

3 Experimental

3.1 Reagentes

- Álcool etílico P.A. (Vetec)
- Hidróxido de potássio em pó P.A. (Merck)
- Ácido clorídrico fumegante 37% P.A. (Merck)
- Ácido nítrico 65% P.A. (Merck)
- Hidróxido de sódio P.A. (Merck)
- Solução padrão de hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹ (Merck)
- Solução padrão de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (Merck)
- Solução padrão tampão 3,0 (Merck)
- Solução padrão tampão 7,0 (Merck)
- Solução padrão de ácido etilenodiaminotetraacético Titriplex III 0,1 mol L⁻¹ (Merck)
- Biftalato de Potássio (Merck)
- Indicador negro de solocromo (Merck)
- Cloreto de amônio P.A. (Merck)
- Hidróxido de amônio P.A. (Merck)
- Carbonato de cálcio P.A. (Merck)
- Nitrato de alumínio nonahidratado P.A. (Merck)
- Nitrato de Potássio P.A. (Merck)
- Adenosina 5'-Trifosfato dissódico P.A. (Sigma-Aldrich)
- Fosfocreatina P.A. (Sigma-Aldrich)
- Metionina (Reagen)
- Cisteína (Sigma-Aldrich)
- Homocisteína (Sigma-Aldrich)
- Penicilamina (Acros Organics)

3.2 Equipamentos

- Balança analítica modelo FA 2104N (Bioprecisa)
- Aparelho de ultrassom com aquecimento UltraClean modelo 1400A (Unique Ultrasonic)
- pHmêtro modelo B375 (Micronal)

- Bureta semiautomática modelo E485 (Metrohm)
- Aparelho de titulação potenciométrica modelo 809 (Metrohm)
- Agitador magnético modelo 801 (Metrohm)
- Sistema dosador modelo 800 Dosino (Metrohm)
- Agitador magnético modelo E649 (Metrohm)
- Eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl (Metrohm)
- Banho termostaticante acoplado à célula de titulação (Haake FK)
- Espectrômetro Raman modelo 400 (Perkin Elmer) com laser diodo estabilizado de alta desempenho em 785 nm (IR-Próximo 785 nm) com intensidade do sinal-ruído > 40 dB e estabilidade de 0,1 nm
- Cubetas de quartzo de 4,0 mL com 1 cm de caminho ótico (Perkin Elmer)
- Computador Quad Core 2 (Intel), 2,66GHz, 8,0 GB RAM, Windows XP e Windows Vista Ultimate 64 bits.
- Computador i7-960 (Intel), 3,20 GHz, 16,0 GB RAM, Linux.

3.3 Titulação potenciométrica

Na titulação potenciométrica acompanha-se a variação da concentração de um íon envolvido na reação por meio do uso de um eletrodo indicador adequado. A escolha desse eletrodo depende da natureza de cada reação (Oehlweiler, 1974).

Essa técnica baseia-se em medir a força eletromotriz (f.e.m.) da célula galvânica durante a titulação (conforme se adiciona uma solução padrão). A f.e.m. não precisa necessariamente fornecer medidas absolutas, apenas é preciso que o potencial do eletrodo de referência permaneça constante durante a titulação (Oehlweiler, 1974 e Vogel, 1992). O potencial do eletrodo indicador varia abruptamente na proximidade do ponto de equivalência e, assim, também a f.e.m. da célula (Martell e Motekaitis, 1992).

A titulação potenciométrica é capaz de gerar dados experimentais de alta confiabilidade e permite o cálculo preciso de constantes de equilíbrio (Martell e Motekaitis, 1992). Antigamente, essa titulação era considerada uma das mais demoradas. Atualmente, contudo, com o uso dos tituladores automáticos, o processo tornou-se mais rápido e preciso, ao diminuir consideravelmente a influência do erro do analista durante a titulação.

A titulação potenciométrica se comparada às demais titulações possui como principal vantagem a grande sensibilidade, que permite a sua utilização mesmo

em soluções extremamente diluídas. Além disso, não é susceptível a alterações colorimétricas (Ohlweiler, 1974 e Vogel, 1992).

3.3.1 Metodologia da titulação potenciométrica

Neste trabalho foram realizadas titulações potenciométricas para:

- Ligantes livres;
- Sistemas ternários.

Antes da realização de qualquer experimento, as vidrarias foram limpas com água e detergente para evitar possíveis contaminações e erros experimentais.

Vidrarias, como balões volumétricos, foram imersas em potassa alcoólica por no máximo 10 minutos e lavadas com água corrente. Posteriormente, a fim de neutralizar eventuais resíduos alcalinos, foi empregada uma solução diluída de HCl 1:20 v/v. O último enxágue usou água destilada e deionizada.

Pipetas foram imersas em solução NaOH 50% p/p até total eliminação de resíduos. Embora, com o passar do tempo, reagentes alcalinos possam descalibrar os materiais volumétricos, usou-se a solução NaOH pela possibilidade de haver contaminação com resíduos de derivados do petróleo. Após a imersão, lavou-se com água corrente. No último enxágue, empregou-se água destilada e deionizada. A secagem das vidrarias ocorreu em estufa a aproximadamente 30°C.

Todas as titulações foram realizadas no mesmo dia do preparo das soluções com água ultrapura e livre de CO₂ (obtida por aquecimento). O intuito do preparo das soluções no mesmo dia em que se executaram as titulações foi evitar alterações nas concentrações e eventuais reações de hidrólise. Conservaram-se constantes a temperatura, a agitação e a força iônica. A temperatura foi mantida a 25,0°C a partir da utilização de um equipamento de banho termostatizado, a agitação mantida constante e branda pelo agitador magnético e a força iônica mantida a 0,1 mol L⁻¹ por meio do eletrólito suporte KNO₃, que não interfere na titulação devido às características de seus íons, evitando-se a competição com os ligantes e o metal.

As concentrações das soluções de alumínio(III) foram obtidas por titulação contra uma solução padronizada de EDTA 0,1 mol L⁻¹ com uso do indicador negro de solocromo e do tampão solução de amônia (Ohlweiler, 1974 e Vogel, 1992). A pureza dos ligantes foi verificada pela determinação das concentrações

exatas das soluções pelo método de Gran (Gran, 1950). Esse método considera o ponto de equivalência da curva potenciométrica.

Em algumas soluções, como a de nitrato de potássio, foi empregado o aparelho de ultrassom para obtenção de uma solução límpida e sem a presença de precipitado.

As titulações foram realizadas a partir de adições sucessivas de incrementos de 0,1 mL de solução padrão de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a um volume inicial de 120,00 mL de mistura. Ao se considerar a necessidade de igualdade entre o número de mols de íon metálico e o número de mols do ligante, as titulações procederam-se das seguintes formas:

a) Ligantes

As titulações de padronização dos ligantes foram realizadas com o volume total inicial de 120,00 mL ou 121,00 mL, dependendo da necessidade de acidificação (adição de 1 mL de ácido) à solução do ligante. A adição do HCl foi necessária pela ausência de inflexão na curva de titulação e elevado valor de pH inicial da titulação de todos os ligantes, com exceção do ATP.

Titulou-se 50,00 mL do ligante $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 60,00 mL de H₂O ultrapura e livre de CO₂, 10,00 mL de KNO₃ $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,00 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ padronizado.

b) Sistemas ternários (proporção inicial metal:ligante:ligante de 1:1:1)

Titulou-se 50,00 mL do ligante_A $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 50,00 mL do ligante_B $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 10,00 mL de KNO₃ $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ e 10,00 mL de íon metálico $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, sendo o ligante_A algum dos aminoácidos sulfurados e o ligante_B algum dos ligantes fosfatados.

Alguns estudos recorrem à adição de uma quantidade conhecida de HCl padronizado nos sistemas em que o alumínio é o íon metálico, com o objetivo de evitar sua hidrólise, que é intensa e rápida mesmo em valores de pH baixos. Porém, nesse trabalho, as titulações realizadas sem a adição de ácido apresentaram dados mais concordantes com os da curva de validação e constantes calculadas com desvios menores.

O titulador automático foi escolhido para pôr em prática às análises, após investigações de sua adequação e dos parâmetros de titulação para o equipamento.

Curvas de titulações de sistemas com o íon alumínio de um titulador semiautomático e de um automático com tempos de incrementos distintos foram comparadas. O intervalo de incremento de base foi de 12 segundos e a titulação iniciada imediatamente após a adição da solução de íon metálico à mistura a ser titulada.

As condições usadas para as titulações potenciométricas desta tese foram semelhantes às condições das titulações potenciométricas empregadas no estudo de sistemas binários de Al^{3+} (Alves, 2010).

3.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Descoberta por Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, a espectroscopia Raman é um tipo de espectroscopia vibracional que fornece bom detalhamento dos níveis de energia vibracionais e apresenta bandas bem definidas. Avalia, especialmente, as ligações covalentes e possui qualidades como a possibilidade de obtenção do espectro de substâncias em meio aquoso e a perspectiva de se utilizar recursos especiais, como o efeito Raman ressonante, para aumentar sua sensibilidade (Faria, Santos e Goncalves, 1997).

O efeito Raman, base do entendimento deste tipo de espectroscopia, pode ser observado quando um feixe de luz monocromática incide em um dado material, cujas dimensões são menores que o comprimento de onda da luz incidente, ocorrendo o fenômeno de espalhamento. Quando a maior parte da luz espalhada apresenta o mesmo comprimento de onda da luz incidente, o espalhamento dá-se elasticamente (espalhamento Rayleigh). Porém, uma pequena parcela da luz espalhada apresenta um comprimento de onda diferente daquele da luz incidente e a sua existência constitui o efeito Raman. No caso, o espalhamento dá-se inelasticamente e a energia do fóton emitido difere daquela do absorvido (Koji e Solomon, 1977 e Colthup *et al.*, 1991).

O espalhamento inelástico pode ser um espalhamento Stokes ou anti-Stokes. No Stokes, o espalhamento Raman de um estado vibracional fundamental ocasiona a absorção de energia pela molécula e a promoção a um estado vibracional excitado de mais alta energia. No anti-Stokes, há o espalhamento de um estado excitado (adotado pela molécula, provavelmente, devido à energia

térmica) ao estado fundamental, com transferência de energia ao fóton espalhado (Koji e Solomon, 1977 e Colthup *et al.*, 1991).

No efeito Raman, a transferência de energia depende da existência de níveis vibracionais (ou vibrônicos).

3.4.1 Metodologia da espectroscopia Raman

As análises foram realizadas na temperatura da sala ($25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) em ambiente escurecido nas seguintes condições: 100 mW de potência de laser, 2 cm^{-1} de resolução e 20 segundos de tempo de exposição. Nos sistemas binários foram acumulados 100 varreduras (*scans*) e nos sistemas ternários, 300 varreduras. Os espectros Raman foram obtidos em sólido e em solução para os aminoácidos e os ligantes fosfatados. Uma descrição detalhada dos números de onda dos espectros dos ligantes foi realizada em estudo anterior (Alves, 2010). Os sistemas binários $\text{Al}^{3+}:\text{ATP}$ e $\text{Al}^{3+}:\text{PCr}$ foram investigados em solução aquosa na proporção 1:1. Os sistemas ternários $\text{Al}^{3+}:\text{ATP}:\text{Met}$, $\text{Al}^{3+}:\text{ATP}:\text{Cis}$, $\text{Al}^{3+}:\text{PCr}:\text{Met}$ e $\text{Al}^{3+}:\text{PCr}:\text{Cis}$ foram obtidos na proporção 1:1:1. Os espectros foram obtidos em pH específicos escolhidos de acordo com os estudos de especiação.

Diversos espectros com diferentes resoluções e números de varreduras foram feitos para a escolha dos melhores para a análise. Subsequentemente, o procedimento foi repetido com as condições de análise estabelecidas. A correção da linha de base pela subtração do *background* foi realizada em todos os espectros. Em todos os espectros foi efetuada também a subtração manual das bandas da água e de nitrato.

As soluções foram preparadas na concentração de $0,5\text{ mol L}^{-1}$ pela dissolução do reagente em água ultrapura e livre de CO_2 . No aparelho utilizado para as análises, a sensibilidade é maior do que em equipamentos baseados na transformada de *Fourier*, o que permite o uso de uma concentração mais baixa.

As medidas foram feitas em uma cubeta de quartzo de 4,0 mL. Todos os espectros foram obtidos ao focar o laser diretamente nas amostras de solução aquosa. A faixa espectral analisada foi de 3500 a 100 cm^{-1} .

3.4.2 Métodos de caracterização das bandas nos espectros Raman

Bandas sobrepostas e ruídos são esperados no espectro vibracional. Por isso, na caracterização das bandas, usou-se a análise de deconvolução, o ajuste não

linear por mínimos-quadrados e o cálculo da segunda derivada de algumas regiões do espectro com o intuito de facilitar a visualização dos picos experimentais.

Muitas vezes, o ajuste não linear por mínimos-quadrados é inadvertidamente também chamado de deconvolução. De modo que esse termo é frequentemente usado com dois significados distintos, no sentido de serem dois tratamentos matemáticos diferentes (Mysen *et al.*, 1982 e Wang, Allred e Knight, 1995).

Estritamente falando, uma deconvolução seria o inverso de uma convolução. Na detecção (transdução) de um sinal por um aparelho, é impossível impedir completamente que o próprio instrumento interfira no sinal que se deseja observar. Dessa maneira, o sinal obtido é sempre uma convolução entre o sinal físico real e a uma função de alargamento (*spread*) inerente ao equipamento de medição. Se a função de alargamento do aparelho fosse conhecida, seria possível recuperar o sinal real a partir do sinal obtido pelo processo matemático de deconvolução. Entretanto, no mundo real, a função de alargamento do aparelho deve ser estimada da melhor forma possível. Por isso, há vários métodos numéricos e estatísticos de deconvolução, mais ou menos adequados a cada situação.

No caso particular de uma medição de um espectro Raman, a deconvolução do espectro é usada para ampliar a resolução do sinal espectral detectado e revelar picos de espalhamento, que de outra forma aparecem superpostos e indistintos devido ao *spread* inerente ao aparelho.

Na deconvolução propriamente dita, o processo pressupõe que o espectro real seja desconhecido, mas a função de alargamento seja conhecida (pelo menos aproximadamente). No aparelho empregado, o software de aquisição de dados, fornecido pelo fabricante do espectrômetro, oferecia a opção de deconvoluir o espectro obtido experimentalmente, porque, supostamente, conheceria a função de alargamento do aparelho. Tal análise de deconvolução foi efetuada.

O termo deconvolução, contudo, é usado também para denotar outro tipo de tratamento de dados espectrais. Nesse segundo caso, é chamado, mais prolixamente, de análise de banda por deconvolução (*band deconvolution analysis*), porque é mais aplicado à análise de picos individuais no espectro obtido experimentalmente (Mysen *et al.*, 1982).

Nesse caso, pressupõe-se que a forma dos picos do espectro real seja conhecida, mas a função de alargamento seja desconhecida. A análise visa, então, obter a melhor forma de representar o pico experimental como uma superposição de picos gaussianos. Para esse fim, usou-se o método de ajuste de curvas não linear e iterativo por mínimos-quadrados.

A segunda derivada também foi empregada na caracterização dos picos. No geral, a amplitude da segunda derivada de um pico é inversamente proporcional ao quadrado de sua largura. Esse comportamento é útil para detectar a superposição de um pico estreito com um pico mais largo e mais forte.

A derivação, no entanto, tende a amplificar os ruídos, por isso essa técnica precisa ser associada à aplicação de filtros de suavização. Via de regra para a segunda derivada recomenda-se a aplicação de uma suavização retangular três vezes ou de uma suavização triangular duas vezes. A razão de suavização para sinais obtidos por diferenciação tipicamente deve ter valores de 0,5 a 1,0.