Universidade de São Paulo
Instituto de Química

“Caracterização ácido-base de
polieletrólitos e suspensões coloidais
de ocorrência em sistemas aquáticos”

Elizabete Campos de Lima
Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof Dr. Jorge César Masini

São Paulo

1999

**“Caracterização Ácido-base de
Polieletrólitos e Suspensões Coloidais de
Ocorrência em Sistemas Aquáticos”.**

ELIZABETE CAMPOS DE LIMA

**Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área:
Química Analítica.**

Aprovada por:

Prof. Dr. JORGE CÉSAR MASINI
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. JAIM LICHTIG
IQ - USP

Profa. Dra. MARIA OLÍMPIA DE OLIVEIRA REZENDE
IQSC - USP

SÃO PAULO
11 DE MARÇO DE 1999.

*“Há três coisas na vida que não voltam
atrás: a flecha lançada, a palavra
pronunciada e a oportunidade perdida”*

Provérbio chinês

Agradecimentos

- ✓ *A Deus em primeiro lugar.*
- ✓ *Aos meus pais por terem desde de cedo me incentivado a estudar.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. Jorge César Masini pela orientação na realização deste trabalho.*
- ✓ *A Profa. Dra. Regina Helena Porto Francisco, do Instituto de Química de São Carlos, pela amizade e incentivos sempre presentes.*
- ✓ *A Profa. Dra. Maria Olímpia Rezende pela iniciação à pesquisa.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes por ter cedido material informativo à respeito da microalga Spirulina*
- ✓ *A FAPESP pela bolsa de estudos concedida (Processo 10898-7/96)*
- ✓ *Em especial ao Clóvis Lúcio da Silva pelo companheirismo, amizade, amor e paciência sempre presentes.*
- ✓ *A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.*

Índice Geral

Resumo	i
Abstract	iii
Índice de figuras	v
Índice de Tabelas	x
1 - Introdução	1
1.1 - Aspectos gerais sobre sistemas de polieletrólitos	1
1.2 - Considerações sobre os polieletrólitos estudados	3
1.2.1 - Ácido húmico (HA)	3
1.2.2 - Microalga Spirulina	10
1.2.3 - Ácido Algínico	12
1.2.4 - Ácido poliacrílico	13
1.3 - Modelos para interpretação das curvas de titulação para a caracterização ácido-base de polieletrólitos e suspensões coloidais de ocorrência em sistemas aquáticos	14
2 - Objetivos	20
3 - Materiais e métodos	21
3.1 - Reagentes e soluções	21
3.2 - Instrumentação analítica	22
3.3 - Preparo das amostras de polieletrólitos utilizados	24
3.3.1 - Amostras de ácido húmico	24
3.3.2 - Microalga Spirulina	25
3.3.3 - Ácido algínico	25

3.3.4 - Ácido poliacrílico (APA)	25
3.4 - As curvas de titulação e o tratamento de dados	27
3.4.1 - Tratamento dos dados obtidos em titulação potenciométrica para a caracterização ácido-base dos polieletrólitos estudados	27
3.4.2 - Método de calibração dos eletrodos para medida de concentração íons H^+	28
3.4.3 - Método das Funções de Gran Modificadas	35
3.4.4- Método de Regressão Não-Linear	37
3.4.5 - Limitações dos métodos de cálculo empregados quanto ao número de classes de grupos tituláveis a ser determinado	40
3.4.6 - Procedimento experimental utilizado para a realização das titulações potenciométricas das amostras de polieletrólitos estudadas	41
4 - Resultados e discussões	42
4.1 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base do ácido húmico Aldrich e extraído de vermicomposto (Humus de minhoca)	42
4.1.1 - Discussão dos resultados obtidos para o ácido húmico Aldrich	59
4.1.2 - Discussão dos resultados obtidos para o ácido húmico extraído de vermicomposto (Humus de minhoca)	61
4.2 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base da microalga <i>Spirulina</i>	64
4.2.1 - Análise elementar e absorção no infravermelho	66
4.2.2 - Titulação potenciométrica	67
4.2.3 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base da microalga <i>Spirulina</i>	72

4.3 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base para o ácido Algínico	79
4.3.1 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base para o ácido Algínico	85
4.4 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-se para as amostras de ácido poliacrílico (APA) de massa molar (Mw) de 2000 e 250000 g/mol	87
4.4.1 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-se para a amostras de ácido poliacrílico (APA) de massa molar (Mw) = 2000 g/mol	87
4.4.2 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base para o APA com Mw= 2000 g/mol	94
4.4.3 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-se para as amostras de ácido poliacrílico (APA) de massa molar (Mw) = 250000 g/mol	95
4.4.5 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base via titulação potenciométrica para o APA com Mw= 250000 g/mol	102
4.4.5 - Avaliação dos resultados em função do peso molecular das amostras de ácidos poliacrílicos estudadas	102
5 - Conclusões	104
6 – Perspectivas Futuras	105
7 - Bibliografia	106
Anexo 1	112
Anexo 2	113

Resumo

“Caracterização ácido-base de polieletrólitos e suspensões coloidais de interesse ambiental”

Foram estudadas as propriedades ácido-base de alguns polieletrólitos de interesse ambiental; no sentido de se avaliar a adequabilidade do modelo de sítios discretos na determinação e caracterização dos grupos ionizáveis presentes nestas macromoléculas. Estudou-se os seguintes sistemas de polieletrólitos: ácido húmico comercial (Aldrich) e extraído de vermicomposto (Humus de minhoca); microalga *Spirulina* (cianobactéria), ácido algínico e ácido poliacrílico de massas molares 2000 e 250000g/mol.

Foram realizadas titulações potenciométricas alcalimétricas em diferentes meios iônicos à 25°C com os compostos acima citados. Os dados obtidos foram tratados por linearização (Funções de Gran Modificadas) e regressão não-linear.

Os resultados obtidos pelo ácido húmico extraído de vermicomposto (humus de minhoca) e da microalga *Spirulina* mostraram-se independentes da força iônica; indicando que o modelo de sítios discretos representa adequadamente os dados experimentais. Para as demais amostras, a estequiometria dos grupos determinados mostrou-se independente do meio iônico, porém os valores de pKa foram bastante afetados, devido à forte influência das interações eletrostáticas decorrentes da acumulação de cargas sobre as macromoléculas durante as titulações. Comparativamente os resultados

obtidos tanto por regressão não linear como pelas Funções de Gran modificadas foram similares.

Abstract

“ Acid base characterization of the polyelectrolytes and colloidal suspensions of enviromental interesting ”

Acid base properties of some polyelectrolytes and colloidal suspensions were studied to evaluate the suitability of discrete site distribution model to fit potentiometric data for determination and characterization of ionizable groups presents in these materials. The polyelectrolytes studied were: commercial humic acid from Aldrich, humic acid isolated from vermicompost, mixed species of microalgae *Spirulina*, alginic acid and polyacrylic acid of molar masses 2000 and 250000 g/mol.

Potentiometric titrations were performed in different ionic media to evaluate the effect of eletrostatic interactions on the titration data. Titrations were perfomed at 25°C, and the data were treated by a linear method based on Modified Gran Functions, as well as by a multiparametric Non-Linear Regression method.

The results obtained for the vermicompost humic acid and *Spirulina* were independent of the ionic strength, suggesting that the chemical heterogeneity plays the major role in the acid base properties of these materials. Thus, the discrte site distribution model is well suited to characterize these materials.

For the other polyelectrolytes studied, the influence of eletrostatic interactions was noticed. The discrete site distribution model was able to determine the total stoichiometry of the ionizable groups, but the ionization

constants and the distribution of site concentration were dependent on the ionic strength and molar mass of these polyelectrolyte.

Índice de Figuras

Figura 1 - (a) - Possível estrutura para ácido húmico a partir da lignina	7
Figura 1 - (b) - Estrutura hipotética para o ácido húmico proposta por Flaig mostrando uma grande quantidade de grupos fenólicos e quinonas	8
Figura 1 - (c) - Estrutura para o ácido húmico mostrando grupos fenólicos livres e ligados, estruturas de quinonas, N, O, e diversos grupos ligados a anéis aromáticos	9
Figura 2 - Estrutura do ácido algínico	12
Figura 3 - Estrutura do monômero do ácido poliacrílico	13
Figura 4 - Esquema do processo de extração utilizado para as amostras de ácido húmico estudadas	24
Figura 5 - Aplicação do método de Gran para determinação do volume de equivalência de uma titulação de 21,5 mL de HCl em NaCl 0,10 mol/L com NaOH 0,10 mol/L à 25°C	31
Figura 6 - Determinação dos parâmetros E_0^a e J_H , as condições experimentais para a obtenção destes parâmetros são as mesmas descritas na Figura 5	32
Figura 7 - Determinação dos parâmetros E_0^b e J_{OH} , as condições experimentais para a obtenção destes parâmetros são as mesmas descritas na Figura 5	33

Figura 8 - Curvas de titulação obtidas para o ácido húmico Aldrich. Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão 50,00mL de ácido húmico Aldrich 0,685g/L com 0,10mol/L NaOH nos meios iônicos 0,01(), 0,10() e 1,00(□)mol/L NaCl	51
Figura 9 - Curvas de titulação obtidas para o ácido húmico extraído de vermicomposto (Humus de minhoca). Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão 50,00mL de ácido húmico Aldrich 0,685g/L com 0,10mol/L NaOH nos meios iônicos 0,01(), 0,10() e 1,00(□)mol/L NaCl	51
Figura 10 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich em força iônica 0,01 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas	53
Figura 11 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich em força iônica 0,10 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas	54
Figura 12 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich em força iônica 1,00 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas	55
Figura 13 - Curva de titulação do AH extraído de vermicomposto (Humus de Minhoca) em força iônica 0,01 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas	56

- Figura 14 - Curva de titulação do AH extraído de vermicomposto (Humus de Minhoca) em força iônica 0,10 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas 57
- Figura 15 - Curva de titulação do AH extraído de vermicomposto (Humus de Minhoca) em força iônica 1,00 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas 58
- Figura 16 - Espectro IV obtido para a microalga *Spirulina* 65
- Figura 17 - Curvas de titulação de 51,5 0mL de uma suspensão 2,06g/L obtida para a microalga *Spirulina*. Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear nos meios iônicos 0,01(), 0,10() mol/L NaNO₃ 69
- Figura 18 - Curva de titulação de 53,50 mL de uma suspensão 2,07g/L de microalga *Spirulina*, segmenta e linearizada por Funções de Gran Modificadas na presença de excesso de ácido forte (HCl) usando solução de NaOH 0,1218 mols/L como titulante. Meio iônico NaNO₃ 0,01moles/L 70
- Figura 19 - Curva de titulação de 51,50 mL de uma suspensão 2,06g/L de microalga *Spirulina* na presença de excesso de ácido forte (HCl) usando solução de NaOH 0,1243 mols/L como titulante. Meio iônico NaNO₃ 0,10mols/L e suas respectivas Funções de Gran Modificadas 71
- Figura 20 - - Fotografias de microscopia de varredura eletrônica da microalga *Spirulina* em força iônica 0,01 (a), 0,10 (b) e 1,0 (c). As fotografias foram obtidas com um aumentado de 3000 vezes. A escala na figura corresponde a um comprimento de 5µm 75
- Figura 21 - Curvas de titulação obtidas para o ácido Algínico. Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma

suspensão 50,00mL de Algínico 0,35g/L nos meios iônicos 1,00(), 0,10() e 0,01(□)mol/L NaNO₃ 81

Figura 22 - Curva de titulação do ácido algínico em força iônica 0,01 mol/L NaNO₃ linearizada por sua respectiva Função de Gran Modificada 82

Figura 23 - Curva de titulação do ácido algínico em força iônica 0,10 mol/L NaNO₃ linearizada por sua respectiva Função de Gran Modificada 83

Figura 24 - Curva de titulação do ácido algínico em força iônica 1,00 mol/L NaNO₃ linearizada por sua respectiva Função de Gran Modificada 84

Figura 25 - Curvas de titulação obtida para o APA Mw = 2000g/mol. Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão de 50,00mL de APA 1,50g/L nos meios iônicos 0,10() e 0,01(□)mol/L NaNO₃ 90

Figura 26 - Curva de titulação para o APA Mw = 2000g/mol em força iônica 0,10 mol/L NaNO₃ segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas 91

Figura 27 - Curva de titulação para o APA Mw = 2000g/mol em força iônica 1,00 mol/L NaNO₃ segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas 92

Figura 28 - (a) Titulações do APA Mw=2000 g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00 resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas 93

Figura 28 - (b) Titulações do APA Mw=2000 g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00 resultados obtidos por regressão não-linear 93

Figura 29 - Curvas de titulação obtida para o APA Mw = 250000g/mol. Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão de 50,00mL de APA 1,50g/L nos meios iônicos 0,10() e 1,00(□)mol/L NaNO ₃	97
Figura 30 - Curva de titulação para o APA Mw = 250000g/mol em força iônica 0,10 mol/L NaNO ₃ segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas.	98
Figura 31 - Curva de titulação para o APA Mw = 250000g/mol em força iônica 1,00 mol/L NaNO ₃ segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas	99
Figura 32 - (a) Titulações do APA Mw=250000g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00 resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas	100
Figura 32 - (b) Titulações do APA Mw=250000g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00 resultados obtidos por Regressão Não-Linear	101

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição elementar de ácidos húmicos e fúlvicos	5
Tabela 2 - Caracterização das amostras de HA extraídas com NaOH	42
Tabela 3 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich (685mg/L) vs NaOH 0,1031 mol/L; em força iônica 0,01. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos: $E^0=403,46$ mV; $E^{0'}=-414,41$ mV; $J_H=-59,39$ mV/molL; $J_{OH}=-40,95$ mV/molL e $K_w=1,49 \times 10^{-14}$	44
Tabela 4 - Funções de Gran Modificadas para os dados da Tabela 3	45
Tabela 5 - Curva de titulação ajustada por Regressão não-linear	48
Tabela 6 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e regressão Não-Linear para a amostra de HA Aldrich	49
Tabela 7 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e regressão Não-Linear para a amostra de HA extraída de vermicomposto (Humus de minhoca)	50
Tabela 8 - Resultados obtidos pelos métodos clássicos	52
Tabela 9 - Análise elementar da amostra de microalga Spirulina	64
Tabela 10 - Análise do espectro IV obtido pela microalga Spirulina	66
Tabela 11 - Concentração e pK dos sítios ionizáveis determinados na superfície de Spirulina por titulação potenciométrica ácido-base em força iônica 0,01 e 0,1 à $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$	68
Tabela 12 - Análise elementar da amostra de ácido algínico	79

Tabela 13 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear e para as curvas de titulações potenciométricas do ácido algínico
80

Tabela 14 - Análise elementar das amostras de ácido poliacrílico (APA) estudadas
87

Tabela 15 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e por Regressão Não-Linear para as curvas de titulação potenciométrica ácido poliacrílico com $M_w=2000\text{g/mol}$ 89

Tabela 16 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e por Regressão Não-Linear para as curvas de titulação potenciométrica ácido poliacrílico com $M_w=250000\text{g/mol}$ 96

1 - Introdução

1.1 - Aspectos Gerais sobre sistemas de polieletrólitos

Os processos de transporte e biodisponibilidade de metais em sistemas aquáticos, assim como suas propriedades de tamponamento são governadas por processos de complexação, adsorção, condições redox, etc.. Reações de complexação por sua vez são governadas pela presença dos complexantes de ocorrência natural, que podem ser divididos em duas classes: “simples” (cloretos, carbonatos, aminoácidos, etc..) e os grupos de compostos homólogos (substâncias húmicas, óxido de ferro e manganês, etc..). Esta última classe de compostos contém um grande número de sítios ionizáveis por molécula. A caracterização ácido-base e determinação da estequiometria e pKa destes sítios ionizáveis tem sido feita usando-se a metodologia de tratamento de dados obtidos por titulações potenciométricas; sendo uma primeira etapa necessária para estudos de especiação. Os métodos de caracterização destes compostos macromoleculares ainda não são bem definidos, não havendo um consenso definitivo sobre o modelo mais adequado para a interpretação de dados experimentais. Isto se deve ao fato de que as curvas de titulação potenciométrica destes compostos de elevada massa molar são complicadas pelas seguintes propriedades:¹

1- Polifuncionalidade: resulta da presença de grupos ionizáveis de diferentes naturezas químicas presentes na macromolécula, tais como grupos carboxílicos e fenólicos em substâncias húmicas. Dentro da polifuncionalidade deve-se ainda mencionar a presença de grupos de mesma natureza química localizados em ambientes distintos do ponto de vista eletrônico, tais como grupos carboxílicos ligados a resíduos alifáticos ou aromáticos da macromolécula.¹

2- Mudanças Conformacionais: Resultam de alterações das condições do meio, tais como alterações de força iônica, pH, presença de íons metálicos, etc., que influenciam processos de hidratação, formação de pontes de hidrogênio e pontes metálicas, que por sua vez dependem do grau de ocupação dos sítios de complexação por íons metálicos.

3- Propriedades Polieletrólíticas: Uma vez que os sítios de complexação apresentam propriedades ácido-base e cada macromolécula tem vários destes sítios, um grande número de cargas elétricas é observado, sendo que a carga elétrica total depende do pH e do grau de ocupação dos sítios ionizáveis ou de complexação por íons metálicos.¹

A elaboração de um modelo geral para a interpretação das propriedades potenciométricas de polieletrólitos de ocorrência natural complica-se também pelo fato que, dependendo da amostra, um ou outro efeito dos três mencionados acima é mais significativo para a interpretação dos dados experimentais. Deste modo, acredita-se que um estudo sistemático destes compostos macromoleculares de ocorrência em compartimentos ambientais seja de grande interesse para a Química Analítica Ambiental, tanto no sentido de se caracterizar o composto tanto quanto possível, como para determinar a estequiometria dos sítios ionizáveis.

1.2 - Considerações sobre os polieletrólitos estudados

1.2.1 - Ácido Húmico (HA)

A matéria orgânica existente em solos, sedimentos e turfa pode ser dividida em substâncias húmicas, também chamada húmus, e substâncias não húmicas. As substâncias não húmicas apresentam características químicas bem definidas; incluem-se neste grupo os carboidratos, as proteínas, os peptídeos, os aminoácidos, os ácidos graxos, as ceras e os ácidos orgânicos de baixa massa molar. Estes compostos são facilmente degradados por microorganismos, possuindo portanto, curto tempo de vida em solos, sedimentos e turfas.

Já as substâncias húmicas não apresentam características químicas bem definidas (tais como: ponto de fusão, índice de refração, composição elementar, espectro na região do IV, etc..). Estas substâncias constituem um grupo heterogêneo de compostos originários da degradação química e biológica de resíduos de plantas e animais. São também produto da atividade metabólica de microorganismos. Os produtos formados tendem a associar-se em estruturas complexas que são mais estáveis que os materiais de origem.

As substâncias húmicas são constituídas de estruturas poliméricas amorfas em vários graus de polidispersão, de coloração escura, caráter ácido, aromáticas ou alifáticas (dependendo da origem), hidrofílicas, natureza polieletrólítica e massas molares que podem variar de centenas até milhares.² Características importantes das substâncias húmicas são: sua capacidade em formar complexos estáveis solúveis e insolúveis em água, interagir com íons e óxidos hidratados de metais, com argilas minerais e compostos orgânicos como ácidos graxos e pesticidas. Possuem um grande número de sítios ionizáveis com propriedades ácido-base, que influenciam a biodisponibilidade de metais tóxicos,

assim como a capacidade de complexação (pH-dependentes) do ambiente em que se encontram. Podem ser distinguidos três tipos de ligações entre os grupos funcionais das substâncias húmicas e os constituintes inorgânicos presentes no solo:

- 1) Tipo iônico (heteropolar), com participação dos grupos carboxílicos e hidróxi-fenólicos, conduzindo à formação dos humatos e fulvatos correspondentes.
- 2) Tipo semipolar, formado por ligações de coordenação com participação de grupos amino e imino com a formação de complexos do tipo quelato.
- 3) Tipo formado por efeitos de polarização e ligações de ponte de hidrogênio com especial participação dos grupos terminais formando compostos de adsorção.

Estas ligações são afetadas por mudanças no meio reacional.³

As substâncias húmicas dividem-se em três principais frações:

- Ácido húmico: fração solúvel em álcali diluído e insolúvel em ácido;
- Ácido fúlvico: fração solúvel tanto em meio alcalino como em meio ácido;
- Humina: fração não extraível (insolúvel) por ácidos ou álcalis diluídos⁴.

Na Tabela 1 é mostrada a composição elementar típica de ácidos húmicos e fúlvicos:

Tabela 1 - Composição elementar típica de ácidos húmicos e fúlvicos*

	C (%)	O (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Ácido Húmico	50-60	30-35	4-6	2-6	0-2
Ácido Fúlvico	40-50	44-50	4-6	< 1-3	0-2

***Fonte: Stevenson, F. J.; *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reaction*; John Wiley & Sons, New York, 1992.**

Várias metodologias têm sido empregadas a fim de se determinar a composição química das substâncias húmicas, podendo-se citar a aplicação de técnicas potenciométricas⁵, condutométricas⁶, voltamétricas⁷, ressonância magnética nuclear de carbono 13, termogravimetria, espectroscopia de massas, cromatografia gasosa, infravermelho e outras técnicas.⁸⁻⁹

A fração húmica proveniente do solo é representada por um complexo sistema coloidal, consistindo de moléculas com uma grande faixa de massa molar. Algumas das estruturas propostas em literatura para as substâncias húmicas são mostradas a seguir:²

Figura 1 - (a) Possível estrutura para o ácido húmico a partir da lignina

Figura 1 - (b) Estrutura hipotética para o ácido húmico proposta por Flaig mostrando uma grande quantidade de grupos fenólicos e quinonas

1.2.2 - Microalga Spirulina

As *Spirulinas* são classificadas como seres procariotos, imóveis e não esporulados.¹⁰ Sua natureza procariota, seus pigmentos do tipo ficobiliprotéico e produção de oxigênio via fotossintética as diferencia das algas eucariotas e bactérias fotossintéticas.¹¹ As *Spirulinas* vivem em meios líquidos ricos em sais minerais, compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH 8 a 11. As regiões propícias para cultivo são as tropicais e subtropicais, quentes e ensolaradas. São utilizadas como fonte de alimento na dieta humana e ração animal, possuindo elevados teores protéicos e contendo todos os aminoácidos essenciais em proporções que satisfazem as recomendações da FAO (Food and Agriculture Organization). As *Spirulinas* são capazes de acumular germânio, que é importante devido à sua atividade hemolítica e indutora de interferon.¹² Além disso possuem efeito hipocolesterolêmico, ou seja, seu consumo pode abaixar os níveis de colesterol no sangue, conforme foi descrito em literatura.¹³⁻¹⁴ Outro aspecto interessante ligado à *Spirulina* é o seu meio de cultura, que pode ser composto por efluentes rurais e urbanos ricos em nitrogênio e fósforo. Desta forma, a partir do cultivo recupera-se quase que a totalidade desses elementos, evitando a proliferação de algas indesejáveis e produção de biomassa para consumo humano e animal.¹⁵

A determinação e caracterização ácido-base dos sítios ionizáveis presentes em superfícies de algas, via titulação potenciométrica, é complicada pela presença de sítios de diferentes naturezas (SO_3H , COOH , $-\text{NH}_3$, F-OH), que conferem a chamada heterogeneidade química à superfície. A presença de cargas nestes grupos levam ao aparecimento de campo elétrico na superfície e,

conseqüentemente, a efeitos eletrostáticos que afetam as suas propriedades ácido-base.

O acúmulo de metais pesados por biomassa oriunda de bactérias, fungos e algas em ambientes aquáticos tem sido atribuído a processos de complexação e/ou adsorção entre cátions metálicos e os sítios ionizáveis presentes na superfície destes biomateriais. O conhecimento da estequiometria e propriedades ácido-base dos grupos ionizáveis presentes na parte externa da parede celular dos biosorventes é essencial para que se possa prever as suas propriedades de ligação de prótons e metais e, conseqüentemente, a viabilidade de seu emprego em sistemas de purificação de águas, tratamento de efluentes e recuperação de ambientes degradados. Entre a diversidade da biomassa existente, as algas tem sido a fonte mais promissora quanto à capacidade de biosorção de metais pesados como cobre, cádmio, chumbo, níquel e zinco. A performance destes organismos como adsorventes depende de sua concentração (população), pH do meio, cinética de reação, entre outros fatores.¹⁶ A identificação e quantificação dos sítios ligantes destes biomateriais pode ainda contribuir para o desenvolvimento de novos adsorventes sintéticos.

1.2.3 - Ácido Algínico

O ácido algínico pode ser considerado como um biopolímero linear formado a partir de resíduos de 1,4-β-d manopirranose ligado com 1,4-α-L-glicopirranose.¹⁷ A Figura 2 mostra a fórmula estrutural deste composto:

Figura 2 - Estrutura do ácido algínico⁶

Constitui um dos blocos formadores da pectina, que é o maior constituinte da parede celular de vegetais. Os alginatos, juntamente com o material celulósico, é responsável pela integridade estrutural da parede celular, sendo um dos biopolímeros mais extensivamente investigados para a remoção de metais em águas.¹⁸⁻¹⁹

Em solução aquosa o ácido algínico forma um colóide flexível e microscópico exibindo propriedades físico-químicas similares à de géis macroscópicos.²⁰ Em fase aquosa, ao redor do biopolímero forma-se uma subfase (fase biopolímero-fase colóide) que se torna uma região com forte atração eletrostática. Procedimentos baseados na teoria do Equilíbrio de Donnan, conjuntamente com titulações potenciométricas em diferentes forças

iônicas, permitem estimar o volume desta subfase, o grau de ionização, assim como a quantidade de íon metálico que pode ser adsorvida nesta subfase.²¹

1.2.4 - Ácido poliacrílico

O ácido poliacrílico é o principal precursor dos polímeros acrílicos conhecidos pela abreviatura inglesa PAA (Polyacrylic Acid). A estrutura do monômero é mostrada na Figura 3:

Figura 3 - Estrutura do monômero do ácido poliacrílico

Quando o ácido poliacrílico é dissolvido em água na sua forma nativa, este polímero assume uma configuração relativamente relaxada. Após neutralização com uma base adequada, os grupos carboxílicos são ionizados, e uma repulsão eletrônica mútua entre estes grupos faz com que a molécula adquira uma configuração bastante expandida.²²

O ácido poliacrílico é um polímero facilmente encontrado com várias massas molares, sendo utilizado para estabilizar sistemas coloidais através de um efeito conhecido como “bridging effect”, muito mais eficiente quando são utilizadas cadeias poliméricas de alta massa molar. Ele atua como um agente espessante.²²

1.3 - Modelos para interpretação das curvas de titulação ácido-base de polieletrólitos e suspensões coloidais

Na literatura são descritos vários modelos para descrever as propriedades ácido-base de polieletrólitos, sendo que os mais comuns são descritos a seguir:²³

■ **sítios discretos:** as substâncias polieletrólíticas são tratadas como uma mistura de ácidos fracos monopróticos. As constantes de dissociação serão somente dependentes da natureza química do grupo ionizável, assim como das interações locais devido ao ambiente químico em que o grupo está localizado na macromolécula. Neste modelo, a determinação da estequiometria e constantes de ionização dos sítios ligantes é feita por tratamento numérico de dados obtidos em titulação potenciométrica. Este tratamento envolve ajustes multiparamétricos não lineares baseados em métodos de cálculo como o de Levenberg-Marquardt.²⁴ Outros trabalhos utilizam a segmentação e linearização das curvas de titulação através de funções de Gran modificadas para o mesmo cálculo.²⁵ Nestes trabalhos²⁴⁻²⁶ constatou-se que, para algumas amostras de ácido fúlvico e húmico, a heterogeneidade química entre os grupos tituláveis é o principal fator que afeta as propriedades ácido-base.

■ **modelo de distribuição contínua:**

Segundo este modelo, devido ao grande número de sítios ionizáveis presentes em polieletrólitos, as propriedades ácido-base ou de ligação de íons metálicos são representadas por uma função de distribuição contínua com respeito às constantes de equilíbrio K_i . Ao invés de definir-se classes de sítios

com concentração definida tendo um único valor de K , como no modelo de sítios discretos, no modelo de distribuição contínua assume-se que K varia continuamente com o pH e que a concentração de sítios ionizáveis (ou ligantes) pode ser então integrada com relação à variável K :²⁷⁻²⁹

$$\left[L_T^f \right] = \int_0^{\infty} L^f(K, [M] \text{ ou } [H]) dK \quad (1)$$

onde $\left[L_T^f \right]$ é a concentração do ligante livre, $[M]$ e $[H]$ são respectivamente as concentrações de metal e prótons em solução e K refere-se à constante de equilíbrio de associação entre L e H ou M .

Uma descrição comparativa de modelo de sítios discreto e distribuição contínua é apresentada por Morel e colaboradores.²⁹⁻³⁰

■ modelo puramente eletrostático:

Este modelo baseia-se na teoria eletrostática desenvolvida por Tanford para macromoléculas.³⁰ Todos os grupos carboxílicos são considerados idênticos em sua afinidade por H^+ . A dissociação do próton seria descrita por uma constante intrínseca que depende somente da identidade do grupo, acrescida por um termo de correção devido às interações eletrostáticas decorrentes das variações de carga na macromolécula, que ocorrem ao longo da titulação devido às mudanças de pH.²⁶

Este modelo foi aplicado com sucesso para a avaliação dos pK de ácido fúlvico³¹ assim como para a determinação da estequiometria e pK de ácidos húmico e fúlvico proveniente de ambiente aquático.³²

O modelo eletrostático baseia-se nas seguintes suposições:²⁹

i) moléculas de HA são esferas impermeáveis;

ii) as cargas das moléculas de ácido húmico são distribuídas uniformemente sobre a superfície da esfera;

iii) não há contra-íon ligante;

a ionização de um grupo funcional afeta a ionização de outros grupos somente pela interação eletrostática. A energia livre eletrostática, W_{ele} , de uma molécula pode ser definida pela teoria de Debye-Hückel:

$$W_{ele} = \frac{Z^2 e^2}{2DR} \left(1 - \frac{\kappa R}{1 + \kappa r} \right) \quad (2)$$

onde D , e , Z , R e r são, respectivamente, a constante dielétrica da água, a carga do próton, a carga média sobre a macromolécula de HA; r é o raio da molécula de ácido húmico e R a distância de aproximação de H^+ . Além disso κ denota o parâmetro de Debye (m^{-1}) e este pode ser dado por:

$$\kappa = \left(\frac{8\pi N e^2}{1000 D K T} \right)^{1/2} \cdot I^{1/2} \quad (3)$$

onde K , T , N e I denotam constante de Boltzman, temperatura absoluta, número de Avogadro e força iônica, respectivamente. Assim como a interação eletrostática entre íons simples e grupos ionizáveis da molécula de ácido húmico em uma solução, a interação eletrostática entre cada grupo ionizável e cada molécula também precisa ser considerada.

Em uma dada força iônica, a seguinte equação pode ser definida com a constante de dissociação intrínseca, K_i :

$$K_i = K_{i, \text{int}} \exp \left\{ \frac{zZe^2}{DRKT \left(\frac{1 - \kappa R}{1 + \kappa r} \right)} \right\} \quad (4)$$

onde:

z = carga do H^+

A carga média da molécula de HA, Z , corresponde à quantidade de grupos ionizáveis por molécula de ácido húmico. A carga média de uma molécula de HA pode ser calculada pela quantidade total de grupos ionizáveis (C_{Ai}) e a massa molar média do HA.

O valor de κ pode ser calculado à 298K, resultando $3,29 \times 10^9 \text{ l}^{1/2}$. O logaritmo da equação 4 pode ser escrito como abaixo:

$$pK_1 = pK_{i, \text{int}} - \frac{Ze^2}{2,303DRKT} \times \left(1 - \frac{3,29 \times 10^9 RI^{1/2}}{1 + 3,29 \times 10^9 rI^{1/2}} \right) \quad (5)$$

A equação 5 mostra a relação entre pK_i e $I^{1/2}$. A aproximação do tamanho médio e a carga neste modelo eletrostático pode dar um excelente ajuste entre as curvas de titulação experimentais e teóricas.

A curva de titulação de um polieletrólito linear pode ser representada de maneira genérica por:

$$pH = pK^i_{\text{int}} - \log \left[\frac{x_i}{(1 - x_i)} \right] + \frac{0,434e\phi}{KT} \quad (6)$$

onde k_{int}^i é a constante de dissociação intrínseca para um sítio titulável i , x_i é o grau de dissociação do sítio i e ψ é o potencial elétrico na superfície da macromolécula. O termo $0,434e\psi/kT$ é relacionado ao trabalho envolvido para remover o próton de seu sítio ionizado contra as forças eletrostáticas exercidas por outros grupos carregados na macromolécula.³³ Deste modo, a determinação da constante de dissociação intrínseca envolve a determinação da carga ou potencial na superfície da macromolécula.

■ modelo de sítios discretos/eletrostático

Neste modelo, assume-se que as moléculas de substâncias húmicas contém mais de um tipo de sítio de ligação e estes sítios são afetados pelas interações eletrostáticas.³¹ Porém para se descrever os efeitos de força iônica sobre as reações em sistemas naturais um modelo eletrostático é requerido, tornando-se válidas as hipóteses descritas acima para o modelo puramente eletrostático. Todavia o modelo “puramente eletrostático” superestima os efeitos de interação eletrostática e negligencia completamente a heterogeneidade química dos sítios ligantes, um fato de evidente influência observado a partir de estudos de determinação estrutural e titulações.²³

Devido à natureza polifuncional, polieletrólítica e a labilidade conformacional dessas substâncias fica difícil de se estabelecer um modelo geral para a interpretação das suas propriedades potenciométricas. Uma ou outra das características anteriormente mencionadas pode ser mais significativa para a interpretação dos dados experimentais.

Em trabalhos anteriormente apresentados²⁶ demonstrou-se que para uma amostra de HA o efeito da heterogeneidade química dos sítios ionizáveis é mais significativo do que os efeitos eletrostáticos (polieletrólíticos) para

explicar as curvas de titulação potenciométrica obtidas em diferentes valores de força iônica. Nestas condições o termo $0,434e\psi/kT$ da equação 6 pode ser negligenciado de modo que a curva de titulação pode ser interpretada como se a solução fosse composta de uma mistura de ácidos monopróticos, segundo o modelo dos sítios discretos. Com isto o procedimento experimental e de cálculos é simplificado.

O modelo de cálculo empregado no presente trabalho para determinação de grupos ionizáveis nas amostras de polieletrólitos estudados baseia-se no uso de Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear dos dados obtidos em titulação potenciométrica, assumindo o modelo de distribuição discreta dos sítios ionizáveis e avaliação da influência da força iônica na distribuição da estequiometria e pK_a dos sítios ionizáveis.

2 - Objetivos do trabalho:

- 1 - Determinar a estequiometria dos sítios ionizáveis, assim como suas constantes de dissociação, em polieletrólitos de interesse ambiental, adotando-se o modelo de distribuição de sítios discretos para tratamento dos dados de titulação potenciométrica ácido-base. Os materiais estudados para atingir este objetivo foram: ácido húmico comercial (Aldrich) e extraído de vermicomposto (Humus de minhoca); microalga *Spirulina*; ácido algínico e ácidos poliacrílicos de massas molares de 2000g/mol e 250000g/mol.
- 2 - Avaliar a influência de interações eletrostáticas (realizando titulações em diferentes meios iônicos) sobre as constantes de dissociação e distribuição estequiométrica dos sítios ionizáveis determinados pelo modelo da distribuição discreta, ou seja, tratando-se a suspensão como uma mistura de ácidos.
- 3 - Avaliar comparativamente o desempenho de dois métodos de cálculo para tratamento dos dados obtidos em titulação potenciométrica. Estes métodos baseiam-se em regressão não linear (ajuste multiparamétrico de curvas) e regressão linear (funções de Gran modificadas).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Reagentes e soluções

⇒ Solução concentrada de NaOH

Foram dissolvidos 50 g de NaOH (Reagente PA - Aldrich) em 50,00 mL de água destilada e a solução foi armazenada em frasco de polietileno, deixando-se em repouso por 24 horas antes do uso.³⁴

⇒ Soluções titulantes de NaOH

Soluções de NaOH/NaCl e NaOH/NaNO₃ com concentração próxima a 0,10 mol/L foram preparadas por diluição de volume apropriado da solução estoque de NaOH 50% (m/v), previamente filtrada sob pressão reduzida, em balão volumétrico ao qual era adicionada uma massa de NaCl ou NaNO₃ de modo a produzir a solução de concentração 0,01; 0,10 ou 1,00 mol/L nos referidos sais. A diluição foi feita utilizando-se água deionizada previamente fervida. Após o preparo, a solução era rapidamente acondicionada em frasco de polietileno de paredes grossas com conexão para sifonamento e tubo contendo cal sodada, na entrada de ar, para evitar absorção de CO₂. Esta solução era padronizada antes do uso com biftalato de potássio, previamente seco em estufa à 110°C durante cerca de 1,5 hora, utilizando-se fenolftaleína 1% como indicador.³⁴⁻³⁸

⇒ Soluções de HCl

Foram preparadas em concentrações 0,10 mol/L por diluição de 8,37mL do reagente concentrado, grau analítico Merk, até 1L. O meio iônico nestas soluções foi NaCl 0,01; 0,10 ou 1,00 mol/L para as titulações das amostras de ácido húmico Aldrich e extraída de vermicomposto (Húmus de minhoca). Para as

titulações da microalga *Spirulina*, ácido algínico e ácido poliacrílico, o meio iônico foi ajustado com nitrato de sódio.

3.2 - Instrumentação Analítica

⇒ pH-metro e eletrodos

Utilizou-se um pH-metro Methron B-654 com precisão de 0,1mV ou 0,001 unidades de pH e eletrodo combinado de vidro Mettler Toledo HA 405-60-8b-S 7/20. O sistema de referência do eletrodo é Ag/AgCl, preenchido com solução saturada de KCl/AgCl.

⇒ Microbureta

Utilizou-se a microbureta de pistão Gilmont com capacidade de 2,50 mL, modelo GS 4200 A, com precisão de 0,1µL.

⇒ Micropipeta

Utilizou-se a micropipeta Gilson de 5,00 mL.

⇒ Celas de titulação

Foi utilizada uma cela de vidro com capacidade de 50,0 mL provida de uma “camisa” externa que permite a circulação de água com o objetivo de manter a temperatura constante. Nesta cela pôde-se acoplar uma tampa contendo abertura apropriada para adaptação de eletrodos, microbureta e tubo para circulação de N₂ livre de CO₂ no interior da cela.

⇒ Centrífuga

Centrífuga Sorvall, da Dupont Instruments, modelo RC5C rotor GS-3.

⇒ *Termostato*

Banho ultratermostático Ética 521D com precisão nominal de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

⇒ *Microcomputador*

Para o tratamento de dados foi utilizado um Pentium® 133MHz acoplado à impressora HP® 692C.

⇒ *Microscópio eletrônico*

As fotos de microscopia eletrônica foram obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico da Zeiss modelo DSM 960 com capacidade de resolução de 100nm .

⇒ *Balança*

Balança analítica Mettler com precisão de $\pm 0,1\text{mg}$.

⇒ *Espectrômetro*

Espectrômetro IV, com transformada de Fourier, Perkin-Elmer 1750.

⇒ *Aparelho para análise elementar*

Para se conhecer a composição química das amostras estudadas elas foram submetidas a análise elementar. Utilizou um analisador elementar da Perkin Elmer, modelo 2400 CHE.

3.3 - Preparo das amostras de polieletrólitos utilizados

A confiabilidade dos resultados obtidos de caracterização ácido-base de amostras por titulação potenciométrica depende da pureza dessas amostras, ou seja, deve-se minimizar a presença de substâncias que possam tomar parte de reações paralelas de consumo de prótons.

3.3.1 - Amostras de ácido húmico

As amostras de ácido húmico; HA Aldrich (Humic Acid Sodium Salt H1-675-2 Lot. N°. 01816) e Humus de minhoca (West Garden); foram submetidas à um processo de extração segundo o procedimento proposto por Kim *et al.*⁸⁰ Na Figura 4 o processo de extração utilizado é mostrado esquematicamente.

Figura 4 - Esquema do processo de extração utilizado para as amostras de ácido húmico estudadas

3.3.2 - Microalga *Spirulina*

Espécies mistas da microalga *Spirulina* foram adquiridas junto à Sigma (Lote N°29F40201, lavada e liofilizada). Suspensões de alga em concentração aproximada de 1 a 2 g L⁻¹ ($\pm$ 0,1 mg L⁻¹) foram preparadas diretamente na cela de titulação em presença de 50,00 mL de NaNO₃ 0,010 ou 0,10 moles L⁻¹. Em seguida foram adicionados 1,50 mL de HCl 0,10 mols/L contendo a mesma concentração NaNO₃ que a suspensão a ser titulada, promovendo-se a protonação dos grupos ionizáveis na superfície da alga e mantendo-se o meio iônico predominante de NaNO₃ 0,010 ou 0,10 mols/L.

3.3.3 - Ácido Algínico

O ácido algínico foi adquirido junto à Sigma (Lote N°. 46H0889, obtido a partir da alga *Macrocystis pyrifera*). As suspensões de ácido algínico foram preparadas diretamente na cela de titulação na presença de 50,00 mL de solução de NaNO₃ 0,010, 0,10 ou 1,0 mol/L, resultando concentrações de ácido algínico entre 0,35 e 0,55 g/L ($\pm$ 0,1 mg/L). Nestas suspensões não adicionou-se excesso de ácido forte antes do início da titulação.

3.3.4 - Ácidos poliacrílicos (APA)

Foram utilizados APA com massas molares 2000 e 250000 g/mol adquiridos junto à Aldrich (Lotes 08715AQ e 08825HY, respectivamente). As suspensões foram preparadas diretamente na cela de titulação na presença de

50,00 ml de solução de NaNO_3 0,10 ou 1,00 mol/L resultando concentrações de APA de 1,5 g/L ($\pm 0,1$ mg/L). Assim como para as titulações de ácido algínico, não adicionou-se excesso de ácido forte antes do início da titulação.

3.4 - As curvas de titulação e o tratamento dos dados

3.4.1 - Tratamento dos dados obtidos em titulação potenciométrica para caracterização ácido-base dos polieletrólitos estudados

Em titulações potenciométricas de neutralização de sistemas simples o volume de equivalência é determinado pelos métodos da primeira e segunda derivadas. Segundo Meites et al³⁹, a aplicação destes métodos clássicos a dados teóricos de titulação permite a obtenção de resultados com grande precisão e exatidão para ácidos bastante diluídos ($3,0 \times 10^{-5}$) ou bastante fracos ($pK_a \sim 6$) quando titulados com base forte 0,10 mol/L.⁴⁰ Entretanto, observa-se que em titulações experimentais o aumento da diluição ou do pK_a do ácido diminui a inflexão da curva de titulação na região do volume de equivalência, com uma perda paralela de exatidão e precisão em sua determinação pelos métodos derivados. O mesmo se observa quando se trata de titulações de misturas de ácidos fracos cujo ΔpK_a não é superior a 4.⁴¹ Neste caso, as inflexões das curvas de titulação tendem a se sobrepor, impossibilitando a aplicação dos métodos clássicos ou derivados.⁴²⁻⁴⁴

Diferentes métodos de cálculo foram desenvolvidos no sentido de aumentar a exatidão e a precisão do volume de equivalência de ácidos mais fracos ou diluídos, ou ainda, quando presentes em misturas. Tais métodos são geralmente agrupados em dois tipos: os que utilizam ajuste de curvas por Regressão Não Linear^{45, 46} e os que utilizam linearização da curva de titulação, onde as retas são ajustadas por Regressão-Linear.^{43,44,47} Apesar dos métodos não-lineares serem considerados mais exatos e precisos, os métodos lineares

são mais simples do ponto de vista matemático, permitindo uma visualização gráfica sobre o sistema em estudo e, conseqüentemente, uma maior facilidade na caracterização das espécies presentes.³³ Além disso, não necessitam de estimativas iniciais dos parâmetros a serem ajustados tão próximos do valor real quanto nos métodos não lineares.⁴⁸ Por outro lado, programas baseados em regressão não linear têm aplicações mais abrangentes, permitindo tanto o tratamento de dados de titulações potenciométricas⁴⁹⁻⁵⁰, como dados obtidos de métodos espectrofotométricos ou de ressonância magnética nuclear.⁵¹ A titulação potenciométrica é uma técnica que requer equipamentos de mais baixo custo e facilmente encontráveis na maioria dos laboratórios, sendo portanto sempre interessante buscar novas aplicações.

Para o tratamento dos dados obtidos em titulação potenciométrica deste trabalho, foram utilizados dois tipos de programa de cálculo: um programa que envolve a segmentação e linearização da curva de titulação por Funções de Gran Modificadas⁵² e um programa de Regressão Não-Linear.⁵³

Como nestas titulações a faixa de pH pode ser bastante ampla, a calibração dos eletrodos deve ser rigorosa.

3.4.2 - Método de calibração dos eletrodos para medida da concentração de íons H^+

A calibração dos eletrodos foi feita em termos da concentração e não da atividade, conforme proposto Pehrson et al.⁵⁴

Pela teoria de Debye-Hückel, mantendo-se constante a temperatura e o meio iônico, os coeficientes de atividade do íon H^+ mantém-se constante durante a titulação. Com isso a equação de Nernst pode ser escrita como:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + E_j \text{ à } 25^\circ\text{C} \quad (7)$$

onde E é o potencial medido, E_a^0 é um termo que engloba o potencial padrão do eletrodo e o coeficiente de atividade do íon hidrogênio. E_j é o potencial de junção líquida e é representado por

$$E_j = J_H[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (8)$$

onde J_H e J_{OH} são característicos do meio iônico.

Assim, a partir de uma titulação potenciométrica de um ácido forte e uma base forte de concentração conhecida, a temperatura (25°C) e meio iônico constante é possível determinar os valores de E_a^0 , J_H e J_{OH} além do produto iônico da água, K_w . Com isso, torna-se possível relacionar o potencial medido com a concentração hidrogeniônica usando-se a equação 7 para titulação de uma amostra desconhecida, realizada nas mesmas condições de força iônica e temperatura.

Na região ácida da titulação de calibração, a equação 7 pode ser escrita como:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + J_H[H^+] \quad (9)$$

Uma vez que o termo $J_{OH}[OH^-]$ pode ser desprezado pelo fato da concentração $[OH^-]$ ser muito pequena nesta região. A equação 9 pode ser rearranjada como:

$$E - 59,16 \log[H^+] = J_H[H^+] + E_a^0 \quad (10)$$

Colocando-se em um gráfico o termo $E - 59,16 \log[H^+]$ em função de $[H^+]$, obtém-se uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor de J_H e o coeficiente linear fornece E_a^0 .

Analogamente, na região alcalina da titulação de calibração, a equação 7 pode ser escrita como:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (11)$$

Uma vez que $J_H[H^+]$ pode ser desprezado. O termo E_a^0 engloba o potencial padrão de eletrodo, o coeficiente de atividade do íon OH^- e produto iônico da água. Rearranjando-se a equação 11 obtém-se:

$$E + 59,16 \log[OH^-] = J_{OH}[OH^-] + E_b^0 \quad (12)$$

Colocando-se em gráfico o termo $E + 59,16 \log[OH^-]$ em função de $[OH^-]$ obtém-se uma reta cujo coeficiente angular fornece J_{OH} e o coeficiente linear fornece E_b^0 .

Finalmente, a constante de ionização da água, no meio iônico e temperatura usados, é determinada pela expressão:

$$\log K_w = \frac{E_a^0 - E_b^0}{59,16} \quad (13)$$

Experimentalmente, a calibração do eletrodo é realizada titulando-se 21,50 mL de uma solução de ácido clorídrico 7×10^{-3} mol/L contendo NaCl ou $NaNO_3$ 0,010, 0,10 ou 1,0 mol/L. Este volume é adicionado na cela de titulação, que é então fechada com tampa apropriada, seguindo-se a colocação do eletrodo combinado e da ponteira da bureta, que é mergulhada logo abaixo da superfície da solução. Inicia-se a termostatização, sendo que a temperatura é mantida constante em $25,0 \pm 0,1^\circ C$ com a ajuda de um banho termostático. Após verificar-se a estabilização do potencial inicial, inicia-se a titulação adicionando-se volumes de 0,1000 mL solução padrão de NaOH 0,1000 mol/L contendo a mesma concentração salina que a solução titulada. Durante toda a titulação mantém-se a circulação de nitrogênio livre de CO_2 no interior da cela de titulação. A solução é permanentemente agitada com a ajuda de barra magnética.

Adota-se como critério para serem efetuadas as medidas de potencial anotar-se o valor após sua variação ser inferior a 0,555mV/min que é um

recurso disponível no potenciômetro utilizado. Cerca de dez a quinze pontos (volume e potencial) são anotados antes (região ácida) e depois (região alcalina) do ponto de equivalência.

O volume de equivalência desta titulação, V_e , é determinado através do método de Gran.⁵⁵ Deste modo V_e foi determinado pela intersecção das

funções $F_1 = (V_0 + V) 10^{\frac{E}{59,6}}$ (região ácida) e $F_2 = (V_0 + V) 10^{\frac{-E}{59,6}}$ (região alcalina) com o eixo do volume de titulante adicionado, V conforme é mostrado na Figura 5:

Figura 5 - Aplicação do método de Gran para determinação do volume de equivalência de uma titulação de 21,50 mL de HCl em NaCl 0,10mol/L com NaOH 0,10 mol/L em NaCl 0,10mol/L, à 25°C.

Após a determinação do V_e , a concentração hidrogeniônica para os pontos da região ácida é calculada pela equação:

$$[H^+] = \frac{(V_e - V)}{V_0 + V} C_B \quad (14)$$

Substituindo-se $[H^+]$ na equação 11 obtém-se os valores de E_0^a e J_H conforme a Figura 6:

Figura 6 - Determinação dos parâmetros E_0^a e J_H , as condições experimentais para a obtenção destes parâmetros são as mesmas descritas na Figura 5

Na região alcalina a concentração hidroxiliônica é dada pela expressão:

$$[OH^-] = \frac{(V - V_e)}{V_0 + V} C_B \quad (15)$$

Substituindo-se $[OH^-]$ na equação 7 determina-se os parâmetros

E_0^b e J_{OH} conforme a Figura 7:

Figura 7 - Determinação dos parâmetros E_0^b e J_{OH} ; as condições experimentais para a obtenção destes parâmetros são as mesmas descritas na

Figura 5

A titulação de calibração é sempre realizada antes da titulação da amostra. Os parâmetros do eletrodo (E_a^0 , E_b^0 , E_J) e do meio iônico (K_w , J_H e J_{OH}) obtidos na titulação de calibração são utilizados com a equação 7 para converter

os valores de potencial anotados na titulação da amostra em concentração hidrogeniônica, que será utilizada nos programas computacionais para determinação da concentração e pK dos sítios ionizáveis dos polieletrólitos.

Este procedimento de calibração dos eletrodos apresenta vantagens sobre a utilização de Tampões NBS para o mesmo fim; pode ser feito em qualquer meio iônico, só é necessário mantê-lo constante. Os tampões NBS são usados em baixa força iônica, de modo que com o uso dos mesmos, os valores de atividade hidrogeniônica necessitarão ser convertidos em concentração através do uso de valores de coeficientes de atividade, que nem sempre são disponíveis, principalmente nos meios de alta força iônica, como no caso das titulações realizadas em NaCl ou NaNO₃ 1,0 mol/L. Esse procedimento implica também um maior tempo de calibração, pois como nas titulações efetuadas trabalha-se numa ampla faixa de pH, seria necessário o uso de três tampões (pH 4, 7 e 9). Isto envolveria um tempo maior para a calibração dos eletrodos.⁴³

3.4.3 - Método das Funções de Gran Modificadas

As deduções sobre a obtenção das funções de Gran modificadas foram mostradas nos trabalhos de Seymour et al⁵⁶, posteriormente aperfeiçoadas por Aleixo e colaboradores.⁴⁴ Aqui serão apresentadas as equações lineares referentes a essas funções de maneira generalizada.⁴⁴

Para uma titulação potenciométrica com base forte de uma mistura de N ácidos fracos, sendo HA₀ o ácido forte e HA₁, HA₂, ...HA_N os N ácidos fracos; a partir das equações de balanceamento de massa e condições de eletroneutralidade, chega-se à seguinte Função de Gran Modificada F_{HA0} para o ácido forte HA₀ :

$$F_{HA_0} = V_{HA_0} C_B - V C_B = ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V) - \sum_{n=1}^N (V_{AH_n} - V_{HA_{(n-1)}}) C_B A_n \quad (16)$$

e as funções F_{HA_n} para os ácidos fracos HA_n , com n variando de 1 até n , são dadas por:

$$F_{HA_0} = V_{HA_n} K_{HA_n} - V \cdot K_{HA_n} = \left[\frac{([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)}{C_B} + (V - V_{HA_0})[H^+] + (V_{HA_{(n-1)}} V_{HA_0}) + K_{HA_n} - \left[\sum_{j=1, n>1}^n (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}}) A_j + \sum_{j=n+1}^n (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}}) A_j (K_{HA_n} + [H^+]) \right] \right] \quad (17)$$

Os termos que aparecem nas equações (16) e (17), V_{HA_0} e V_{HA_n} , representam o volume total de base forte para a neutralização de cada componente ácido presente. Portanto, os volumes de solução padrão de base forte necessários para neutralizar cada um dos componentes ácidos presentes são: V_{HA_0} , $(V_{HA_1} - V_{HA_0})$, $(V_{HA_2} - V_{HA_1}) \dots (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})$. C_B e V são respectivamente a concentração e o volume de base adicionada. K_{HA_n} é a constante de dissociação do ácido fraco HA_n , dada por:

$$K_{HA_n} = \frac{[H^+][A_n^-]}{[HA_n]} \quad (18)$$

e o termo A_n é expresso por:

$$A_n = \frac{K_{HA_n}}{\left(K_{HA_n} + [H^+]\right)} \quad (19)$$

V_0 é o volume de inicial da titulação, $[H^+]$ e $[OH^-]$ são as concentrações dos íons Hidrogênio e Hidroxila, respectivamente. Os termos VHA_j , KHA_j e A_j , que aparecem na equação (17), têm significado análogo aos termos VHA_n , KHA_n e A_n .

A presença de ácido forte nas titulações promove a protonação quantitativa dos ácidos fracos, ou dos sítios ionizáveis de polieletrólitos. Esta presença, entretanto, é opcional, sendo que a equação e os termos para determinação de volume de equivalência do ácido forte podem ser facilmente removidos de programa. Esta característica é importante para titulações de substâncias húmicas, onde a presença de excesso de ácido forte dificulta a determinação de sítios ionizáveis com $pK_a < 3$, comumente encontrados nestas substâncias.⁵²

3.4.4 - Método de Regressão Não-Linear

O programa de regressão não-linear⁵⁷ usa a equação geral que descreve a titulação como uma mistura de um ácido forte com N ácidos fracos (sítios ionizáveis):

$$f(V, H^+) = (V - V_{HA_0})C_B + \left\{ [H^+] - \frac{K_\omega}{[H^+]} \right\} (V_0 + V) - \sum_{n=1}^N \left\{ (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}) A_n C_B \right\} \quad (20)$$

onde V é o volume do titulante, e V_0 é o volume inicial presente na cela antes do início da titulação. V_{HA0} e V_{HAN} são respectivamente o volume de equivalência para o ácido forte e para o $n^{\text{º}}$ ácido fraco (sítio ligante). $[H^+]$ é a concentração do íon hidrogênio. K_w é a constante de ionização da água à 25°C em solução na solução salina utilizada para manter o meio iônico constante, C_B é a concentração do titulante (moles L^{-1}). O termo A_n é definido por:

$$A_n = \frac{K_{HA_n}}{(K_{HA_n} + [H^+])} \quad (21)$$

onde K_{HAN} é a constante de dissociação do $n^{\text{º}}$ ácido fraco (sítio ligante).

O logaritmo negativo de $[H^+]$, $p^{\text{º}}H$, é adotado como variável dependente e o volume do titulante, V , como variável independente. V_{HAN} e K_{HAN} são os parâmetros ajustáveis no cálculo, o qual é realizado minimizando-se o erro da soma, S :

$$S = \sum_{j=1}^m [p^{\text{º}}H_j(\text{med}) - p^{\text{º}}H_j(\text{calc})]^2 \quad (22)$$

onde m é o total de dados (V , $p^{\text{º}}H$) usado na análise de regressão e $p^{\text{º}}H(\text{med})$ refere-se ao pH experimental, enquanto que $p^{\text{º}}H(\text{calc})$ é o pH calculado.

Os valores de $p^{\text{º}}H$ foram calculados usando uma sub-rotina iterativa baseada no método de Newton-Raphson. Primeiramente, os valores de $[H^+]$ são computados usando os valores iniciais estimados para V_{HAN} e K_{HAN} . As

melhores aproximações para os valores de $[H^+]_{\text{calc}}$ no ponto experimental j são obtidos através de sucessivas iterações, k, de acordo com a equação:

$$[H^+]_{j,k+1} = [H^+]_{j,k} - \frac{f(V, [H^+]_{j,k})}{f'(V, [H^+]_{j,k})} \quad (23)$$

onde $f'(V, [H^+]_{j,k})$ é a primeira derivada da equação 20, dada pela seguinte expressão:

$$f'(V, H^+) = \left\{ 1 + \left(\frac{(K_w)}{[H^+]^2} \right) \right\} (V_0 + V) + \sum_{n=1}^N \left\{ (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}) C_B \frac{[K_{HA_n}]}{(K_{HA_n} + [H^+])^2} \right\} \quad (24)$$

A equação 23 é usada repetidamente até que ocorra a convergência a um valor limite, previamente definido por:

$$\left\{ \frac{\left\{ \left([H^+]_{j,k+1} - [H^+]_{j,k} \right) \right\}}{[H^+]_{j,k}} \right\} < 0,00001 \quad (25)$$

Quando a condição definida pela equação 25 é atendida, o valor de $[H^+]_{j,k+1}$ é convertido em $p^{\circ}H_{j,k+1}$ e enviado para a subrotina de minimização para refinar os valores de $[H^+]$ que foram usados no programa.⁵⁸⁻⁵⁹ Para realização dos cálculos um comando restringindo $[H^+] < 0$ foi introduzido no programa.⁶⁰

Para verificar o número de classes de sítios ionizáveis que minimiza a soma dos quadrados dos desvios entre a curva experimental e calculada, sítios adicionais vão sendo colocados no modelo (cada sítio corresponde a um par de valores adicionais de V_{HAN} e K_{HAN}). Geralmente, quanto maior o número de sítios colocados no modelo, menor é a diferença entre a curva experimental e calculada, o que pode ser devido à presença real de sítios ligantes adicionais, ou ácidos fracos na mistura, ou simplesmente devido a uma maior flexibilidade numérica do modelo. Para verificar se o aperfeiçoamento no ajuste numérico pode ser atribuído à presença de sítios ionizáveis, aplicou-se o teste F à soma dos quadrados dos desvios entre dados experimentais e calculados, conforme proposto por Munson and Rodbard,⁵⁹ e que é descrito pela equação 26:

$$F(p_2 - p_1, h - p_2) = \frac{\left[(S_1 - S_2) / (p_2 - p_1) \right]}{\left[S_2 / (h - p_2) \right]} \quad (26)$$

onde S_1 e S_2 são os quadrados da diferença de S dada pela equação 22, h é o número de dados (V , $p^{\circ}H$), p_1 e p_2 são os números de parâmetros ajustados e o índice subscrito refere-se ao modelo específico (que assume diferentes números de sítios ligantes, N). O programa utilizado nos cálculos é mostrado no anexo 2.

3.4.5 - Limitações dos métodos de cálculo empregados quanto ao número de classes de grupos tituláveis a ser determinado

O número de classes de grupos tituláveis obtidos através de dados de titulações potenciométricas de polieletrólitos tratados pelos métodos de cálculo, anteriormente apresentados, dependerá de:

- 1- da presença de grupos ionizáveis de diferentes naturezas químicas (carboxílicas, fenólicas, etc.).
- 2- de grupos de mesma natureza química que estejam sujeitos a interações intramoleculares (puramente eletrostáticas, pontes de hidrogênio, ou proximidade de grupos com alta eletronegatividade, etc.) que têm seus valores de pKa influenciados por tais interações.⁵³
- 3- da capacidade de resolução de misturas através do método numérico empregado. Tem-se demonstrado que quando dois grupos tituláveis com diferentes valores de pKa menor ou igual a 0,5 unidade estão presentes na mistura⁶¹ ou macromolécula⁶², os métodos estudados determinam os dois grupos como uma única classe HA_n cuja concentração corresponde à soma das concentrações individuais destes grupos enquanto o pKa determinado refere-se a um valor médio.

3.4.6 - Procedimento experimental utilizado para a realização das titulações potenciométricas das amostras de polieletrólitos estudadas

Primeiramente faz-se uma titulação para calibração dos eletrodos, detalhadamente descrita na Seção 3.4.2. O procedimento para realização das titulações das amostras de polieletrólitos foi bastante similar àquele utilizado na calibração do eletrodo, com pequenas variações nos volumes de amostra, volume de titulante adicionado, número de pontos anotados, etc. Estas variações serão descritas ao longo do Capítulo 4 (Resultados e Discussão), referindo-se a cada um dos materiais estudados.

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base do ácido húmico Aldrich e extraído de vermicomposto (Húmus de Minhoca)

Na Tabela 2 são mostrados os resultados obtidos pela análise elementar e térmica para verificar a composição química e teor de cinzas das amostras de ácido húmico estudadas:

Tabela 2 - Caracterização das amostras de HA

	% H	% C	% N	% O	Teor de Cinzas*
HA Aldrich	4,77	53,61	0,71	37,64	2,998
Húmus de Minhoca	5,43	51,46	3,26	33,24	0

*Foram feitos no aparelho de análise termogravimétrica Shimadzu TGA 50

Suspensões de ácido húmico foram preparadas nos seguintes meios iônicos: 0,010, 0,10 e 1,00 mol/L NaCl, por diluição de 25,00 mL das soluções estoque de NaCl 0,02, 0,20 e 2,00 mol/L com 25,00 mL da suspensão estoque de ácido húmico, previamente homogeneizada. Esta diluição foi feita diretamente na cela de titulação, resultando suspensões de concentrações 685 e 575 mg/L para os ácidos húmicos Aldrich e extraído de vermicomposto, respectivamente. Esta faixa de concentração tem sido utilizada por outros autores em estudos potenciométricos de substâncias húmicas.^{63 - 64}

As titulações iniciam-se em pH próximo a 3, sendo finalizada em pH 11,5. Um total de 100 a 120 pontos (volume de titulante; potencial, E), medidos

após cada adição de titulante, são anotados para a realização do tratamento de dados. Estas titulações têm um tempo de duração médio de 3,5 horas.

As Tabelas 3, 4 e 5 exemplificam as “listagens de saída” fornecidas pelos programas de cálculo empregados para o tratamento de dados das titulações potenciométricas dos polieletrólitos estudados. Para as demais titulações realizadas, os resultados serão demonstrados graficamente, em conjunto com tabelas mais simplificadas, onde constam os valores finais de estequiometria e pKa dos grupos tituláveis determinados por Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear. Nas Tabelas 6 e 7 são listados os resultados obtidos para o ácido húmico Aldrich e extraído de vermicomposto (Húmus de minhoca) respectivamente. Nas Figuras 8 e 9 são mostradas as curvas experimentais e ajustadas por Regressão Não-Linear para o AH Aldrich e extraído de vermicomposto, respectivamente. Nas Figuras 10 a 12 são apresentadas as curvas de titulação do HA Aldrich nos meios iônicos 0,01, 0,10 e 1,00 mol/L NaCl e suas respectivas Funções de Gran Modificadas. Analogamente, as Figuras 13 a 15 mostram as curvas de titulação para o AH extraído de vermicomposto. Na Tabela 8 são listados os resultados obtidos pelos métodos clássicos (acetado de cálcio, barita e titulações condutométricas).⁶⁵

Tabela 3 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich (685mg/L) vs. NaOH 0,1031 mol/L; em força iônica 0,01. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos: $E^0=403,46$ mV; $E^{0''}=-414,41$ mV; $J_H=-59,39$ mV/molL; $J_{OH}=-40,95$ mV/molL e $K_W=1,49 \times 10^{-14}$

Ponto	Vol (mL)	pH	Ponto	Vol (mL)	pH	Ponto	Vol (mL)	pH	Ponto	Vol (mL)	pH
1	0,0	3,409	27	0,52	5,331	53	0,90	7,205	79	1,16	9,606
2	0,02	3,448	28	0,54	5,307	54	0,91	7,290	80	1,17	9,673
3	0,04	3,499	29	0,56	5,371	55	0,92	7,378	81	1,18	9,973
4	0,06	3,549	30	0,58	5,449	56	0,93	7,741	82	1,19	9,788
5	0,08	3,607	31	0,60	5,542	57	0,94	7,562	83	1,20	9,840
6	0,10	3,668	32	0,62	5,601	58	0,95	7,657	84	1,21	9,895
7	0,12	3,739	33	0,65	5,746	59	0,96	7,724	85	1,22	9,922
8	0,14	3,809	34	0,66	5,790	60	0,97	7,824	86	1,23	9,967
9	0,16	3,887	35	0,68	5,856	61	0,98	7,910	87	1,20	10,015
10	0,18	3,972	36	0,70	5,953	62	0,99	8,033	88	1,25	10,059
11	0,20	4,058	37	0,72	6,042	63	1,00	8,126	89	1,26	10,099
12	0,22	4,149	38	0,74	6,156	64	1,01	8,216	90	1,27	10,135
13	0,24	4,245	39	0,75	6,203	65	1,02	8,331	91	1,28	10,165
14	0,26	4,342	40	0,76	6,254	66	1,03	8,449	92	1,29	10,202
15	0,28	4,440	41	0,77	6,313	67	1,04	8,541	93	1,30	10,233
16	0,30	4,536	42	0,78	6,367	68	1,05	8,652	94	1,35	10,377
17	0,31	4,582	43	0,79	6,426	69	1,06	8,740	95	1,40	10,488
18	0,33	4,675	44	0,80	6,489	70	1,07	8,821	96	1,45	10,579
19	0,35	4,764	45	0,81	6,546	71	1,08	8,906	97	1,15	10,657
20	0,38	4,861	46	0,82	6,610	72	1,09	9,009	98	1,55	10,723
21	0,40	4,967	47	0,83	6,680	73	1,10	9,105	99	1,60	10,783
22	0,42	5,043	48	0,84	6,745	74	1,11	9,207	100	1,65	10,838
23	0,44	5,136	49	0,86	6,891	75	1,12	9,293	101	1,70	10,888
24	0,46	5,162	50	0,87	6,970	76	1,13	9,347	102	1,81	10,976
25	0,48	5,211	51	0,88	7,046	77	1,14	9,433	103	1,90	11,037
26	0,50	5,295	52	0,89	7,119	78	1,15	9,526	104	2,01	11,099

Tabela 4 - Funções de Gran Modificadas para os dados da Tabela 3

Para HA ₁				
N ₁ ¹ =3 N ₂ ¹ =10				
Vol. (mL)	pH	FG. MODIF	FG. AJUSTADA	Desvio
0,04	3,499	1,3526x10 ⁻⁴	1,3463 x10 ⁻⁴	4,6814 x10 ⁻¹
0,06	3,549	1,1952 x10 ⁻⁴	1,1856 x10 ⁻⁴	8,1149 x10 ⁻¹
0,08	3,607	1,0241 x10 ⁻⁵	1,0248 x10 ⁻⁴	-6,5971 x10 ⁻²
0,10	3,668	8,6215 x10 ⁻⁵	8,6408 x10 ⁻⁵	-2,2370 x10 ⁻¹
0,12	3,739	6,8836 x10 ⁻⁵	7,0335 x10 ⁻⁵	-2,1309
0,14	3,809	5,3576 x10 ⁻⁵	5,4261 x10 ⁻⁵	-1,2624
0,16	3,887	3,7810 x10 ⁻⁵	3,8187 x10 ⁻⁵	-9,8721 x10 ⁻¹
0,18	3,972	2,1802 x10 ⁻⁵	2,2114 x10 ⁻⁵	-1,4089
0,20	4,058	6,5316 x10 ⁻⁶	6,0401 x10 ⁻⁶	8,1368
0,22	4,149	-9,2237 x10 ⁻⁶	-1,0033 x10 ⁻⁵	-8,7003
0,24	4,245	-2,5867 x10 ⁻⁵	-2,6107 x10 ⁻⁴⁵	-9,1806 x10 ⁻¹
VHA=0,20752	CHA=5,3487x10 ⁻⁴	pKa=3,09492	KHA=8,0368x10 ⁻⁴	R=-,99991

1 - N₁ e N₂ definem o segmento em que as funções de Gran Modificadas são aplicadas, sendo N₁ o primeiro ponto (par V, p^oH) do segmento e N₂ o número de pontos da titulação a serem tomados sequencialmente após N₁ para ajuste da função de Gran Modificada.

Para HA ₂				
N ₁ =28 N ₂ =10				
Vol. (mL)	pH	FG. MODIF	FG. AJUSTADA	Desvio
0,54	5,307	1,5108x10 ⁻⁶	1,4848 x10 ⁻⁶	1,7492
0,56	5,371	1,3476 x10 ⁻⁶	1,3097 x10 ⁻⁶	2,8903
0,58	5,449	1,1423 x10 ⁻⁶	1,1346 x10 ⁻⁶	6,8090 x10 ⁻¹
0,60	5,542	9,0630 x10 ⁻⁷	9,5945 x10 ⁻⁷	-5,5401
0,62	5,601	7,8705 x10 ⁻⁷	7,8432 x10 ⁻⁷	3,4746 x10 ⁻¹
0,65	5,746	4,7378 x10 ⁻⁷	5,2163 x10 ⁻⁷	-9,1725
0,66	5,790	3,8810 x10 ⁻⁷	4,3406 x10 ⁻⁷	-1,0590 x10 ⁺¹
0,68	5,856	2,7144 x10 ⁻⁷	2,5893 x10 ⁻⁷	4,8309

0,70	5,953	$9,4731 \times 10^{-8}$	$8,3802 \times 10^{-8}$	$1,3042 \times 10^{+1}$
0,72	6,042	$-5,8003 \times 10^{-8}$	$-9,1329 \times 10^{-8}$	$-3,6491 \times 10^{+1}$
0,74	6,156	$-2,5053 \times 10^{-7}$	$-2,6646 \times 10^{-7}$	-5,9784
VHA=0,5020	CHA=1,2940 $\times 10^{-3}$	pKa=5,0576	KHA=8,7565 $\times 10^{-6}$	R=-0,9983
Para HA ₃				
N ₁ =47 N ₂ =8				
Vol. (mL)	pH	FG. MODIF	FG. AJUSTADA	Desvio
0,83	6,680	$2,8156 \times 10^{-8}$	$2,7813 \times 10^{-8}$	1,2163
0,84	6,745	$2,5047 \times 10^{-8}$	$2,4747 \times 10^{-8}$	1,2103
0,86	6,891	$1,8361 \times 10^{-8}$	$1,8615 \times 10^{-8}$	-1,3624
0,87	6,970	$1,5031 \times 10^{-8}$	$1,5549 \times 10^{-9}$	-3,3290
0,88	7,046	$1,2085 \times 10^{-8}$	$1,2482 \times 10^{-8}$	-3,1864
0,89	7,119	$9,4407 \times 10^{-9}$	$9,4161 \times 10^{-9}$	$2,6063 \times 10^{-1}$
0,90	7,205	$6,3553 \times 10^{-9}$	$6,3499 \times 10^{-9}$	$8,4567 \times 10^{-2}$
0,91	7,290	$3,4588 \times 10^{-9}$	$3,2837 \times 10^{-9}$	5,3309
0,92	7,378	$5,4357 \times 10^{-10}$	$2,1750 \times 10^{-10}$	$1,4992 \times 10^2$
VHA=0,2111	CHA=5,4421 $\times 10^{-4}$	pKa=6,5134	KHA=3,062 $\times 10^{-7}$	R=-0,9994

Para HA ₄				
N ₁ = 62 N ₂ =8				
Vol. (mL)	pH	FG. MODIF	FG. AJUSTADA	Desvio
0,99	8,033	7,0163x10 ⁻¹⁰	6,8876 x10 ⁻¹⁰	1,8686
1,00	8,126	6,1357 x10 ⁻¹⁰	6,0340 x10 ⁻¹⁰	1,6848
1,01	8,216	5,3303 x10 ⁻¹⁰	5,1804 x10 ⁻¹⁰	2,8935
1,02	8,331	4,2070 x10 ⁻¹⁰	4,3269 x10 ⁻¹⁰	-2,7617
1,03	8,449	3,1547 x10 ⁻¹⁰	3,4733 x10 ⁻¹⁰	-9,1721
1,04	8,541	2,4597 x10 ⁻¹⁰	2,6197 x10 ⁻¹⁰	-6,1066
1,05	8,652	1,5943 x10 ⁻¹⁰	1,7196 x10 ⁻¹⁰	-9,7300
1,06	8,740	9,6702 x10 ⁻¹¹	9,1254 x10 ⁻¹¹	5,9699
1,07	8,821	3,9403 x10 ⁻¹¹	5,8954 x10 ⁻¹²	5,6837 x10 ⁻²
VHA=0,1499	CHA=3,8658x10 ⁻⁴	pKa=8,0687	KHA=8,5358 x10 ⁻⁹	R=-0,9961

Para HA ₅				
N ₁ =82 N ₂ =6				
Vol. (mL)	pH	FG. MODIF	FG. AJUSTADA	Desvio
1,19	9,788	9,2496x10 ⁻¹²	9,1897 x10 ⁻¹²	6,2247 x10 ⁻¹
1,20	9,840	7,6970 x10 ⁻¹²	7,7860 x10 ⁻¹²	-1,1425
1,21	9,895	5,8369 x10 ⁻¹²	6,3822 x10 ⁻¹²	-8,5439
1,22	9,922	5,4869 x10 ⁻¹²	9,9784 x10 ⁻¹²	1,0212 x10 ¹
1,23	9,967	3,9632 x10 ⁻¹²	3,5747 x10 ⁻¹²	1,0869 x10 ¹
1,20	10,015	2,1513 x10 ⁻¹²	2,1709 x10 ⁻¹²	-9,0546 x10 ⁻¹
1,25	10,059	4,6688 x10 ⁻¹³	7,6714 x10 ⁻¹³	-3,1641 x10 ¹
VHA=0,1847	CHA=4,7526x10 ⁻⁴	pKa=9,8527	KHA=1,4038x10 ⁻¹⁰	R=-0,9927

Tabela 5- Curva de titulação ajustada por Regressão Não-Linear

Vol. (mL)	pH _{EXP.}	pH _{CALC}	Desvio	Vol. (mL)	pH _{EXP.}	pH _{CALC}	Desvio
0,00	3,4090	3,4447	-3,5651E-02	0,93	7,4710	7,4722	-1,2468E-03
0,04	3,4990	3,5317	-3,2684E-02	0,94	7,5620	7,5511	1,0898E-02
0,08	3,6070	3,6306	-2,3565E-02	0,95	7,6570	7,6318	2,5190E-02
0,12	3,7390	3,7445	-5,4696E-03	0,96	7,7240	7,7153	8,7180E-03
0,16	3,8870	3,8779	9,1074E-03	0,97	7,8240	7,8025	2,1476E-02
0,18	3,9720	3,9537	1,8291E-02	0,98	7,9100	7,8946	1,5406E-02
0,20	4,0580	4,0366	2,1426E-02	0,99	8,0330	7,9925	4,0513E-02
0,22	4,1490	4,1269	2,2068E-02	1,00	8,1260	8,0968	2,9153E-02
0,24	4,2450	4,2245	2,0476E-02	1,01	8,2160	8,2075	8,5195E-03
0,28	4,4400	4,4340	5,9520E-03	1,0	8,3310	8,3228	8,2115E-03
0,31	4,5820	4,5906	-8,6303E-03	1,03	8,4490	8,4397	9,3393E-03
0,35	4,7640	4,7808	-1,6101E-02	1,04	8,5410	8,5543	-1,3347E-02
0,40	4,9670	4,9834	-1,6422E-02	1,05	8,6520	8,6639	-1,1857E-02
0,48	5,2110	5,2525	-4,1539E-02	1,06	8,7400	8,7667	-2,6726E-02
0,52	5,3310	5,3740	-4,3013E-02	1,07	8,8210	8,8628	-4,1834E-02
0,66	5,7900	5,8046	-1,4569E-02	1,08	8,9060	8,9528	-4,6822E-02
0,68	5,8560	5,8745	-1,8548E-02	1,09	9,0090	9,0376	-2,8617E-02
0,70	5,9530	5,9492	3,8231E-03	1,10	9,1050	9,1192	-1,3165E-02
0,72	6,0420	6,0298	1,2175E-02	1,11	9,2070	9,1053	1,1684E-02
0,74	6,1560	6,1183	3,7748E-02	1,13	9,3470	9,3421	4,8703E-03
0,75	6,2030	6,1661	3,6937E-02	1,14	9,4330	9,4128	2,0225E-02
0,77	6,3130	6,2705	4,2993E-02	1,15	9,5260	9,4820	4,4010E-02
0,79	6,4260	6,3891	3,6930E-02	1,17	9,6330	9,6165	5,6521E-02
0,81	6,5460	6,5240	2,2012E-02	1,19	9,7880	9,7450	4,3033E-02
0,83	6,6800	6,6748	5,1703E-03	1,21	9,8950	9,8653	2,9689E-02
0,84	6,7450	6,7548	-9,7602E-03	1,22	9,9220	9,9217	3,2113E-04
0,86	6,8910	6,9185	-2,7460E-02	1,24	10,0150	10,0258	-1,0840E-02
0,87	6,9700	7,0002	-3,0312E-02	1,27	10,1350	10,1604	-2,5402E-02
0,88	7,0460	7,0810	-3,5013E-02	1,29	10,2020	10,2370	-3,4059E-02
0,89	7,1190	7,1606	-4,1641E-02	1,35	10,3770	10,4186	-4,1627E-02
0,91	7,2000	7,3169	-2,6948E-02	1,40	10,4880	10,5320	-4,4029E-02
0,92	7,3780	7,3944	-1,6433E-02	1,45	10,5790	10,6234	-4,4365E-02

Tabela 6 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e regressão Não-Linear para a amostra de HA Aldrich

I^c		HA_1	HA_2	HA_3	$\sum_{n=1}^3 HA_n$	HA_4	HA_5	HA_6	$\sum_{n=4}^5 HA_n$	$\sum_{n=1}^5 HA_n$
0,01	$N^{a,b}$	$0,86 \pm 0,02$	$1,95 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,08$	$3,6 \pm 0,1$	$0,522 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,09$	—	$1,01 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,2$
	pK	$3,23 \pm 0,02$	$5,16 \pm 0,04$	$6,69 \pm 0,07$	—	$8,00 \pm 0,02$	$8,00 \pm 0,02$	—	—	—
L	N	$0,85 \pm 0,02$	$1,99 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,04$	$3,64 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,07$	$1,3 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,3$
I	pK	$2,85 \pm 0,08$	$4,60 \pm 0,02$	$6,02 \pm 0,02$	—	$7,4 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,1$	—	—
N	$\Delta pK_{0,01-0,1}$	$0,4 \pm 0,1$	$0,56 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,09$	—	$0,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	—	—	—
E										
A	N	$1,32 \pm 0,09$	$1,9 \pm 0,1$	$0,77 \pm 0,09$	$4,0 \pm 0,3$	$0,49 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,4$
R	pK	$2,85 \pm 0,04$	$4,57 \pm 0,05$	$5,8 \pm 0,2$	—	$7,3 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,4$	—	—
	$\Delta pK_{0,10-1,0}$	$0,0 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,3$	—	$0,1 \pm 0,3$	$-0,1 \pm 0,5$	$-0,2 \pm 0,5$	—	—
N	N	$0,89 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,06$	$3,31 \pm 0,11$	$0,49 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,3$
Ã	pK	$3,26 \pm 0,02$	$5,25 \pm 0,04$	$6,42 \pm 0,06$	—	$7,5 \pm 0,2$	$8,82 \pm 0,09$	$10,23 \pm 0,05$	—	—
O										
L	N	$0,87 \pm 0,04$	$2,04 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,02$	$3,6 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,2$
I	pK	$2,83 \pm 0,07$	$4,66 \pm 0,04$	$6,12 \pm 0,08$	—	$7,46 \pm 0,03$	$8,70 \pm 0,07$	$9,88 \pm 0,08$	—	—
N	$\Delta pK_{0,01-0,10}$	$0,43 \pm 0,09$	$0,59 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,1$	—	$0,0 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	—	—
E	N	$1,3 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$0,79 \pm 0,09$	$4,0 \pm 0,3$	$0,49 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,4$
A	pK	$2,8 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,3$	—	$7,3 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,4$	$9,9 \pm 0,2$	—	—
R	$\Delta pK_{0,10-1,0}$	$0,0 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,4$	—	$0,2 \pm 0,4$	$0,0 \pm 0,5$	$0,0 \pm 0,3$	—	—

a) N = mmol de grupo titulável por grama de HA

b) Resultados correspondem a uma média de três experimentos

c) Força Iônica

Tabela 7 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e regressão não-linear para a amostra de HA extraída de vernicomposto (Húmus de minhoca)

r^2	HA_1	HA_2	HA_3	$\sum_{n=1}^3 HA_n$	HA_4	HA_5	$\sum_{n=4}^5 HA_n$	$\sum_{n=1}^5 HA_n$
0,01	$N^{a,b}$	$0,52 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$1,92 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	$2,8 \pm 0,1$
	pK	$3,60 \pm 0,02$	$5,32 \pm 0,05$	$7,1 \pm 0,1$	—	$8,49 \pm 0,01$	$8,49 \pm 0,01$	—
L	N	$0,52 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,2$
I	pK	$3,4 \pm 0,2$	$5,02 \pm 0,02$	$6,5 \pm 0,2$	—	$8,17 \pm 0,07$	$9,70 \pm 0,06$	—
N	$\Delta pK_{0,01-0,1}$	$0,2 \pm 0,2$	$0,30 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,3$	—	$0,32 \pm 0,08$	$0,0 \pm 0,1$	—
E								
A	N	$0,63 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,03$	$2,8 \pm 0,2$
R	pK	$3,34 \pm 0,02$	$5,07 \pm 0,09$	$6,45 \pm 0,09$	—	$8,00 \pm 0,04$	$9,43 \pm 0,06$	—
	$\Delta pK_{0,10-1,0}$	$0,1 \pm 0,2$	$-0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,3$	—	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	—
N								
0,010	N	$0,50 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,03$	$1,88 \pm 0,09$	$0,28 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,04$	$2,7 \pm 0,1$
	pK	$3,54 \pm 0,03$	$5,29 \pm 0,02$	$6,90 \pm 0,05$	—	$8,3 \pm 0,2$	$9,56 \pm 0,04$	—
O								
	N	$0,45 \pm 0,07$	$1,09 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,03$	$2,0 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,03$	$2,8 \pm 0,2$
L	pK	$3,18 \pm 0,06$	$4,99 \pm 0,02$	$6,48 \pm 0,05$	—	$8,0,1 \pm 0,08$	$9,58 \pm 0,01$	—
I	$\Delta pK_{0,01-0,10}$	$0,36 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,08$	$0,4 \pm 0,1$	—	$0,3 \pm 0,3$	$-0,02 \pm 0,05$	—
N								
E	N	$0,61 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$1,93 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,1$
A	pK	$3,29 \pm 0,03$	$5,01 \pm 0,04$	$6,38 \pm 0,02$	—	$7,95 \pm 0,07$	$9,41 \pm 0,06$	—
R	$\Delta pK_{0,10-1,0}$	$-0,11 \pm 0,09$	$0,0 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,07$	—	$0,1 \pm 0,2$	$0,17 \pm 0,07$	—

a) N = mmol de grupo titulável por grama de HA

c) Força Iônica

b) Resultados correspondem a uma média de três experimentos

Figura 8 - Curvas de titulação obtidas para o ácido húmico Aldrich
 Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a
 titulação de uma suspensão 50,00mL de ácido húmico Aldrich 0,685g/L com
 NaOH 0,10mol/L nos meios iônicos 0,01(■), 0,10(■) e 1,00(■)mol/L NaCl

Figura 9 - Curvas de titulação obtidas para o ácido húmico extraído de
 vermicomposto (Húmus de Minhoca)
 Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a
 titulação de uma suspensão 50,00mL de ácido húmico 0,575g/L com NaOH
 0,10mol/L nos meios iônicos 0,01(■), 0,10(■) e 1,00(■)mol/L NaCl

Tabela 8 - Resultados obtidos pelos métodos clássicos

Ácido Húmico (HA)	Ca(Ac) ₂ ^{1*}	Barita ^{2*}
HA Aldrich	3,64±0,01	6,25±0,06
HÁ de vermicomposto	1,87±0,05	4,0±0,2

n = 3

*1 - Determina a contribuição de acidez relativa aos grupos carboxílicos

*2 - Determina o conteúdo total de grupos carboxílicos + fenólicos

Figura 10 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich ($0,685\text{g/L}^{-1}$) em meio iônico de NaCl $0,01\text{ mol/L}$, segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 11 - Curva de titulação do ácido húmico Aldrich (0,685g⁻¹) em meio iônico de NaCl 0,10 mol/L, segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 12 - Curva de titulação do AH Aldrich ($0,685\text{g/L}^{-1}$) em meio iônico de NaCl $1,00\text{ mol/L}$, segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 13 - Curva de titulação do AH extraído de vermicomposto (Húmus de Minhoca, 0,572g L^{-1}) em força iônica 0,01 mol/L NaCl segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 14 - Curva de titulação do HA extraído de vermicomposto (Húmus de Minhoca, $0,572\text{gL}^{-1}$) em meio iônico de NaCl $0,10\text{ mol/L}$ segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 15 - Curva de titulação do AH extraído de vermicomposto (Húmus de Minhoca, $0,572\text{gL}^{-1}$) em meio iônico de NaCl $1,00\text{ mol/L}$ segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

4.1.1 - Discussão dos resultados obtidos para o HA Aldrich

Como pode ser notado pela Figura 8 e observado na Tabela 6, esta amostra de ácido húmico é fortemente influenciada pela mudança de força iônica do meio.

Para o HA Aldrich, o total de grupos carboxílicos determinado pelo método do acetato de cálcio, $3,64 \pm 0,01$ mmol/g, está concordante com a soma de HA₁ a HA₃ caracterizado por Funções de Gran Modificadas em força iônica 0,01 e 0,1; conforme pode ser observado na Tabela 6. Já o resultado obtido por Regressão Não-linear, para a soma de HA₁ a HA₃ no meio iônico 0,010 mol/L NaCl ($3,3 \pm 0,2$ mmol/g) foi menor que o obtido pelo método do acetato de cálcio e pela titulação no meio iônico 0,10 mol/L NaCl ($3,66 \pm 0,09$ mmol/g). Tal discrepância ocorre devido à estequiometria determinada para a espécie HA₃; $0,46 \pm 0,06$ e $0,75 \pm 0,02$ mmol/g em força iônica 0,01 e 0,10, respectivamente. Este fato pode ser devido a um acúmulo de carga sobre a macromolécula durante a titulação, que pode aumentar a constante de dissociação aparente determinada para os grupos carboxílicos, conduzindo a uma sobreposição com as constantes dos grupos amínicos ou fenólicos.

Os dados da titulação em meio iônico 0,01 mol/L NaCl, analisados por Regressão Não-Linear foram ajustadas assumindo-se a presença de 5 classes de grupos tituláveis; permitindo a determinação de $3,71 \pm 0,04$ mmol/g para soma das classes HA₁ a HA₃ (não presente na Tabela 6). Estes valores são concordantes com os resultados obtidos para o meio iônico 0,10 mol/L NaCl, assim como, os resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas. Foram feitos cálculos empregando o método de Regressão Não-Linear com 5, 6 e 7 sítios ionizáveis. Para cada sítio adicionado, valores de (VHA_n e KHA_n)

são ajustados. O quadrado das somas dos desvios, S_n , resultou $S_5=0,00781$, $S_6= 0,00557$, $S_7= 0,00570$ para os modelos com 5, 6 e 7 classes de sítios ionizáveis, respectivamente. Aplicando a equação 26 para comparar os resultados obtidos pelas resoluções com 5 e 6 sítios ligantes, obteve-se $F(2,52)= 12,46$. A partir dos valores tabelados para o teste estatístico empregado (*teste F*)⁶⁶, $F(2,52)_{99,5\%}=6,07$ indicando que a resolução com 6 classes de sítios ligantes é mais apropriada para o ajuste dos dados experimentais do que a resolução com apenas 5 sítios ligantes, com uma probabilidade maior que 99,5%.

Os resultados determinados para o meio iônico 1,00 mol/L NaCl para as classes HA₁ a HA₃ foram cerca de 7 a 8% superior ao obtido pelo método do acetato de cálcio. É interessante notar a partir da Tabela 6 que a concentração determinada para a classe HA₁ aumenta de $0,87\pm0,04$ para $1,3\pm0,1$ mmol/g (resultados obtidos por Regressão Não-Linear), enquanto que as concentrações determinadas para as classes HA₂ e HA₃ não sofrem alterações em relação aos resultados obtidos em meios iônicos de NaCl 0,10 ou 0,010 mol/L. Este fato sugere que ocorre uma alteração conformacional em força iônica 1,00 mol/L NaCl.

Com o aumento da força iônica, as interações eletrostáticas entre os grupos tornam-se menos intensas, o que leva a uma maior predisposição para que os grupamentos fenólicos sejam titulados em meio aquoso. Com isso os valores de estequiometria total obtida por ambos os métodos de cálculos empregados para os meios iônicos 0,01 ($4,7\pm0,2$ mmol/g) e 0,10 ($4,9\pm0,3$ mmol/g) mol/L NaCl são menores do que para os observados em NaCl 1,00 mol/L ($5,5\pm0,4$ mmol/g). O resultado determinado pelo método da Barita

($6,25 \pm 0,06$ mmol/g) é concordante com o resultado determinado pela titulação potenciométrica em força iônica 1,00 mol/L NaCl ($5,5 \pm 0,4$ mmol/g determinado por Regressão Não-Linear e Funções de Gran Modificadas).

Comparando-se os resultados acima apresentados com trabalhos da literatura⁶⁷⁻⁶⁸ para amostras de HA de diferentes origens pode-se confirmar a validade do método de cálculo aqui empregada. Nestes trabalhos, o número de classes de grupos tituláveis varia de 5 a 6 grupos geralmente; conforme determinou-se pelas Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear.

4.1.2 - Discussão dos resultados obtidos para o ácido húmico extraído de vermicomposto (Húmus de Minhoca)

O total de grupos carboxílicos determinados pelo método do acetato de cálcio para o HA extraído de vermicomposto, $1,87 \pm 0,05$ mmol/g, está concordante com a soma estequiométrica das espécies HA₁ a HA₃ determinada por titulação potenciométrica (vide Tabelas 7 e 8). Os resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear são praticamente os mesmos. A estequiometria determinada para cada uma das classes de grupos tituláveis é independente da força iônica, sugerindo que esta amostra de HA não sofre uma mudança conformacional com a mudança de força iônica do meio. Os efeitos eletrostáticos sofridos são notados observando-se os valores de ΔpK aparentes determinados para os grupos tituláveis. Estes são sistematicamente maiores quando compara-se os valores em força iônica 0,01 e 0,10. Os efeitos eletrostáticos tendem a ser minimizados com o aumento da força iônica. Tal fato pode ser verificado observando-se os valores de ΔpK listados na Tabela 7. A Figura 9 mostra que

as curvas de titulação nos meios iônicos 0,10 mol/L NaCl e 1,00 mol/L NaCl são quase indistinguíveis. Tal fato foi descrito por trabalhos de Ephraim et al⁶⁹ para várias amostras de ácidos húmicos e fúlvicos.

As espécies HA₄ e HA₅ referem-se a grupos fenólicos perfazendo um total de 0,85 mmol/g. Estes grupos comportam-se como ácidos fracos, uma propriedade que é intensificada pelas interações eletrostáticas em função do acúmulo de cargas negativas sobre a macromolécula em altos valores de pH.⁶⁷ Como consequência, parte destes grupos não pode ser determinada por titulação em meio aquoso. O método da Barita, para esta amostra de HA estudada, fornece como resultado um total de 4,0±0,2 mmols/g para o total de sítios ionizáveis. Subtraindo 1,87±0,05 mmols/g de grupos carboxílicos determinados pelo método do acetato de cálcio, é possível calcular a concentração de grupos fenólicos, que é cerca de 2,1±0,3 mmols/g. Este valor é alto comparando-se com o resultado estequiométrico obtido por titulação potenciométrica, o que pode ser explicado pela impossibilidade de titular todos os grupamentos fenólicos em meio aquoso.

Assim como para os grupos carboxílicos, efeitos eletrostáticos não foram notados para os valores de estequiometria determinados para os grupos fenólicos. Os valores de concentração e pKa das espécies HA₄ e HA₅ não apresentam mudanças significativas com a alteração de força iônica do meio.

Comparativamente, os resultados mostram que o HA Aldrich é fortemente influenciado pelo meio iônico, como pôde ser observado através dos resultados apresentados; o que sugere que os efeitos eletrostáticos são mais pronunciados para o HA Aldrich do que para o HA extraído de vermicomposto. Os efeitos eletrostáticos mais intensos no ácido húmico

Aldrich podem ser explicados pelo maior número de sítios ionizáveis, que levam a maior acumulação de cargas. Por outro lado, os efeitos eletrostáticos dependem não apenas da quantidade de grupos tituláveis, mas também da força iônica e distribuição da massa molar, de modo que para uma interpretação mais rigorosa dos resultados seria necessária a determinação da massa molar média de ambas as espécies de HA estudadas no sentido de verificar se a acumulação de carga no HA Aldrich é efetivamente maior que no HA extraído de vermicomposto.

Baseados nos resultados obtidos pode-se dizer que é possível determinar a concentração de cada grupo ionizável bem como seus valores de pKa com boa reprodutibilidade para cada amostra, desde que tomados os devidos cuidados ao se efetuar as titulações. O modelo de cálculo adotado (sítios discretos e avaliação das interações eletrostáticas efetuando-se as titulações em diferentes forças iônicas) mostrou-se compatível com os dados experimentais, pois leva em consideração a identidade química das classes de grupos ionizáveis e os resultados refletem interações inter ou intramoleculares.

4.2 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base da

Microalga Spirulina

4.2.1 Análise Elementar e Absorção no Infravermelho

A Tabela 9, abaixo, mostra os resultados obtidos a partir da análise elementar e análise térmica para verificar a composição química e o teor de cinzas da microalga Spirulina:

Tabela 9 - Análise elementar da amostra de microalga Spirulina

	% H	% C	% N	% O	Teor de Cinzas
Spirulina	6,20	44,92	10,05	38,83	0

Para uma melhor caracterização quanto à natureza química dos grupamentos presentes em sua estrutura, a microalga *Spirulina* foi submetida a análise espectroscópica na região do infravermelho. O espectro é mostrado na Figura 16, a seguir:

Figura 16 - Espectro IV obtido para microalga Spirulina

Análise do espectro IV obtido pela microalga Spirulina:

A chamada radiação infravermelha (IR) corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas. A faixa de maior utilidade está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} . O espectro é característico da molécula como um todo, sendo que certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite, através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas, obter informações à respeito da estrutura do composto estudado.⁷⁰

Na Tabela 10 é mostrado a análise do espectro IV obtido para a microalga *Spirulina* com as bandas indicativas dos grupos funcionais que compõem a estrutura desta microalga:

Tabela 10 - Análise do espectro IV obtido pela microalga Spirulina

% Transmitância	Região de absorção (cm^{-1})	Grupo funcional
67,6	3726	N—H
5,9-64,2	3400-2800	OH da água
90,0	2800-1600	C=O
70,9	2900-2890	C—H
6,5	1655	C=O
15,9	1547
44,6	1453	C—N
35,2	1115	N=N
30,4	1072	P=O
93,8	922	C—H

4.2.2 - Titulações Potenciométricas

Os resultados do tratamento de dados das titulações potenciométricas para a concentração dos sítios ionizáveis HA_n , expressa em mmols por grama de *Spirulina*, são mostrados na Tabela 11 juntamente com os valores de pK, o logaritmo negativo da constante de ionização condicional em termos de concentração. Os resultados obtidos tanto por Regressão Não-Linear como pelas Funções de Gran modificadas foram similares, indicando que não existe vantagem clara de um método numérico sobre o outro no tratamento de dados do material estudado. Nas Figuras 17 a 19 são ilustradas as curvas de titulação da *Spirulina* em força iônica 0,01 e 0,1, segmentadas e linearizadas pelas Funções de Gran Modificadas, assim como a curva ajustada por regressão não linear.

Tabela 11 - Concentração e pKa dos sítios ionizáveis determinados na superfície de Spirulina por titulação potenciométrica ácido-base em força iônica 0,01 e 0,1 à 25,0 ± 0,1°C.

Meio Iônico				
		NaNO ₃ 0,01 mol/L ⁻¹	NaNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹	
Sítio Ionizável	Concentração (mmol g ⁻¹)	pK	Concentração (mmol g ⁻¹)	pK ΔpK
HA ₁	0,56±0,07	4,0 ₀ ±0,1 ₂	0,67±0,09	3,9 ₈ ±0,2 ₀ 0,0±0,3
HA ₂	0,42±0,01	5,3 ₃ ±0,2 ₅	0,37±0,04	5,4 ₈ ±0,3 ₅ 0,2±0,6
HA ₃	0,296±0,001	6,7 ₆ ±0,2 ₆	0,26±0,05	7,0 ₆ ±0,1 ₄ 0,3±0,3
HA ₄	0,15±0,02	8,1 ₂ ±0,6 ₀	0,22±0,02	9,1 ₅ ±0,0 ₇ 1,0±0,7
HA ₅	0,29±0,02	9,7 ₉ ±0,1 ₉	0,34±0,01	10,3 ₄ ±0,0 ₉ 0,6±0,3
Total	1,7 ₂ ±0,1 ₂	-	1,8 ₆ ±0,1 ₈	- -

- Resultados referem-se a média de três titulações para cada meio iônico.

- ΔpK é a diferença entre o pK em força iônica 0,1 e 0,01.

Figura 17 - Curvas de titulação de 51,5 0mL de uma suspensão 2,06g/L obtida para a microalga *Spirulina*. Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear nos meios iônicos 0,01(■), 0,10(■)mol/L NaNO_3

Figura 18 - Curva de titulação de 51,50 mL de uma suspensão 2,06 g/L de microalga *Spirulina*, segmenta e linearizada por Funções de Gran Modificadas na presença de excesso de ácido forte (HCl) usando solução de NaOH 0,1218 mols/L como titulante. Meio iônico $NaNO_3$ 0,01 moles/L

Figura 19 - Curva de titulação de 51,50 mL de uma suspensão 2,06g/L de microalga *Spirulina* na presença de excesso de ácido forte (HCl) usando solução de NaOH 0,1243 mols/L como titulante. Meio iônico $NaNO_3$ 0,10mols/L e suas respectivas Funções de Gran Modificadas

4.2.3 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base da Microalga Spirulina

Foram caracterizadas cinco classes de grupos tituláveis, sendo que HA₁ e HA₂ foram tituladas em uma região de pH típica para grupamentos carboxílicos, os quais podem ser devidos a resíduos dos aminoácidos ácido aspártico e glutâmico constituintes do material protéico da parede celular. Grupos carboxílicos podem ainda ser provenientes de alginatos, que são cadeias poliméricas constituintes da parede celular de algas. A classe de grupos HA₃ poderia ser atribuída a grupos carboxílicos que estariam sendo titulados com pKa anormalmente alto devido a interações eletrostáticas causadas pela criação do campo elétrico decorrente da desprotonação de outros grupos carboxílicos, ou ainda devido a interações locais causadas pela proximidade de outros grupos funcionais na parede celular. Os sítios HA₃ podem ainda ser atribuídos a grupos imidazólicos dos resíduos de histidina do material protéico. As classes HA₄ e HA₅ podem ser atribuídas a grupamentos amínicos e fenólicos provenientes dos aminoácidos lisina e tirosina respectivamente.

A importância de diferentes grupos funcionais na complexação de metais no ambiente aquático depende tanto da concentração destes grupos, como da concentração do metal. Os grupos carboxílicos contribuem com mais de 50% do total de sítios ionizáveis da *Spirulina*, o que explica em parte a importante contribuição de algas para complexação de metais presentes em elevadas concentrações em ambientes aquáticos. Em pHs próximos a neutralidade que são encontrados em águas naturais os grupos carboxílicos estariam disponíveis para processos de complexação (a competição com prótons seria desprezível). Kiefer e colaboradores⁷¹ têm demonstrado que a complexação de cobre com

superfícies de algas verdes e diatomáceas não ocorre em grupos carboxílicos quando o metal está presente em baixas concentrações, mas sim em grupos contendo nitrogênio provenientes de histidina e lisina, que apresentam mais alta afinidade pelo metal. Estes sítios são, entretanto, rapidamente saturados, pois estão presentes em pequenas quantidades, de modo que apenas regulam a concentração livre de metal se este estiver em baixas concentrações. Em pHs acima de 7 a hidrólise dos metais pesados e a consequente formação de hidróxidos insolúveis passa a ser o fator de maior importância para sua remoção da fase aquosa.

A soma das concentrações das classes de sítios ionizáveis HA₁ a HA₅ fornece a capacidade total de ligação de prótons, que foi determinada como sendo $1,75 \pm 0,10$ e $1,86 \pm 0,20$ mmols/g em forças iônicas 0,01 e 0,10 respectivamente. Considerando-se que as duas médias referem-se a triplicatas de titulações, a comparação de seus valores e as respectivas estimativas de desvio padrão levam a um valor experimental de $t = -0,85$, que comparado ao valor tabelado de 2,78 (4 graus de liberdade e 95% de confiança)⁷² indica que não existe diferença estatisticamente significativa entre as concentrações determinadas nas duas condições de força iônica. O mesmo se observa quando o teste t é aplicado para cada uma das classes HA₁ a HA₅, o que sugere que não existem alterações conformacionais na superfícies da alga com a mudança de meio iônico de 0,01 para 0,10 mols L⁻¹ (NaNO₃).

Quando a titulação foi realizada em presença de NaNO₃ 1,0 mol L⁻¹ observou-se que uma quantidade muito maior de solução titulante de NaOH foi necessária para completar a titulação. Uma vez que a massa de alga era aproximadamente a mesma utilizada nas titulações em força iônica 0,01 ou

0,10, pôde-se concluir que estariam ocorrendo alterações conformacionais significativas em força iônica elevada, com possível ruptura da parede celular e titulação do material protéico do interior da célula. Esta suposição foi confirmada pelas fotografias de microscopia de varredura eletrônica que são mostradas na Figura 20 e sugerem que a estrutura cilíndrica da alga é preservada em NaNO_3 0,01 e 0,10 mol L^{-1} , mas não em NaNO_3 1,0 mol/ L.

Os cerca de 1,8 mmols/g de grupos ionizáveis determinados para a *Spirulina* estão coerentes com valores de capacidade total de ligação de prótons obtidos para outros tipos de algas ou superfícies vegetais de meio aquático. Pode-se mencionar a determinação de 2 mmols/g para fitoplâncton marinho *Dunaliella tertiolecta*⁷³ 1 a 2 mmols/g para parede celular de alga *Vaucheria*⁷⁴ e biomassa de plantas marinhas¹⁶ e 2,6 mmols/g para *Sargassum*.⁷⁵

Kiefer e colaboradores⁷¹ determinaram 0,97 mmols/g para a diatomácea *Cyclotella cryptica* e 0,91 mmols/g para a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Apesar dos valores similares encontrados para as duas espécies, as formas de curvas de titulação sugerem uma maior variedade de tipos de grupos tituláveis na superfície da alga verde em relação à diatomácea, que é discutido pelos autores, mas não é quantificado pelo modelo eletrostático empregado, que assume para as duas espécies de algas a presença de duas classes de sítios ionizáveis, sendo uma na região de $\text{pH} < \text{pH}_{\text{zpc}}$ e outro na região de $\text{pH} > \text{pH}_{\text{zpc}}$ (pH_{zpc} é o pH no ponto de carga zero).⁷⁶

(a)

(b)

(c)

Figura 20 – Fotografias de microscopia de varredura eletrônica da microalga *Spirulina* em força iônica (a) 0,01; (b) 0,10 e (c) 1,0. As fotografias foram obtidas com um aumento de 3000 vezes. A escala na figura corresponde a um comprimento de 5 μ m

Para macromoléculas que apresentam baixa acumulação de carga durante a titulação e têm estrutura rígida, a contribuição do termo eletrostático $0,434e\psi/kT$ discutido na Seção 1.3 (equação 6) é pequena, principalmente em meios de força iônica elevada. Quando o modelo de distribuição de sítios discretos é adotado, o termo $0,434e\psi/kT$ é desprezado e a suspensão é tratada como se fosse composta por uma mistura de ácidos monopróticos. Isto certamente é uma aproximação, assim como é uma aproximação dos modelos eletrostáticos desprezar a heterogeneidade química na superfície das algas.

Os resultados da Tabela 11 mostram que as constantes de ionização determinadas para as cinco classes de sítios ionizáveis sofrem pouca influência com a variação da força iônica do meio, sugerindo que a heterogeneidade química da superfície celular da *Spirulina* é o fator principal que governa as curvas de titulação. A influência de interações eletrostáticas foi muito pouco pronunciada, de modo que o termo $0,434e\psi/kT$ pode ser desprezado nestas titulações. Isto pode ser explicado pela baixa densidade de carga acumulada na *Spirulina*, bem como por sua estrutura rígida.

Os métodos de cálculo, propostos inicialmente para determinação de ácidos em misturas, mostraram-se adequados para caracterização ácido base da superfície da alga *Spirulina*, adotando-se o modelo de distribuição de sítios discretos. A metodologia pode ser aplicada na caracterização de superfícies de outras espécies vegetais, permitindo quantificar não só os grupos em maior concentração como os carboxílicos, mas também grupos de menor concentração como os imidazólicos e amínicos que apresentam alta afinidade

por determinados metais pesados e exercem importante papel na complexação destes metais quando presentes em baixas concentrações.

4.3 – Resultados obtidos para a caracterização ácido-base para o ácido algínico

A tabela 12 mostra os resultados obtidos a partir da análise elementar e análise térmica para verificar a composição química e o teor de cinzas do ácido Algínico.

Tabela 12 – Análise elementar da amostra de ácido algínico

	%H	%C	%O*	Teor de cinzas (%)
Ácido Algínico _{TEÓRICO}	4,55	40,91	54,54	0
Ácido Algínico _{EXPERIMENTAL}	10,03	45,86	44,11	0

* calculada por diferença

Na tabela 13 são mostrados os resultados obtidos para as titulações de ácido algínico utilizando Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear. Nas Figuras 21 a 24 são mostradas as curvas de titulações experimentais ajustadas por Regressão Não-Linear, assim como as curvas de titulação linearizadas e segmentadas por Funções de Gran Modificadas nos meios iônicos de NaNO_3 0,01; 0,10 e 1,00 mol/L. Previamente foi feita uma série de titulações para se inferir qual a melhor faixa de concentração para se trabalhar com o ácido algínico, verificando-se nas condições experimentais do laboratório que esta concentração deve ser; $0,35 \leq C_{\text{ÁCIDO ALGÍNICO}} \leq 0,55$ G/l. Suspensões de ácido algínico foram preparadas diretamente na cela de titulação em presença de 50,00 mL de NaNO_3 0,010; 0,10 e 1,00 mol/L como foi descrito no capítulo de materiais e métodos.

Tabela 13 – Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e Regressão Não-Linear para as curvas de titulação

potenciométricas do ácido algínico

	f		HA_1
Funções De Gran Modificadas	0,01	$N^{a,b}$	4,20±0,40
		pKa	3,77±0,01
	0,10	$N^{a,b}$	5,0±0,3
		pka	3,30±0,08
		$\Delta pk_{0,01} - 0,10$	0,48±0,020
	1,00	$N^{a,b}$	4,62±0,25
pka		2,55±0,05	
$\Delta pk_{0,01} - 0,10$		0,75±0,20	
Regressão Não Linear	0,01	$N^{a,b}$	4,20±0,30
		pKa	3,76±0,01
	0,10	$N^{a,b}$	5,0±0,6
		pka	3,30±0,01
		$\Delta pk_{0,01} - 0,10$	0,47±0,22
	1,00	$N^{a,b}$	4,62±0,25
pka		2,60±0,06	
$\Delta pk_{0,01} - 0,10$		0,70±0,20	

a) N = mmol de grupo titulável por grama de amostra

b) Resultados correspondem a uma média de 3 experimentos

c) Força iônica

a) N = mmol de grupo titulável por grama de amostra c) Força iônica b) Resultados correspondem a uma média de 3 experimentos

Figura 21 - Curvas de titulação obtidas para o ácido Algínico
 Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão 50,00mL de Algínico 0,35g/L nos meios iônicos 1,00(■), 0,10(■) e 0,01(■)mol/L NaNO_3

Figura 22 - Curva de titulação do ácido algínico em meio iônico de NaNO_3 0,01 mol/L, linearizada por sua respectiva Função de Gran Modificada

Figura 23 - Curva de titulação do ácido algínico em meio iônico de NaNO_3 0,10 mol/L, linearizada por sua respectiva Função de Gran Modificada

Figura 24 - Curva de titulação do ácido algínico em meio iônico de NaNO_3 1,00 mol/L, linearizada por sua respectiva Função de Gran Modificada

4.3.1 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base do ácido Algínico

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 13, foi obtida apenas uma classe de grupo titulável cujo pK diminui com o aumento da força iônica. Este fato sugere que apenas os grupamentos carboxílicos foram titulados. Os grupos OH da macromolécula (Figura 2) comportam-se como ácidos muito fracos, não sendo, portanto, titulados nos meios estudados. É interessante notar que apesar do acúmulo de carga negativa sobre a macromolécula, o que leva a uma significativa variação do pK aparente dos grupos tituláveis de acordo com a equação 6 (Seção 1.3), não se observa a divisão dos grupos carboxílicos em subgrupos com pKas distintos ao se tratar os dados experimentais com o modelo dos “sítios discretos”. Esta divisão de um grupo em subclasses havia sido observada em um estudo anterior²⁶ em que curvas de titulação de polieletrólitos simulados de acordo com o modelo puramente eletrostático (equação 6) eram tratados pelo modelo dos sítios discretos.

Os dois métodos de cálculo levaram a resultados similares quanto à estequiometria dos grupos tituláveis. Os valores de pKa, entretanto, mostraram grande variação com a força iônica, indicando que o modelo dos sítios discretos, apesar de útil para fornecer a estequiometria dos grupos tituláveis, permite apenas estimar constantes de dissociação condicionais. Os valores de pKa assim como a estequiometria obtida para as titulações são válidas somente para as condições experimentais em que foram realizadas.

Baseando-se na estrutura molecular do ácido algínico (Figura 2), seria esperado que fossem titulados 5,70 mmols/g de sítios ionizáveis. O valor

obtido entre 4,20 e 5,00 mmols/g possivelmente pode ser explicado pela não homogeneidade do material, conforme observado através da Tabela 12, que compara a composição elementar obtida experimentalmente para a amostra e a composição esperada com base na estrutura molecular do monômero mostrada na Figura 2. Deve-se notar que a amostra estudada teve um teor de oxigênio significativamente maior do que o esperado, enquanto a estequiometria obtida para os grupos carboxílicos foi menor. Os dados disponíveis no momento, entretanto, não permitem concluir a razão das diferenças observadas entre os valores esperados e obtidos experimentalmente.

É interessante notar que, apesar do ácido algínico ser um dos constituintes da parede celular, a marcante influência da força iônica nos resultados observada nas titulações do ácido isolado, não foram observados nas titulações da alga *Spirulina*. Uma possível explicação pode residir no fato que, na parede celular, o ácido algínico faz parte de uma matriz celulósica rígida, que diminui a sua suscetibilidade à variações de volume e conformação com as alterações da força iônica ou pH. A maior rigidez da parede celular minimizaria as interações carga-carga na parede celular.

4.4 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base de ácido poliacrílico (APA) com massa molar (Mw) de 2000 e 250000 g/mol

A Tabela 14 mostra os resultados obtidos a partir da análise elementar e análise térmica para verificar a composição química e o teor de cinzas destes compostos:

Tabela 14 - Análise elementar das amostras de ácido poliacrílico (APA) estudadas

	% H	% C	% O*	Teor de Cinzas (%)
APA _{TEÓRICO}	5,55	50,00	44,44	0
APA _{Mw=2000} EXPERIMENTAL	6,29	49,61	44,10	0
APA _{Mw=250000} EXPERIMENTAL	5,84	47,01	47,15	0

*calculada por diferença

Afim de se avaliar qual dos efeitos (força iônica e massa molar) é mais significativo na distribuição da estequiometria e pKa dos sítios ionizáveis de polieletrólitos o ácido poliacrílico foi utilizado como composto modelo para se estudar estes efeitos.⁶⁹

4.4.1 - Resultados obtidos para APA Mw = 2000g/mol

Suspensões de APA com Mw = 2000g/mol com concentração de 1,50 g/L foram tituladas potenciométricamente nos meios iônicos de NaNO₃ 0,10 e 1,00 mol/L. Na Tabela 15 são mostrados os resultados obtidos através do tratamento dos dados experimentais por Funções de Gran Modificadas e

Regressão Não-Linear dos dados.⁷⁶ Nas Figuras 25 a 27 são mostradas as curvas de titulação experimentais e calculadas por regressão não-linear, bem como as curvas linearizadas e segmentadas por suas respectivas Funções de Gran Modificadas.

Tabela 15 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e por Regressão Não-Linear para as curvas de titulação potenciométrica ácido poliacrílico com Mw=2000g/mol

	I ^C		HA ₁	HA ₂	HA ₃	$\sum_{n=1}^3 HA_n$
Fun- ções de	0,10	N ^{a,b}	3,86±0,37	3,30±0,30	2,15±0,63	9,31±1,30
		pK	4,18±0,05	5,48±0,07	6,71±0,30	
Gran		N	4,43±0,46	3,56±0,44	2,5±0,05	10,49±0,95
Mo-	1,00	pK	4,02±0,14	4,87±0,23	5,87±0,09	
difi- cadas		$\Delta pK_{1,00-0,10}$	-0,13±0,20	-0,61±0,30	-0,84±0,30	
N	0,10	N	3,90±0,40	3,40±0,20	2,18±0,25	9,48±0,85
Ã		pK	4,20±0,05	5,50±0,10	6,75±0,35	
O						
LI-		N	4,55±0,48	3,56±0,45	2,55±0,05	10,66±0,63
NE-	1,00	pK	4,25±0,20	4,95±0,20	5,92±0,75	
AR		$\Delta pK_{1,00-0,10}$	0,05±0,30	-0,55±0,30	-0,83±0,80	

a) N = mmol de grupo titulável por grama de amostra
Resultados correspondem a uma média de três experimentos c) Força iônica

Figura 25 - Curvas de titulação obtida para o APA Mw = 2000g/mol
Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão de 50,00mL de APA 1,50g/L
nos meios de NaNO₃ 1,00(■) e 0,10(●)mol/L.

Figura 26 - Curva de titulação para o APA Mw = 2000g/mol em meio iônico de NaNO₃ 0,10 mol/L, segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 27 - Curva de titulação para o APA Mw = 2000g/mol em meio iônico de NaNO₃ 1,00 mol/L, segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Nas figuras 28(a) e 28(b) os resultados mostrados na tabela anterior são analisados graficamente:

Figura 28 - (a) Concentração de sítios discretos seus valores de pKa para o APA Mw=2000 g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00. Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas

Figura 28 - (b) Concentração de sítios discretos seus valores de pKa. Titulações do APA Mw=2000g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00 resultados obtidos por Regressão Não-Linear

4.4.2 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base do APA com $M_w = 2000$ g/mol

Foram realizadas várias etapas de cálculo onde foram avaliadas o número de iterações; o coeficiente de correlação para cada resolução obtida; verificando-se que o resultado mais satisfatório é o que fornece três classes de grupos tituláveis, como é mostrado na Tabela 15. Ambos métodos de cálculo fornecem resultados semelhantes, tanto com relação ao número de classes de grupos tituláveis, como com relação à distribuição estequiométrica e valores de pK, como pode ser visualizado através dos gráficos de barras mostrados nas Figuras 28(a) e 28(b). O $\Delta pK_{(HA_3 - HA_1)}$ ($2,5 \pm 0,4$) em força iônica 1 foi menor do que do que em força iônica 0,10 o que está coerente com a teoria eletrostática. Em força iônica mais elevada, as interações eletrostáticas são minimizadas pela maior quantidade de íons Na^+ e NO_3^- (neutralização de cargas) em solução e os grupos carboxílicos são titulados em uma faixa mais estreita de pK, ou seja, em valores mais próximos àqueles que seriam observados na ausência de interações eletrostáticas. O $\Delta pK_{1,00-0,10}$ também sugere isto, podendo-se observar que para HA_1 o ΔpK é $0,1 \pm 0,2$, ou seja, os valores de pK não são estatisticamente diferentes. No início das titulações não existe carga negativa na macromolécula e todos os grupos carboxílicos ainda estão protonados. Com o decorrer da titulação, e conseqüente aparecimento das cargas negativas, as interações eletrostáticas começam a se refletir nos valores de pK mais altos em força iônica 0,10 ($\Delta pK = -0,6 \pm 0,3$ para HA_2 e $\Delta pK = -0,8 \pm 0,3$ para HA_3).

4.4.3 - Resultados obtidos para a caracterização ácido-base do ácido poliacrílico (APA) de massa molar (M_w) = 250000 g/mol

Suspensões de APA com $M_w = 250000 \text{ g/mol}$ com concentração de 0,458g/L foram tituladas potenciométricamente nos meios iônicos de NaNO_3 0,10 e 1,00 mol/L. Na Tabela 16 são mostrados os resultados obtidos pelo tratamento de dados empregando as Funções de Gran Modificadas e Regressão-Não Linear.⁷⁶ Nas Figuras 29 a 31 são mostradas as curvas de titulação experimentais e calculadas por regressão não-linear; bem como as curvas linearizadas e segmentadas por suas respectivas Funções de Gran Modificadas.

Tabela 16 - Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas e por Regressão Não-Linear para as curvas de titulação potenciométrica ácido poliacrílico com Mw=250000g/mol

	I^C		HA ₁	HA ₂	HA ₃	$\sum_{n=1}^3 HA_n$
Fun- ções de	0,10	N ^{a,b}	2,90±0,04	5,20±0,09	2,80±0,07	10,90±0,20
		pK	3,90±0,01	5,40±0,03	6,30±0,01	
Gran		N	2,89±0,45	5,64±0,06	2,69±0,20	11,22±0,71
Mo-	1,00	pK	3,65±0,44	4,75±0,14	6,02±0,08	
difi- cadas		$\Delta pK_{1,00-0,10}$	0,25±0,98	0,65±0,20	0,28±0,09	
N	0,10	N	2,80±0,02	5,25±0,03	2,70±0,05	10,75±0,10
Ã		pK	3,85±0,01	5,45±0,03	6,35±0,01	
O						
LI-		N	2,75±0,30	5,52±0,40	2,75±0,10	11,02±0,80
NE-	1,00	pK	3,58±0,03	4,60±0,03	6,12±0,04	
AR		$\Delta pK_{1,00-0,10}$	0,27±0,60	0,85±0,10	0,23±0,20	

a) N = mmol de grupo titulável por grama de amostra
Resultados correspondem a uma média de três experimentos c) Força Iônica

Figura 29 - Curvas de titulação obtida para o APA $M_w = 250000\text{g/mol}$ Curva experimental (—) e calculada por regressão não-linear para a titulação de uma suspensão de 50,00mL de APA 1,50g/L nos meios iônicos de NaNO_3 0,10(■) e 1,00(■)mol/L

Figura 30 - Curva de titulação para o APA Mw = 250000g/mol em meio iônico de $NaNO_3$ 0,10 mol/L segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Figura 31 - Curva de titulação para o APA Mw = 250000g/mol em meio iônico de NaNO₃ 1,00 mol/L, segmentada e linearizada por suas respectivas Funções de Gran Modificadas

Nas Figuras 32(a) e 32(b) os resultados mostrados na tabela anterior são analisados graficamente:

Fig. 32 - (a) Concentração de sítios discretos seus valores de pK para o APA com Mw=250000 g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00. Resultados obtidos por Funções de Gran Modificadas.

Figura 32 - (b) Concentração de sítios discretos e seus valores de pKa para o APA Mw=250000g/mol em forças iônicas 0,10 e 1,00 resultados obtidos por Regressão Não-Linear

4.4.4 - Discussão dos resultados obtidos para a caracterização ácido-base do APA com $M_w = 250000$ g/mol

Assim como foi feito para o APA com $M_w = 2000$, também foram realizadas várias etapas de cálculo para o APA com $M_w = 250000$, onde foram avaliadas o número de iterações; o coeficiente de correlação para cada resolução obtida; verificando-se que o resultado mais satisfatório é o que fornece três classes de grupos tituláveis, como é mostrado na Tabela 16. Ambos os métodos de cálculo fornecem resultados semelhantes tanto com relação ao número de classes de grupos tituláveis como com relação à distribuição estequiométrica e valores de pK , como pode ser visualizado através dos gráficos mostrados nas figuras 32(a) e 32(b).

4.4.5 - Avaliação dos resultados em função da massa molar das amostras de ácidos poliacrílicos estudadas

Confrontando-se os resultados obtidos para as titulações é interessante notar que o ΔpK ($HA_3 - HA_1$) para força iônica 0,10 e 1,00 são exatamente os mesmos ($2,4 \pm 0,5$ para força iônica 1,00 e $2,4 \pm 0,0$ para força iônica 0,10). Esperava-se que o ΔpK para força iônica 0,10 fosse bem maior, ou que houvesse redistribuição estequiométrica dos grupos em função do maior acúmulo de cargas negativas na macromolécula (valor teórico considerando $M_w = 250000$ g/mol seria 3472 cargas/mol; enquanto que para $M_w = 2000$ g/mol este valor seria 27,8 cargas/mol). Uma explicação para este fato pode residir no tamanho muito maior da molécula com $M_w = 250000$ g/mol; que pode levar ao acesso aleatório dos íons OH^- titulante aos sítios $COOH$. A distância entre

estes sítios pode ser suficientemente alta para minimizar interações eletrostáticas durante a fase inicial da titulação. Estas interações eletrostáticas entretanto ocorrem, o que leva à separação dos grupos COOH idênticos a serem determinados como 3 classes distintas, mas o efeito do tamanho da macromolécula faz com que este fato ocorra de maneira diferenciada em relação ao APA de massa molar 2000g/mol. Para ambos APA, os resultados sugerem que a massa molar de cada unidade de grupo carboxílico é aproximadamente 90 (o valor teórico calculado a partir da estrutura molecular seria 72), o que gera uma densidade de carga bem superior àquela de alguns ácidos húmicos, que estariam na faixa de 286 g/mol por sítio titulável como pode ser confirmado a partir das referências 35 e 60. Estes fatos sugerem que a heterogeneidade química é um fator de maior peso do que as interações eletrostáticas nas titulações de substâncias húmicas, ou superfícies de algas, ao contrário do que foi observado para os ácidos poliacrílicos e ácido algínico.

Tais resultados são concordantes com o empregado pela escola do modelo eletrostático.⁷⁷⁻⁸⁰

5 - Conclusões

1 - Os métodos de cálculo propostos mostraram-se adequados para a caracterização ácido-base dos polieletrólitos estudados, adotando-se o modelo de distribuição de sítios discretos. Comparativamente os métodos de cálculo adotados fornecem resultados similares, porém o método de regressão não-linear permite que o tratamento de dados seja efetuado com um menor número de dados experimentais.

2 - Avaliando-se a influência das interações eletrostáticas nos resultados obtidos fica claro que estes efeitos são mais significativos nos valores de pK calculados do que com relação à distribuição da estequiometria dos grupos tituláveis.

3 - Os resultados sugerem que os dados de titulação do HA Aldrich seriam adequadamente representados por um modelo que leve em consideração a heterogeneidade química e os efeitos de interação eletrostática. O ácido húmico extraído de vermicomposto (Húmus de minhoca), apresenta um menor número de sítios ionizáveis, que dependendo da distribuição de massas molares, leva a uma menor acumulação de carga durante a titulação, de modo que as interações eletrostáticas são pouco pronunciadas. Com isso a heterogeneidade química passa a ser o principal fator que governa as propriedades ácido-base, de modo que a curva de titulação para esta amostra de HA é representada adequadamente pelo modelo de sítios discretos.

4 - As titulações da microalga *Spirulina* mostraram que a estrutura rígida e a heterogeneidade química dos sítios ionizáveis presentes na superfície da parede celular minimiza os efeitos eletrostáticos de maneira que o modelo de sítios discretos representa adequadamente os dados experimentais.

5 - Os resultados obtidos para o ácido algínico e ácidos poliacrílicos, amostras homogêneas quanto à natureza química dos grupos ionizáveis, mas com elevada acumulação de carga durante a titulação, demonstram que o modelo de sítios discretos permite determinar a estequiometria total dos sítios ionizáveis. A distribuição dos grupos tituláveis determinada, assim como os valores de pK, são dependentes da massa molar e da força iônica do meio. Para estes materiais o modelo eletrostático, ou de distribuição contínua, devem ser mais adequados do que o modelo de sítios discretos.

6 – Perspectivas futuras

1 – Determinação da massa molar das amostras de ácido húmico analisadas

2 – Automatização do sistema de titulação potenciométrica

3 - Escrever os programas utilizados em linguagem computacional Visual Basic

7 - Bibliografia

- 1 - J. Buffle, "Complexation Reactions in Aquatic Systems. An Analytical Approach", Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, New York, 1990.
- 2 - F. J. Stevenson, Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions, Wiley Interscience, New York, 1982.
- 3 - W. Flaig; H. Beutelspacher and E. Rietz; "Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances", Springer Verlag, London, 1975.
- 4 - J. R. De Paula, "Estudo da influência das substâncias húmicas na absorção de metais por plantas, através de técnicas analíticas"; Dissertação de Mestrado, Instituto de Química e Física de São Carlos, São Carlos, 1992.
- 5 - R. L. Wershaw; D. J. Pinckney; E. C. Llaguno and V. Vicent Beckett; *Anal. Chim. Acta*, **232** (1990), 31.
- 6 - R. L. Wershaw, K. A. Thorn and D. J. Pinckney; *Environ. Technol. Lett.*; **9** (1988), 53.
- 7 - N. Senesi; F. R. Rizzi; P. Dellino; P. Aquafredda; *Col. Surf., A Physicochem. Eng. Aspects*; **127** (1997), 57.
- 8 - M. C. P. Barros; J. R. de Paula; M. O. O. Rezende; *Química Nova*, **17** (1994), 376.
- 9 - R. M. Town; H. Kipton; J. Powell; *Anal. Chim. Acta*, **256** (1992), 81.
- 10 - C. Van Baalen; *Methods in Enzymology*, **69** (1980), 38.
- 11 - R. Y. Stanier; R. Kunisawa; M. Mandel; G. Cohen-Bazire, *Bacteriological Reviews*, **35** (1971), 171.
- 12 - M. Yagimoto; H. Saitoh; *J. Ferm. Technol.*, **60** (1982), 305.
- 13 - N. Nakaya; Y. Homma; Y. Goto; *Nut. Rep. Int.*, **35** (1988), 1329.
- 14 - G. Z. Caire; M. S. Cano; M. C. Z. Mulé; *Int. J. Exp. Bot.*; **57** (1995), 93.

- 15 - W. J. Oswald.; H. B. Gotaas; C. G. Golueke; W. R. Kellen; *Sew. and Ind. Wastes*, **29** (1957), 437.
- 16 - E. Fourest; B. Volesky; *Environ. Sci. Technol.* **30** (1996), 277.
- 17 - D. A. Rees; Jane Welsh; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **16** (1977), 214.
- 18 - S. Algeret, M. T. Escalas and J. A. M. Marinsk, *Talanta* , **31** (1984), 683.
- 19 - L. K. Jang; N. Harpt; D. Grasmick; L. N. Vuong and G. Geesey; *J. Phys. Chem.* , **94** (1990), 482.
- 20 - L. K. Jang; N. Harpt; T Uyen; D. Grasmick; G. Geesey; J; *Pol. Sci. B, Polymeer Phys.* , **27** (1989), 1301.
- 21 - C. Jiaping, F. Tendeyong, S. Yiacoumi; *Environ. Sci. Technol.*, **31** (1997), 1433.
- 22 - J. E. Glass; "Polymers in Aqueous media - Performance Through Association"; Advances in Chemistry Series, n°. 223; American Chemical Society, Washington, 1989.
- 23 - J. A. Marinsky; J. Ephraim; *Environ. Sci. Technol.*, **20** (1986), 349.
- 24 - N. Paxéus; M. Wedborg; *Anal. Chim. Acta* ,**169** (1985), 87.
- 25 - L. M. Aleixo; O. E. S.; W. F. da Costa; *Anal. Chim. Acta* , **257** (1992), 35
- 26 - J. C. Masini; *Anal. Chim. Acta* , **283** (1993), 803.
- 27 - E. M. Perdue; C. R. A. Lytle; *Environ. Sci. Technol.*, **17** (1983), 654.
- 28 - D. A. Dzomback; W. Fish and F. M. M. Morel; *Environ. Sci. Technol.*, **20** (7) 1986, 669.
- 29 - W. Fish; D. A. Dzomback and M. M. Morel; *Environ. Sci. Technol.* **20** (7) 1986, 676.
- 30 - C. Tanford; *Adv. Protein. Chem.* , **17** (1962), 70.
- 31 - E. Tipping; M. M. Redy; M. A. Hurley; *Environ. Sci. Technol.*, **24** (1990);

1700.

32 - M. Fukushima; S. Tanaka; M. Taga; H. Nakamura; *Anal. Chim. Acta*, **302** (1995), 365.

33 - J. A. Marisky; S. Gupta; P. Shindler; *J. Coll. Int. Sci.*, **89 (2)** (1982); 412.

34 - Im. M. Kolthoff and E. B. Sandell; "Textbook of Quantitative Inorganic Analysis"; Mc Millan; New York, 1967.

35 - L. M. Aleixo; "Estudos potenciométricos de Equilíbrios Ácido - Base e de Formação de Complexos em solução Aquosa; Tese de Doutorado; Instituto de Química; Universidade Estadual de Campinas; Campinas; 1980.

36 - N. M. S. Vasconcelos; "Caracterização e determinação de grupos tituláveis de proteínas e aminoácidos em solução concentrada de uréia através da linearização de curvas de titulação potenciométrica; Tese de Doutorado; Instituto de Química; Universidade Estadual de Campinas; Campinas; 1984.

37 - M. C. Silva; Otimização das condições de titulações potenciométricas de proteínas em soluções de uréia concentrada, titulação potenciométrica de Bence Jones"; Tese de Doutorado; Instituto de Química; Universidade Estadual de Campinas; Campinas; 1986.

38 - A. I. Vogel; "Análise Inorgânica Quantitativa; 4ª. Edição ; Editora Guanabara; Rio de Janeiro; 1981.

39 - L. Meites; N. Fanelli; P. Papoff; *Anal Chim. Acta*, **192** (1987), 33.

40 - M. Betti; P. Papoff; L. Meites; *Anal Chim. Acta*, **182** (1986), 133.

41 - A. Ivaska; I. Nagypal; *Talanta*, **27** (1980); 721.

42 - A. Ivaska; *Talanta*, **21** (1974), 721.

43 - L. M. Aleixo; O. E. S. Godinho; *Química Nova*, **7(1)** (1984), 32.

44 - L. M. Aleixo; O. E. S. Godinho; *Química Nova*, **10(2)** (1987), 83.

- 45 - M. Boss; *Anal. Chim. Acta*, **90** (1977), 61.
- 46 - G. Arena; E. Rizzarelli; S. Sammartano; C. Rigano; *Talanta*, **26** (1979), 1.
- 47 - G. Gran; *Anal. Chim. Acta*, **206** (1988), 111.
- 48 - J. C. Masini; "Aperfeiçoamentos na metodologias de titulação potenciométrica de polieletrólitos com ênfase a proteínas nativas e desnaturadas"; Tese de doutoramento; Instituto de Química; Universidade Estadual de Campinas; Campinas; 1990.
- 49 - V. Nurchi and G. Crisponi; *Anal. Chim. Acta.*, **222** (1989), 359.
- 50 - J. J. B. Baeza; G. R. Ramos and C. M. Fernandez; *Anal. Chim. Acta*, **223**
- 51 - G. Crisponi; V. Nurchi, T. Pintori and E. F. Trogu; *Anal. Chim. Acta*, **184** (1986), 77.
- 52 - J. C. Masini; *Talanta*, **41** (1994), 1383.
- 53 - J. C. Masini; G. Abate; E. C. Lima; *Anal. Chim. Acta*, **364** (1998); 223.
- 54 - L. Pehrson; F. Ingman; A. Johansson; *Talanta*, **23** (1976), 769.
- 55 - G. Gran; *Analyst*, **77** (1952), 77.
- 56 - M. D. S. Seymour; J. W. Clayton, Q. Fernando; *Anal. Chem.*, **49** (1977), 1429.
- 57 - G. Borato; "Basic para Cientistas e Engenheiros"; Livros Técnicos e científicos; Rio de Janeiro; 1984.
- 58 - M. Cernik; M. Borkovec; J. C. Westall; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995); 413.
- 59 - P. J. Munson; D. Rodbard; *Anal. Biochem.*, **107** (1980), 220.
- 60 - J. F. Rusling; *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **8** (1979), 1.
- 61 - W. F. da Costa; "Estudos sobre a linearização de curvas de titulação potenciométrica"; Tese de Doutorado; Universidade Estadual de Campinas;

Campinas, 1989.

62 - J. C. Masini; O. E. S. Godinho; L. M. Aleixo; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **360** (1998), 104.

63 - J. A. Leenheer; R. L. Wershaw; M. M. Redy; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995), 399.

64 - B. Leuenberger; P. W. Shindler; *Anal. Chem.*, **58** (1986), 1471.

65 - Shcnitzer, M.; Chemical Spectroscopic and Thermal Methods for the Classification and Characterization of Humic Substances, in Proc. Intern. Meetings on Humic Substances; Pudoc, Wageningen, 1972, Apud: Stevenson.

66 - G. W. Snedecor; W. G. Cochran; "Statistical Methods"; Iowa State University Press/AMES; 8th. Ed.; 1989.

67 - E. Tipping; M. A. Hurley; *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56** (1896), 354.

68 - D. S. Gamble; *Can. J. Chem.*, **50** (1972), 260.

69 - J. Ephraim; C. Petterson; M. Nordém; B. Allard; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995), 622.

70 - R. M. Silverstein; G. C. Bassler; T. C. Morrill; "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos"; tradução de Ricardo Bicca Alencastro; 5^a Edição; Editora Guanabara Koogan; Rio de Janeiro; 1994.

71 - E. Kiefer; L. Sigg; P. Shossler; *Environ. Sci. Technol.*, **31** (1997), 759.

72 - J. C. Miller; J. N. Miller; "Statistics for Analytical Chemistry"; Ellis Horwood Limited; Chichester; W. Sussex; 1988.

73 - M. Gonzalez-Dávila; J. M. Snatana Cassiano; J. Perez-Pena; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995), 289.

74 - R. H. Crist; K. Oberholser; N. Shank; M. Ngiyen; *Environ. Sci. Technol.*, **51** (1981), 1212.

- 75 - S. Shiewer; B. Volesky; *Environ. Sci. Technol.*, **31** (1997), 1683.
- 76 - E. C. de Lima; J. C. Masini; "Caracterização ácido-base da superfície de espécies mistas da Alga *Spirulina* através de titulação potenciométrica e modelo de distribuição de sítios discretos"; artigo aceito para publicação na revista Química Nova.
- 77 - S. E. Cabaniss; M. S. Shuman; B. J. Collins; "Metal-organic binding: A comparison of models" in Complexation of Trace Metals in Natural Waters; C. J. M. Kramer; J. C. Dunker; Eds.; Martinus Nijhoff/Dr. J. W. Junk Publishers: Boston, MA, 1984; pp 165-179.
- 78 - C. Tanford; "Physical chemistry of Macromolecules", Wiley, New York, 1961.
- 79 - S. H. Sutheimer, M. J. Ferraco; S. E. Cabaniss; *Anal Chim. Acta*, **304** (1995), 187.
- 80 - J. I. Kim; G. Buckau; G. H. Li; H. Dushner; N. Psarros; *Fresenius J. Anal. Chem.* , **338** (1990), 245.

ANEXO 1

```

10 INPUT "NUMERO MAXIMO DE GRUPOS E PONTOS - N1,N2"; N1, N2
   INPUT "TITULACAO - DIA/MES/ANO"; D$
20 DIM A(N1, N2), Y(N1, N2), F2(N1, N2), F6(N1, N2), F9(N1, N2)
   DIM V(N2), H1(N2), H2(N2), F3(N2), F4(N2), F1(N2), VE(N1), H(N2), F8(N2)
   DIM P1(N1), P2(N2), F5(N2), K1(N2), KH(N1), R(N1), S(N1)
30 READ VO, CB, KW
   PRINT VO, CB, KW
   FOR I = 1 TO N1
     READ KH(I)
     PRINT KH(I);
   NEXT I
40 FOR J = 1 TO N2
   READ V(J), H(J)
   PRINT J, V(J), H(J)
   NEXT J
70 FOR J = 1 TO N2
   H1(J) = (10 ^ (-H(J)))
   H2(J) = (KW / (10 ^ (-H(J))))
   NEXT J
   GOTO 130
80 INPUT "VALORES DE N1 E N2 PARA HCL"; P1(0), P2(0)
90 FOR J = P1(0) TO P1(0) + P2(0)
   F1(J) = 0
   F4(J) = ((H1(J) - H2(J)) * (VO + V(J)) + V(J) * CB) / CB
   F3(J) = F4(J)
   KY = F4(J) + KY
   NEXT J
   J1 = P1(0)
   J2 = P2(0)
100 GOSUB 320

110 KH(0) = -X1 / Y1
   K1 = Y + KH(0) * X
   VE(0) = KY / (P1(0) + P2(0))
   GOTO 120
   VE(0) = K1 / (KH(0))
120 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL"; VE(0)
130 FOR K = 1 TO N1
   PRINT "VALORES DE N1 E N2 PARA HA"; K
   INPUT P1(K), P2(K)
   FOR J = P1(K) TO P1(K) + P2(K)
     F2(K, J) = (H1(J) - H2(J)) * (VO + V(J)) * (KH(K) + H1(J)) / CB
     F2(K, J) = (V(J)) * H1(J) + (VE(K - 1)) * KH(K) + F2(K, J)
     A(K, J) = KH(K) / (KH(K) + H1(J))
     F5(J) = 0
     IF K = 1 THEN 135 ELSE 134
134 FOR I = 1 TO K - 1
     A(I, J) = KH(I) / (KH(I) + H1(J))
     F6(I, J) = 0
     F6(I, J) = (VE(I) - VE(I - 1)) * A(I, J) * (KH(K) + H1(J))
     F5(J) = F6(I, J) + F5(J)
   NEXT I
135 F9(K, J) = F2(K, J) - F5(J)
   F8(J) = F9(K, J)
   NEXT J
   J1 = P1(K)
   J2 = P2(K)
140 GOSUB 330
   KH(K) = -X1 / Y1
   VE(K) = (Y + KH(K) * X) / KH(K)

```

```

150 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA"; K; "="; VE(K)
    PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO PARA HA"; K; "="; KH(K)
    NEXT K
170 PRINT "ENTRE COM VALORES DE N1,...;NN"
180 FOR I = 1 TO N1
    PRINT "PARA HA"; I;
    INPUT P1(I), P2(I)
    PRINT P1(I), P2(I)
    NEXT I
    E = 0
190 FOR I = 1 TO N1
    S(I) = VE(I)
    NEXT I
    GOTO 220
200 FOR J = P1(0) TO P1(0) + P2(0)
    F8(J) = 0
    F1(J) = 0
    F4(J) = (H1(J) - H2(J)) * (VO + V(J))
    FOR I = 1 TO N1
    A(I, J) = KH(I) / (KH(I) + H1(J))
    VE(0) = 0
    Y(I, J) = (VE(I) - VE(I - 1)) * CB * A(I, J)
    F1(J) = F1(J) + Y(I, J)
    NEXT I
    F8(J) = F4(J) - F1(J)
    NEXT J
    J1 = P1(0)
    J2 = P2(0)
210 GOSUB 330
    KH(0) = -X1 / Y1
    K1(0) = Y + KH(0) * X
    VE(0) = K1(0) / (KH(0))
    R(0) = R
220 FOR I = 1 TO N1
    FOR J = 1 TO N2
    F2(I, J) = (H1(J) - H2(J)) * (VO + V(J)) * (KH(I) + H1(J)) / CB + (V(J)) * H
230 IF I = 1 THEN 240 ELSE 235
235 F2(I, J) = (VE(I - 1)) * KH(I) + F2(I, J)
240 NEXT J
    NEXT I
250 FOR K = 1 TO N1
    FOR J = P1(K) TO P1(K) + P2(K)
    F5(J) = 0
    FOR I = 1 TO N1
    A(I, J) = KH(I) / (KH(I) + H1(J))
    IF I = K THEN 260 ELSE 255
255 F6(I, J) = (VE(I) - VE(I - 1)) * A(I, J) * (KH(K) + H1(J))
    F5(J) = F6(I, J) + F5(J)
260 NEXT I
    F9(K, J) = F2(K, J) - F5(J)
    F8(J) = F9(K, J)
    NEXT J
    J1 = P1(K)
    J2 = P2(K)
270 GOSUB 330
    KH(K) = -X1 / Y1
    K1(K) = Y + KH(K) * X
    VE(K) = K1(K) / KH(K)
    R(K) = R
    NEXT K

```

[illegible]

```

X = X + V(J)
NEXT J
X = X / (J2 + 1)
Y = Y / (J2 + 1)
X1 = 0
Y1 = 0
X2 = 0
Y2 = 0
Y3 = 0
FOR J = J1 TO J1 + J2
X1 = X1 + (V(J) - X) * (F8(J) - Y)
Y1 = Y1 + (V(J) - X) ^ 2
Y2 = Y2 + (F8(J) - Y) ^ 2
Y3 = Y3 + (V(J) - X) * (F8(J) - Y)
NEXT J
X4 = Y1 * Y2
R = Y3 / SQR(X4)
RETURN

```

ANEXO 2

```

'
'               REGRESSAO NAO LINEAR
'       F. Borato, Basic para cientistas e engenheiros, p 111
DEFDBL A-Z: DEFINT I-N
DIM T1(1000), P(150), C1(150), C2(150), F1(1000), F2(1000), F3(7000), F4(150), F
DIM D1(150), T(150), C(150), X(900), I1(150)

PRINT "               Regressao nao linear": PRINT
PRINT " Defina a funcao a minimizar no procedimento funcao": PRINT
INPUT "numero de parametros (<=15) = "; M
INPUT "numero total de pontos (<=40) = "; N1
INPUT "numero de iteracoes = "; M1
PRINT "parametros iniciais e respectivos deltas"
FOR J = 1 TO M
    PRINT USING "param ##"; J; : INPUT T(J)
    PRINT USING "delta ##"; J; : INPUT C(J)
NEXT J
PRINT "conjunto de dados"
FOR J = 1 TO N1
    K = N1 + J
    PRINT USING "par num ###"; J;
    READ X(J)
    READ X(K)
NEXT J
PRINT

'dados da titulacao do acido poliprotico X na presenca de excesso de acido forte
DATA 0.000,2.153,0.050,2.167,0.100,2.180,0.150,2.194,0.200,2.207,0.250,2.222,0.3
DATA 1.000,2.496,1.050,2.522,1.100,2.545,1.150,2.572,1.200,2.599,1.250,2.626,1.3
DATA 2.001,3.269,2.050,3.331,2.100,3.397,2.150,3.468,2.200,3.541,2.250,3.615,2.3
DATA 3.000,4.839,3.050,4.930,3.100,5.023,3.150,5.120,3.200,5.221,3.250,5.333,3.3

'dados de uma duplicata de titulacao do acido X
DATA 0.000,2.155,0.050,2.168,0.101,2.182,0.150,2.195,0.200,2.211,0.250,2.224,0.3
DATA 1.051,2.523,1.150,2.574,1.200,2.601,1.250,2.628,1.300,2.659,1.350,2.689,1.4
DATA 2.105,3.404,2.151,3.468,2.200,3.539,2.250,3.615,2.300,3.691,2.351,3.771,2.4
DATA 3.101,5.017,3.151,5.111,3.200,5.211,3.252,5.324,3.300,5.439,3.350,5.579,3.4

'dados de titulacao de uma mistura de acidos fracos na presenca de excesso de ac
DATA 0.000,2.743,0.100,2.791,0.200,2.840,0.300,2.894,0.400,2.951,0.500,3.014,0.6
DATA 2.000,4.708,2.100,4.899,2.200,5.147,2.300,5.536,2.400,7.574,2.500,8.499,2.6

'dados de uma duplicata da mistura de acidos
DATA 0.000,2.747,0.100,2.791,0.200,2.841,0.300,2.894,0.400,2.953,0.500,3.019,0.6
DATA 2.000,4.701,2.100,4.892,2.200,5.132,2.300,5.512,2.400,7.170,2.500,8.438,2.6

'dados de uma titulacao de mistura de acido formico, acetico e NH4OH em NaCl 0.1
DATA 0,2.743,0.1,2.791,0.2,2.84,0.3,2.894,0.4,2.951,0.5,3.014,0.6,3.088,0.7,3.16
DATA 2.7,9.087,2.8,9.299,2.9,9.511,3,9.73,3.1,9.966,3.2,10.189,3.3,10.375,3.4,10

'dados de titulacade acido humico na presenca de acido forte em NaCl 0.1M
'volume inicial 55.85 mL; KW 1.727e-14; CB 0.1138M; CHA 0.9111mg/mL
DATA 0.000,2.084,0.400,2.128,0.800,2.181,1.400,2.272,2.000,2.383,2.600,2.527,3.2
DATA 4.640,4.493,4.680,4.601,4.720,4.719,4.760,4.838,4.800,4.966,4.840,5.085,4.8
DATA 5.200,6.690,5.230,6.891,5.250,7.010,5.270,7.153,5.290,7.312,5.320,7.532,5.3
DATA 5.720,9.883,5.770,10.039,5.880,10.283,5.920,10.347
'dados de titulacao de acido humico na presenca de acido forte em NaCl 0.1M
'volume inicial, 56.00 mL; KW 1.789e-14, CB 0.1138M, CHA 8.979mg/mL

```

```
DATA 0.000,2.076,0.400,2.124,0.800,2.177,1.200,2.237,1.800,2.341,2.200,2.426,2.6
DATA 4.460,4.096,4.500,4.192,4.540,4.283,4.600,4.451,4.660,4.625,4.700,4.735,4.7
DATA 5.190,6.799,5.210,6.934,5.230,7.076,5.250,7.221,5.270,7.372,5.290,7.524,5.3
DATA 5.560,9.305,5.600,9.537,5.640,9.741,5.680,9.892,5.720,10.008,5.760,10.113,5
```

```
'dados de titulacao de acido humico na presenca de acido forte em NaCl 0.1M
'volume inicial 55.85 mL; KW 1.687e-14; CB 0.1138M; CHA 9.111mg/mL
```

```
DATA 0.000,2.089,0.600,2.160,1.200,2.245,1.600,2.312,2.200,2.432,2.800,2.590,3.4
DATA 4.860,5.130,4.890,5.206,4.920,5.326,4.960,5.483,4.990,5.605,5.020,5.732,5.0
DATA 5.400,8.103,5.430,8.313,5.450,8.480,5.480,8.683,5.500,8.815,5.530,9.028,5.5
```

```
'dados de titulacao de acido humico na presenca de acido fprte em NaCl 0.1M
'volume inicial 56.00 mL; KW 1.72e-14; CB 0.1138M; CHA 8.979 mg/mL
```

```
DATA 0.000,2.078,0.600,2.153,1.200,2.238,2.000,2.382,2.800,2.587,3.300,2.780,3.7
DATA 4.820,5.037,4.860,5.176,4.900,5.313,4.940,5.458,4.980,5.614,5.020,5.786,5.0
DATA 5.350,7.814,5.380,8.016,5.400,8.152,5.420,8.278,5.440,8.420,5.460,8.536,5.4
```

```
PRINT : PRINT "Iter      Desv Q M          P1          P2          P3          P4
MA = 15
IF M < 15 THEN MA = M
```

```
J = 0
FOR I = 1 TO M
  IF C(I) <> 0 THEN
    J = J + 1
    I1(J) = I
  END IF
NEXT I
N2 = M * M
N3 = M * N1
FOR I = 1 TO M
  T1(I) = T(I)
  P(I) = T(I)
  IF C(I) = 0 THEN C(I) = 1
  C(I) = 10 * C(I)
  P(I) = P(I) / C(I)
  C1(I) = P(I)
  C2(I) = P(I)
```

```
NEXT I
I2 = 0
I3 = 0
E1 = 2
CALL Funcao
```

```
U2 = S1          'S1 = somatorio do quadrado dos residuos
```

```
U1 = S1
```

```
DO              '250
```

```
  FOR I = 1 TO N1
    F1(I) = F2(I)
```

```
  NEXT I
```

```
  U2 = S1
```

```
  U1 = S1
```

```
  FOR I = 1 TO M
```

```
    I5 = I1(I)
```

```
    T(I5) = T(I5) + C(I5)
```

```
    CALL Funcao
```

```
    S2 = 0
```

```
    FOR J = 1 TO N1
```



```

        I6 = I + M * (J - 1)
        S3 = F2(J) - F1(J)
        S2 = S2 + S3 * F1(J)
        F3(I6) = S3
    NEXT J
    T(I5) = T(I5) - C(I5)
    F4(I) = -S2
NEXT I
FOR K = 1 TO M
    FOR I = 1 TO M
        S2 = 0
        FOR J = 1 TO N1
            I7 = M * (J - 1)
            J2 = K + I7
            K2 = I + I7
            S2 = S2 + F3(J2) * F3(K2)
        NEXT J
        I8 = K + M * (I - 1)
        F5(I8) = S2
    NEXT I
NEXT K
FOR J = 1 TO N2
    F6(J) = F5(J)
NEXT J
FOR J = 1 TO M
    D1(J) = F4(J)
NEXT J
CALL Resol '400
IF K3 > 0 THEN
    FOR I = 1 TO M
        D1(I) = 0
    NEXT I
END IF
FOR I = 1 TO M
    I5 = I1(I)
    C2(I5) = P(I5) + D1(I)
    T(I5) = C2(I5) * C(I5)
NEXT I
FOR I = 1 TO M '450
    IF ABS(D1(I) - E1) > 0 THEN GOTO Refin
NEXT I
CALL Funcao '460
if I3 > 0 and U2 <= 0 then exit loop '470

L480:
E1 = 1
I3 = 1
IF (S1 - U1) < 0 THEN
    FOR I = 1 TO M
        C(I) = .2 * C(I)
        P(I) = 5 * C2(I)
    NEXT I
    GOTO Desvio
END IF
I4 = 1
FOR I = 1 TO M
    C(I) = .2 * C(I)
    C1(I) = 5 * P(I)
NEXT I
GOTO L990 '540

```

if U2 <= 0 or (abs(S1 - U2) - 1.0E-5 * U2) <= 0 then exit loop

Refin:

```
S2 = 0
FOR I = 1 TO M
  S2 = S2 + D1(I) * D1(I)
NEXT I
R1 = SQR(S2)
IF (R1 - 20) > 0 THEN GOTO L650
CALL Funcao
IF (S1 - U1) > 0 THEN GOTO L650
```

L630:

```
FOR I = 1 TO M
  I5 = I1(I)
  P(I5) = C2(I5)
NEXT I
GOTO Desvio
```

L650:

```
S2 = 0
FOR I = 1 TO M
  I5 = I1(I)
  C2(I5) = P(I5)
  S2 = S2 + F4(I) * F4(I)
NEXT I
S2 = SQR(S2)
IF S2 <= 0 THEN GOTO L1030
F7 = S2
F8 = S2
S4 = .5
F9 = 0
R2 = 0
IF (R1 - 2) >= 0 THEN
  R3 = R1
ELSE
  R3 = 2
END IF
IF (R1 - 50) > 0 THEN
  D2 = 10
ELSE
  D2 = .2 * R3
END IF
U1 = U2
I4 = 1
I9 = 0
```

'710

L790:

```
FOR I = 1 TO M
  I8 = I + M * (I - 1)
  F5(I8) = F5(I8) + F7 - F9
NEXT I
FOR I = 1 TO N2
  F6(I) = F5(I)
NEXT I
FOR I = 1 TO M
  D1(I) = F4(I)
NEXT I
CALL Resol
S2 = 0
```

```

FOR I = 1 TO M
  I5 = I1(I)
  C1(I5) = C2(I5)
  C2(I5) = P(I5) + D1(I)
  T(I5) = C2(I5) * C(I5)
  S2 = S2 + D1(I) * D1(I)
NEXT I
R1 = R2
R2 = SQR(S2)
CALL Funcao
IF (S1 - U1) < 0 THEN GOTO L930
IF I9 > 0 THEN GOTO L990
F9 = F7
I4 = -1
F7 = 5 * F7
I9 = I9 + 1
FOR I = 1 TO M
  I5 = I1(I)
  C2(I5) = P(I5)
NEXT I
GOTO L790

```

'910

```

L930:
  IF R2 - 50 >= 0 THEN GOTO L630
  I4 = 1
  U1 = S1
  S4 = S4 + D2
  I9 = I9 + 1
  FOR I = 1 TO N1
    F1(I) = F2(I)
  NEXT I
  F8 = F7 / (R3 / R2 - 1)
  F9 = F7
  F7 = F8 * (R3 / S4 - 1)
  IF F7 <= 0 THEN GOTO L630 ELSE GOTO L790

```

```

L990:
  FOR I = 1 TO M
    I5 = I1(I)
    P(I5) = C1(I5)
    T(I5) = P(I5) * C(I5)
  NEXT I
  S1 = U1
  FOR I = 1 TO N1
    F2(I) = F1(I)
  NEXT I
  IF I4 >= 0 THEN GOTO Desvio

```

```

L1030:
  if I3 <= 0 then goto L480 else exit loop

```

```

Desvio:
  I2 = I2 + 1
  IF N1 > M THEN
    E2 = SQR(S1 / (N1 - M))
  ELSE
    E2 = SQR(S1)
  END IF
  if E2 = 0 then exit loop

```

'modificado para n dados =< n de paramet

```

'                               Progresso da minimizacao
LPRINT USING "#### ###.#####^"^"; I2; E2;
FOR I = 1 TO MA
    LPRINT USING " ###.#####^"^"; T(I);
NEXT I
PRINT
LOOP WHILE (I2 - M1) < 0
CALL Funcao
'1070

'                               Saida de dados
LPRINT : LPRINT
FOR I = 1 TO M
    LPRINT "T("; I; ")="; T(I)
NEXT I
LPRINT : LPRINT
LPRINT "      X exp      ", "      Y exp      ", "      Y cal      ", "      Delta"
K7 = N1 + 1
K8 = K7 + N1 - 1
N = 1
FOR K = K7 TO K8
    LPRINT USING "###.#####^"^"; X(N); X(K); T1(N); X(K) - T1(N)
    N = N + 1
NEXT K
END

```