065E+015	15.6135	0.0404
beta	1	2	2	refinado	3.6739E+030	30.5651	0.0549
beta	1	2	1	refinado	1.2979E+022	22.1132	0.0572

Pontos	V_b	pH	Resíduo
1	0	3.074	-0.0372
2	0.04	3.11	-0.0281
3	0.08	3.144	-0.0161
4	0.12	3.18	-0.0054
5	0.16	3.217	0.0048
6	0.2	3.255	0.0142
7	0.24	3.295	0.0218
8	0.28	3.336	0.0285
9	0.32	3.377	0.0351
10	0.36	3.42	0.0397
11	0.4	3.463	0.0443
12	0.44	3.506	0.0489
13	0.48	3.555	0.0477

14	0.52	3.604	0.0466
15	0.56	3.655	0.0439
16	0.6	3.708	0.0396
17	0.64	3.765	0.0321
18	0.68	3.825	0.0224
19	0.72	3.89	0.0088
20	0.76	3.956	-0.0045
21	0.8	4.034	-0.0282
22	0.84	4.112	-0.05
23	0.88	4.196	-0.0756
24	0.92	4.29	-0.1087
25	0.96	4.384	-0.1389
26	1	4.471	-0.1589
27	1.04	4.55	-0.1675
28	1.08	4.621	-0.1646
29	1.12	4.683	-0.1492
30	1.16	4.743	-0.1287
31	1.2	4.799	-0.1016
32	1.24	4.854	-0.0718
33	1.28	4.909	-0.041
34	1.32	4.965	-0.011
35	1.36	5.02	0.0196
36	1.4	5.081	0.0435
37	1.44	5.142	0.0666
38	1.48	5.206	0.0859
39	1.52	5.274	0.1007
40	1.56	5.343	0.1142
41	1.6	5.42	0.1197
42	1.64	5.501	0.1216
43	1.68	5.585	0.1214
44	1.72	5.679	0.1125
45	1.76	5.781	0.0974
46	1.8	5.893	0.0747
47	1.84	6.014	0.0461
48	1.88	6.147	0.0092
49	1.92	6.287	-0.0302
50	1.96	6.441	-0.078
51	2	6.601	-0.1252
52	2.04	6.757	-0.1605
53	2.08	6.905	-0.1788
54	2.12	7.063	-0.1971
55	2.16	7.214	-0.1984
56	2.2	7.351	-0.1774
57	2.24	7.487	-0.1516
58	2.28	7.616	-0.1214

59	2.32	7.732	-0.0868
60	2.36	7.841	-0.057
61	2.4	7.94	-0.0289
62	2.44	8.043	-0.0149
63	2.48	8.135	0.0022
64	2.52	8.237	0.0036
65	2.56	8.337	0.0033
66	2.6	8.442	-0.0036
67	2.64	8.553	-0.0163
68	2.68	8.666	-0.0289
69	2.72	8.777	-0.0353
70	2.76	8.888	-0.0351
71	2.8	8.996	-0.0225
72	2.84	9.101	0.0048
73	2.88	9.202	0.0489
74	2.92	9.303	0.1013
75	2.96	9.401	0.1544
76	3	9.483	0.2095
77	3.04	9.594	0.2164
78	3.08	9.692	0.218
79	3.12	9.79	0.2044
80	3.16	9.89	0.1769
81	3.2	9.991	0.1389
82	3.24	10.093	0.0924
83	3.28	10.196	0.0389