

Sandra Vasconcellos Al-Asfour

**ESTUDO DE EQUILÍBRIOS QUÍMICOS COM
2-AMINOETANOL-DIHIIDROGENOFOSFATO PARA FINS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

São Carlos

2008

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Considerações gerais sobre a fosfoetanolamina.....	18
1.2. Papel biológico da FOS/ Justificativa do trabalho	19
1.2.1. Metodologias de obtenção da FOS.....	24
1.3. Estudos de equilíbrio.....	25
1.3.1. Estudos de agregação	25
1.3.2. Estudos de complexação	27
1.4. Determinação de constantes de ionização	29
1.5. Utilização do sistema FOS/MEA como tampão biológico.....	31
1.6. Estudos por condutimetria	32
1.7. Método potenciométrico	34
1.8. Importância da força iônica	35
1.9. OBJETIVOS.....	38
2. PARTE EXPERIMENTAL	40
2.1. Reagentes e soluções.....	40
2.2. Caracterização da FOS.....	41
2.2.1. Análise Elementar	41
2.2.2. Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho.....	41
2.3. Estudo da resposta do eletrodo de vidro	42
2.4. Determinação do pK'_{a1} : estudo em meio ácido e determinação da constante de agregação	42
2.5. Estudo espectrofotométrico pelo Método Azul de Molibdênio: comprovação do fenômeno de agregação.....	42
2.6. Determinação do pK'_{a2} : titulações com MEA.....	43
2.7. Determinação do pK'_{a3} : titulações com NaOH na presença e ausência de formaldeído	43
2.8. Determinação simultânea das três constantes de ionização.....	43
2.9. Determinação do número médio de protonação.....	44
2.10. Determinação da capacidade tamponante máxima ou índice de tampão.....	44
2.11. Curva de distribuição de espécies para a FOS	45
2.12. Estudo do equilíbrio de complexação de íons cálcio e magnésio com fosfoetanolamina.....	46

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Caracterização da FOS	49
3.1.1. Análise Elementar	49
3.1.2. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....	50
3.2. Estudo da resposta do eletrodo de vidro	51
3.2.1. Estudo do slope da resposta do eletrodo de vidro $\mu = 0,15$	51
3.2.2. Estudo do slope da resposta do eletrodo de vidro $\mu = 0,50$	52
3.2.3. Estudo do slope da resposta do eletrodo de vidro $\mu = 1,0$	53
3.3. Determinação do $pK'a_1$	54
3.3.1. Determinação da constante de agregação	58
3.3.2. Estudo espectrofotométrico pelo método “Azul de molibdênio”	61
3.4. Determinação do $pK'a_2$	63
3.5. Determinação do $pK'a_3$; interação de <i>zwitterions</i> com formaldeído	69
3.6. Determinação simultânea das três constantes de ionização	72
3.7. Determinação da capacidade tamponante máxima	75
3.8. Curva de distribuição de espécies e número médio de protonação	76
3.9. Estudos de equilíbrio por condutimetria	85
3.9.1. Estudo condutométrico de complexação com cálcio e FOS	87
3.9.2. Estudo condutométrico de complexação com magnésio	88
4. CONCLUSÕES	92
ETAPAS FUTURAS	95
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural plana da fosfoetanolamina.....	18
Figura 2. Comportamento da FOS frente a ácidos e bases.....	19
Figura 3. Biossíntese da acetilcolina.	22
Figura 4. Rota sintética de CHERBULIEZ (1959).	24
Figura 5. Síntese proposta por RIBEIRO FILHO (1999).....	25
Figura 6. Estrutura do agregado - íon dipolar (fosfoetanolamina).	26
Figura 7. Protonação da metade da fosfoetanolamina.....	33
Figura 8. Protonação total da fosfoetanolamina.	33
Figura 9. Reação de formação do par iônico do cloreto com a FOS.....	33
Figura 10. Fórmula do par iônico do cloreto com a FOS.....	34
Figura 11. Espécies presentes nos equilíbrios da FOS.....	45
Figura 12. Espectro vibracional obtido na região do infravermelho da FOS.....	50
Figura 13. Determinação da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro em relação ao potencial e pH em eletrólito de NaCl 1,00 mol L ⁻¹	53
Figura 14. Valores de pK calculados seguindo a Equação 1 vs. valores de pH obtidos experimentalmente.....	56
Figura 15. Valores de K ⁻¹ /10 calculados seguindo a Equação 1 vs. CHFOS.....	57
Figura 16. Valores de K _{a1} ' obtidos pela extrapolação de vários gráficos obtidos em diversas concentrações, vs. CFOS.....	58
Figura 17. Determinação da constante de agregação.	60
Figura 18. Espectros de absorção obtidos na região do visível.....	62
Figura 19. Curva analítica com padrões de dihidrogenofosfato de sódio.	62
Figura 20. Curva de titulação da FOS 0,020 mol L ⁻¹ vs. MEA 0,040 mol L ⁻¹ , $\mu = 1,00$	64
Figura 21. Derivada da curva da Figura 20.	64
Figura 22. Curva de titulação condutométrica de 10 mL de FOS 0,020 mol L ⁻¹ vs. MEA 0,040 mol L ⁻¹	65
Figura 23. Determinação de K'a ₂	68
Figura 24. Capacidade tamponante máxima vs. pH	68
Figura 25. Reações de equilíbrios de aminoácidos com formaldeído.....	69

Figura 26. Curva de titulação de FOS 0,020 mol L ⁻¹ vs. NaOH 0,040 mol L ⁻¹ na presença e ausência de formaldeído 37%.....	71
Figura 27. Razão total/K _{eq} em função de FOS (determinação de K' a ₃).	72
Figura 28. Curva de titulação de 10,00 mL da FOS 0,05 mol L ⁻¹ com 1,00 mL HCl.....	73
1,00 mol L ⁻¹ vs NaOH 0,20 mol L ⁻¹	73
Figura 29. Curva derivada da titulação da FOS 0,050 mol L ⁻¹ com 1,00 mL HCl 1,00 mol L ⁻¹ vs. NaOH 0,20 mol L ⁻¹	74
Figura 30. Capacidade tamponante vs. pH com os valores obtidos no presente trabalho.....	75
Figura 31. Número médio de protonação vs. pH.....	79
Figura 32. Determinação de K' a ₃ (pK' a ₃ =10,9).....	80
Figura 33. Curva de distribuição de espécies para a FOS.	81
Figura 34. Curva de distribuição para a FOS com os valores da literatura.	81
Figura 35. Diagrama de equilíbrio para fosfoetanolamina considerando os valores de constante de ionização calculados no presente trabalho.....	83
Figura 36. Diagrama de equilíbrio para fosfoetanolamina com os valores da literatura.....	84
Figura 37: Comparação das curvas condutométricas da FOS e da Gli.	86
Figura 38. Curva de titulação condutométrica de 25,00 mL da FOS 0,040 mol L ⁻¹ com CaCl ₂ .2H ₂ O 0,20 mol L ⁻¹	87
Figura 39. Curva de titulação condutométrica de 25,00 mL da FOS 0,040 mol L ⁻¹ com MgCl ₂ .6H ₂ O 0,20 mol L ⁻¹	88
Figura 40. Estrutura proposta para o primeiro complexo.....	89
Figura 41. Estrutura proposta para o segundo complexo.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das procedências e dos reagentes.....	40
Tabela 2. Valores calculados e encontrados de N, C e H.....	49
Tabela 3. Números de onda observados no IR e as possíveis atribuições (SILVERSTEIN et al, 1979).....	50
Tabela 4. Valores de medida de potencial para obtenção do desvio da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro, em titulação de HCl 0,010 mol L ⁻¹ com NaCl, $\mu = 0,15$ mol L ⁻¹	51
Tabela 5. Valores de medida de potencial para obtenção do desvio da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro, em titulação de HCl 0,010 mol L ⁻¹ com NaCl, $\mu = 0,50$ mol L ⁻¹ ...	52
Tabela 6. Valores de medida de potencial para obtenção do desvio da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro, em titulação de HCl 0,010 mol L ⁻¹ com NaCl, $\mu = 1,00$ mol L ⁻¹	53
Tabela 7. Valores para determinação de K'_{al} com CFOS e CH ⁺ 0,10 mol L ⁻¹	55
Tabela 8. Valores referentes aos tratamentos matemáticos para determinação de K_{ag} , em várias concentrações, força iônica constante.....	60
Tabela 9. Valores calculado e experimental da porcentagem de fosfato livre da FOS	63
Tabela 10. Valores utilizados da titulação de retorno para cálculo de pK'	77
Tabela 11. Valores referentes ao cálculo do número médio de protonação	78
Tabela 12. Valores de constantes de ionização obtidos no presente trabalho	94
Tabela 13. Valores de constantes de ionização da FOS da literatura.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

FOS - fosfoetanolamina

MEA- monoetanolamina

GQATP- Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros

CFOS - concentração analítica da FOS

[FOS] – concentração livre de FOS

CHFOS – concentração analítica de fosfoetanolamina na forma protonada

[HFOS]- concentração da forma catiônica monoprotônica

CFOS'-concentração molar da FOS na forma não protonada

CH⁺- concentração de íons de hidrogênio proveniente da titulação da FOS com ácido forte

CHH- concentração de ácido corrigida pelo efeito de diluição

[FOS]₂ – fosfoetanolamina na forma agregada

Kh- constante de hidrólise

Ka- constante de acidez

Kb- constante de basicidade

H₃FOS- Fosfoetanolamina totalmente protonada

H₂FOS⁻ - Fosfoetanolamina com uma dissociação

HFOS²⁻ - Fosfoetanolamina com duas dissociações

FOS³⁻ - Fosfoetanolamina totalmente desprotonada

[FOS⁻] – concentração de fosfato livre

Sistema FOS/MEA- solução obtida da neutralização da FOS com MEA até pH 7,4.

Gli- Glicina

IR- Infravermelho

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

K_{ag} - Constante de agregação

K'_{a_1} - Primeira constante de ionização na ausência de agregação

K'_{a_2} - Segunda constante de ionização

K'_{a_3} - Terceira constante de ionização

β - Capacidade máxima tamponante ou índice de tampão

α - Grau de formação da espécie

Δ - variação

\bar{n} - Número médio de protonação

K_{total} - constante de equilíbrio da neutralização de FOS com NaOH

K_{eq} - constante de equilíbrio da neutralização da FOS na presença de formaldeído com NaOH

Log SH^+ = logaritmo da concentração de H_3O^+

Log SH^- = logaritmo da concentração de OH^-

Ppm- mg/L

E – potencial

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos de equilíbrios químicos da fosfoetanolamina (FOS) ou 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato, substância produzida no organismo humano, um precursor de fosfatidiletanolamina importante por regularizar o metabolismo de disfunção celular e metabólica. A constante de ionização de uma molécula é uma ferramenta interessante a fim de prever a sua absorção no organismo que geralmente, apenas ocorre com as moléculas na forma não ionizada. Na determinação usual de constantes de *zwiterions* como a FOS, não se considera o equilíbrio de formação de espécies não ionizadas como dímero (agregado). Neste trabalho comprovou-se o fenômeno de agregação da FOS por titulações potenciométricas e pelo método espectrofotométrico "Azul de Molibdênio". Determinou-se a constante de agregação pelo método potenciométrico como sendo da ordem de 10^6 . Realizou-se a determinação da primeira constante de ionização da FOS por titulações em meio ácido, na ausência do fenômeno de agregação, e verificou-se que é da ordem de 10^{-4} . Pelo método espectrofotométrico "Azul de Molibdênio" determinou-se a porcentagem de fosfato iônico 1%, coerente com os resultados potenciométricos. A determinação da segunda constante de ionização da FOS foi realizada por titulações com monoetanolamina (MEA), uma base fraca. Verificou-se a possibilidade de utilização do sistema FOS/MEA como um tampão biológico, por meio do gráfico de máxima capacidade tamponante vs pH. A determinação de terceira constante de ionização da FOS foi realizada por meio de titulações com NaOH na ausência e na presença de formaldeído, bloqueando o grupo amino. A determinação simultânea das três constantes de ionização foi realizada por meio de uma titulação de retorno, com HCl e adição de NaOH. Com o tratamento matemático desta curva, determinou-se o número médio de protonação e verificaram-se as regiões de máxima capacidade tamponante. Obteve-se a curva de distribuição de espécies e o diagrama logarítmico para a FOS, com os valores de constante de ionização determinados na ausência do fenômeno de agregação. Estudou-se a interação de íons cálcio e magnésio com a FOS, verificou-se que os complexos são do tipo ML e M_2L . É importante salientar ainda, que não há relato na literatura desses estudos.

Palavras-chave: fosfoetanolamina, equilíbrios, Química.

ABSTRACT

Studies on the chemical equilibrium of phosphoethanolamine (PEA) or 2-aminoethanol-dihydrogen phosphate, produced by the human body, as an important phosphatidylethanolamine precursor that regularizes the cell and metabolic disfunction have been performed. The ionization constant is an interesting tool to foresee organic absorption which often occurs in non ionized form. In the usual determination of zwitterion, constants like PEA, the dimer formation equilibrium is not always considered. In this work aggregation phenomena of PEA has been demonstrated by potentiometric titration and molybdenum blue spectrophotometric method. The aggregation constant was determined by potentiometric method as 10^6 . The first ionization constant determination of PEA was made by titration in acidic medium without aggregation phenomena and it was 10^{-4} . The molybdenum blue spectrophotometric method was used to determine the free phosphate amount, 1%, was coherent with potentiometric results. The second ionization constant determination was made by titration with monoethanolamine (MEA), a weak base. There is the possibility of using the system PEA/MEA as a biological buffer, according to the maximum buffer capacity graphic versus pH. The third ionization constant determination was made by titration with NaOH, with and without formaldehyde, blocking the amino group. The simultaneous determination of the three constants of ionization was made by back titration, with HCl after the addition of NaOH. The average number of bound protons was done with mathematical treatment of back titration curve and then, the maximum buffer capacity regions were observed. The species distribution curve and logarithmic diagram were obtained using the ionization constant values determined in the aggregation phenomena absence. The interaction between calcium, magnesium and PEA was studied and the ML and M_2L species were observed, not described in literature yet.

Keywords: phosphoethanolamine, equilibrium, chemistry.

“Deus quer. O homem sonha. A obra nasce”.

(Fernando Pessoa)

A Ele, pelo dom da vida e pelas graças alcançadas.

A minha mãe Ana Maria e tia Ignez, por terem sido durante toda a minha vida, mãe e pai, com ensinamentos e exemplo de amor;

Ao Rogério, por transmitir amor e paz em todos os momentos, iluminando a minha vida na convivência diária!

Aos tios Ção, Odir e à Lili, por sempre incentivarem meus estudos ;

Aos tios Thereza e Milton, por estarem sempre presentes, apesar da distância;

Ao primo Rui, por ter sido a “presença masculina” em casa; pela prontidão em ajudar quando necessário, muito obrigada!

À tia Maria das Dores (In memorian), por aceitar todo sofrimento com sabedoria, pelas lembranças ao ensinar caminhar... o amor pelas hortênsias do jardim... Que plantemos sempre flores para alegrar a nossa alma!

“Um pouco de Ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima...” (Louis Pasteur)

Agradecimentos

Ao mestre do orientador do presente trabalho: Professor Dr. Eduardo Neves (In memorian), pelo exemplo de sabedoria e humildade demonstradas nas discussões científicas, pelo carinho demonstrado a cada almoço: muitas vezes cruzava com ele na rua....tantas conversas sobre equilíbrio químico acabavam na sua casa...e como era bom “sugar” o conhecimento deste querido mestre... tenho certeza de que estaria na banca examinadora desta tese, com excelentes contribuições...

Ao meu orientador e amigo Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, agradeço pela postura de indução “Socrática”, que apesar de muitas vezes gerar conflito, faz permanecer os sábios conselhos, como a comparação com os ipês e “Conviva entre os bons e será bom”. Conviver com o senhor é ter o privilégio de estar com um dos 100 melhores cientistas do século e a certeza de que a Ciência não pára!

Ao Vicente, por ser o responsável em despertar em mim o amor pela Química, na verdade, quem iniciou isso tudo e me incentivou nas pesquisas.

Ao Toninho, Salvador, e aos professores Mário, Sandra, e Marli, pela amizade e valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Renato e ao Marcos Vinicius, por realizarem a aplicação biológica da FOS e, como diz o professor: “Estarem ali, juntos, quando tudo ocorreu”.

Aos amigos de Jaú: Manuel, Val, Kátia, Rafa, Jú, Marcos, Karin, Marina, Leonelli, Michelle...Obrigada por fazerem parte da minha vida! Vocês me ensinaram que: "Existem amigos que são mais do que um irmão".

Aos amigos adquiridos em São Carlos: Laura, Vinicius, Érica, Fabiana, pela oportunidade de conviver com pessoas de diferentes personalidades, com características únicas e inesquecíveis.

Ao amigos da Licenciatura : Gustavo, Sandra, Daniel, Adriana, Tônico e João, por terem sido, em muitos momentos, meu refúgio em São Carlos!

À professora e amiga Zazá, acima dos ensinamentos sobre avaliação da aprendizagem, obrigada por acreditar no meu papel como educadora!

A todos os professores da Unesp, por serem acolhedores e amigos a cada visita à Araraquara, principalmente a Vânia e o Mauro, pelo reconhecimento, incentivo nos momentos difíceis e amizade.

À Dani, Chuck e Sandrinha da Unesp: amigos que sempre torceram pelos meus projetos e idéias, pelas risadas, lágrimas, estudos e viagens compartilhadas!

A Pós Graduação do Instituto de Química de São Carlos, Sílvia e a Andréia, pelas lembranças das datas de matrícula.

À Renatinha do Didático, pela constante prontidão em ajudar, inclusive pelo empréstimo do condutivímetro.

À Edvane, da Graduação da Física, pelas dicas, muitas vezes nas ocasiões de matrícula, solicitação de documentos.

Às funcionárias da biblioteca, pelo auxílio nas correções das referências.

Ao professor Éder, pela correção do abstract desta tese.

Ao pessoal do laboratório que torceu por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

Aos alunos e coordenação das escolas Objetivo, COC, IEP, PET Cursos e da ONG Práxis, pela oportunidade de conviver, ensinar e aprender a cada dia de aula, obrigada!

À Nossa Senhora das Graças, pela intercessão !

Infelizmente, o pior câncer do mundo é a solidão...

Quando encontrarão a cura? Tantas pessoas que sofrem...

Sofrem, muitas vezes, pela inveja e egoísmo de muitos...

“ Mas quando penso: Vacilam-me os pés;

Sustenta-me, Senhor, com Vossa Graça!

*Quando em meu coração se multiplicaram as angústias,
Vossas consolações alegraram a minha alma!” (Sl 93; 18-20)*

Porque quem me segurou foi Deus, com seu amor de Pai...

Porque sei que este não é o fim de um trabalho de pesquisa, é uma porta que se abre para muitos trabalhos futuros, o meu agradecimento a Deus e a todos os que torceram pelo meu sucesso, estiveram ao meu lado, nos momentos difíceis e alegres, e ajudaram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a fosfoetanolamina

A Fosfoetanolamina (FOS), pode ser encontrada na literatura com os seguintes nomes: 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato, éster aminoetil fosfórico, ácido 2-aminoetanol-1-fosfórico, 2-aminoetil-fosfato, fosforiletanolamina, 2-aminoetanol-fosfato, mono(2-amino)etil-fosfato, monoaminoetil-fosfato, fosfato de colamina. Apesar de todos os nomes serem reconhecidos, o mais utilizado é 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato (IUPAC), e o mais encontrado na literatura é fosfoetanolamina, com a abreviação PEA.

Este composto, foco do presente trabalho é um precursor de síntese de fosfolipídeos (HANAHAN, 1997) e tem sido alvo de estudos que visam a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral e nos mecanismos de doenças de origens de desordens neurológicas (LIPPARD ; BERG, 1994)

É um fosfomonoéster (TOY ; WALSH, 1987), cuja estrutura está representada a seguir:

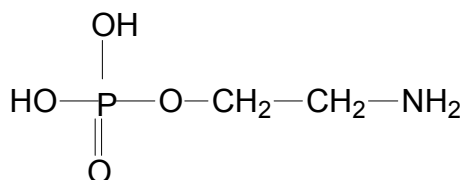


Figura 1. Fórmula estrutural plana da fosfoetanolamina.

A FOS possui ambos os grupos, básico e ácido na mesma molécula, sofrendo uma reação ácido-base intramolecular (MC MURRY, 1997). Apresenta um grupo amino e um grupo fosfato, possuindo comportamento de substância anfotérica (ATKINS, 2001). Sendo uma molécula de fosfomonoéster, possui átomos de hidrogênios ionizáveis e, em solução aquosa, estes ésteres tendem a existir sob a forma de ânions. A extensão desta ionização depende da acidez, força iônica e outros fatores físico - químicos do meio (RIBEIRO FILHO, 1999). A amina também comporta-se como substância ou íon dipolar: *zwitterion*, uma molécula com cargas positivas e negativas (CORBRIDGE, 1978).

Sabe-se que os *zwitterions* apresentam comportamento diferente frente a ácidos e bases:

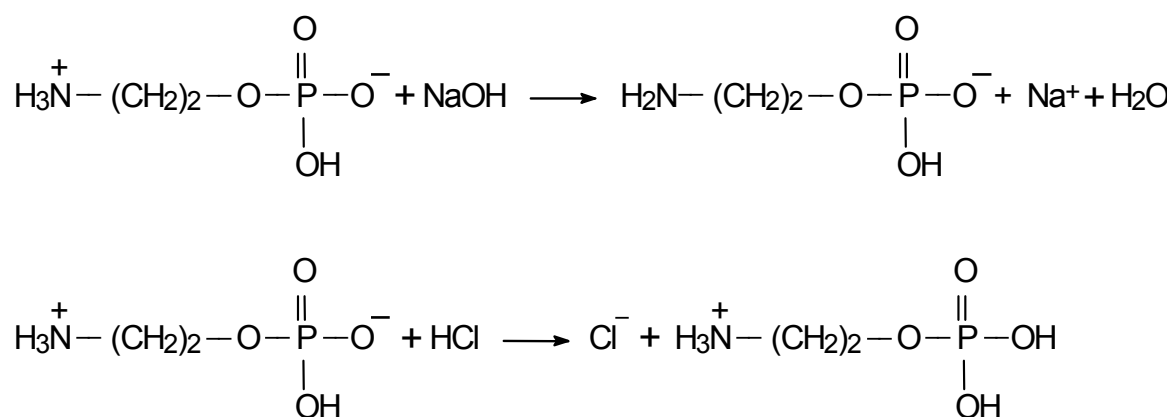


Figura 2. Comportamento da FOS frente a ácidos e bases.

1.2. Papel biológico da FOS/ Justificativa do trabalho

A FOS está presente na membrana plasmática de células animais e participa da síntese de fosfatidiletanolamina no retículo endoplasmático. A fosfatidiletanolamina participa de várias etapas de metabolismo celular, como

metabolismo mitocondrial, síntese de acetilcolina e síntese hormonal (LEHNINGER, 2000).

O produto da hidrólise da fosfatidiletanolamina (a fosfoetanolamina), em células cancerosas foi alvo de estudos e verificou-se que tumores malignos contêm alta concentração de fosfoetanolamina (KISS; CRILLY; ANDERSON, 1993), fato que já havia sido relatado, quando o fosfomonoéster foi isolado de tumores malignos bovinos (OUTHOUSE, 1936), (OUTHOUSE, 1937).

Foi comprovado que a FOS e a Monoetanolamina (MEA) estão presentes no cérebro normal em grandes quantidades (PERRY et al, 1971). Essas duas amins estão envolvidas no metabolismo dos fosfolipídeos. A FOS é precursora da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, dois dos quatro fosfolipídeos que compõem a membrana celular (CORAZZI et al, 1986). Em cérebros de pacientes com Alzheimer existe uma diminuição na concentração de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina e que a neurodegeneração na doença de Alzheimer está associada com a degradação das moléculas das membranas celulares (NITSCH et al, 1992)

Existe na literatura a relação da fosfatidiletanolamina com disfunções celulares e metabólicas como câncer (SUEOKA; KING, 1987), doenças neurodegenerativas como consta nos dados da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA COMPLEMENTAR, aplicação em Mal de Alzheimer (BRUN;ENGLUND, 1986), (ELLISSON; BEAL; MARTIN,1987), isquemia, (BOSTWICK et al, 1999), (PILITSIS et al, 2001), e na epilepsia (ESTEVEZ et al,1999),(BEN-MENACHEM et al, 1995).

A concentração de fosfoetanolamina e a fosfocolina mostra ser elevada em tumores e está relacionada com a atividade apoptótica e pode ser usada como prognóstico no tratamento de câncer (MENDOZA; SMITH; BROWN, 2004) .

Desde que a fosfoetanolamina é efetiva em elevar a síntese de acetilcolina dos neurônios *in vitro*, a administração desta e de substâncias relacionadas podem ser uma terapia efetiva em casos de Alzheimer e de envelhecimento geral do sistema nervoso (APPEL, 1988).

A isquemia como a interrupção do suprimento sanguíneo a determinado tecido, e causa importante de lesão celular; sendo uma doença que tem como uma das principais consequências uma inchação neural. A falha na fosforilação oxidativa resulta na movimentação de um número significativo de substâncias químicas dos fluidos intracelulares para fluidos extracelulares (HEARSE, 1979). Esta falha que ocorre na fosforilação oxidativa (ou metabolismo oxidativo) pode ocorrer quando há uma alteração celular mitocondrial e esta alteração está relacionada com doenças degenerativas (GUYTON, 1988). A liberação de FOS durante a isquemia tem sido descrita em várias publicações; como um neurotransmissor e como constituinte dos fosfolípidios. O aumento da liberação de FOS do plasma sanguíneo podem ser uma consequência da formação de fosfatidiletanolamina e ser considerada como um sensível indicador da desintegração da membrana (PHILLIS ; REGAN, 2003).

Para WASBURG (apud in VOET; VOET, 1994): “As células cancerosas produzem mais ácido láctico do que células normais.” Este fato indica que a energia é gerada preferencialmente pela glicólise anaeróbica ao invés da fosforilação oxidativa mitocondrial.

As doenças de Alzheimer, mal de Parkinson, e outras doenças neurodegenerativas também apontam para um defeito na fosforilação oxidativa, que ocorre na mitocôndria (COHEN; KESSLER, 1999) Este defeito causa uma diminuição na produção de energia, que é essencial para que as células possam sintetizar hormônios e neurotransmissores como a acetilcolina.

A acetilcolina é um neurotransmissor com importantes propriedades clínicas farmacológicas. Isso inclui a associação entre as baixas quantidades no cérebro com o Mal de Alzheimer (DAVIES, 2006).

A ação da FOS se mostra de especial importância, pois é ela quem sintetiza a fosfatidiletanolamina e que pode contribuir para normalizar o metabolismo oxidativo e está relacionada com o aumento da produção de Acetil-CoA, que por sua vez induz o ciclo de Krebs, que em células cancerosas é inibido. Importante lembrar que a acetilcolina é o produto da reação da acetil-coA com a colina:

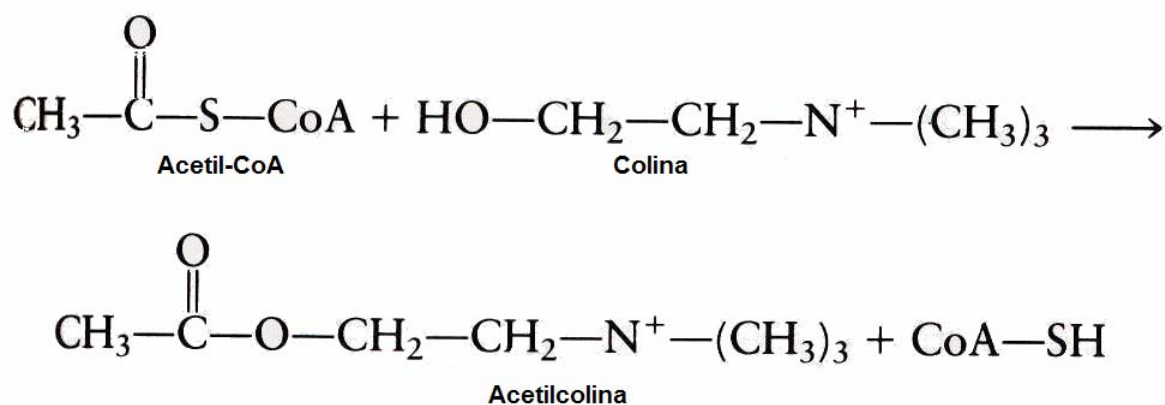


Figura 3. Biossíntese da acetilcolina.

A etanolamina é transformada em fosfoetanolamina sob a ação da etanolamina-kinase. Em etapa subsequente, através da via de Kennedy, forma-se a fosfatidiletanolamina, um dos quatro fosfolípidos componentes da membrana celular, e mais especificamente, da constituição da esfingomiéline que representa 8% da constituição da miéline dos axions neuronais. Uma segunda via envolve o cálcio estimulando a incorporação da serina, etanolamina e colina nos fosfolípidos já existentes, em reações que não precisam de ATP.

Já foram comprovados os efeitos antiinflamatórios da fosfatidilcolina (TREEDE et al, 2007). Na literatura consta um medicamento à base de 2-aminoetanoldihidrogenofosfato e cálcio (Ca-EAP), para tratamento de doenças auto-imunes, como antialérgico e antiinflamatório (NIEPER, 1966).

A síntese e a evolução de alguns aminoálcoois e diaminas foram estudadas como imunossupressores e apresentam papel importante em transplante de órgãos e em tratamento de doenças auto-imunes (OLMO et al, 2006).

Estudos mostraram que a fosfoetanolamina é um fosfomonoéster que é encontrado em porções reduzidas em cérebros pós-falecidos com doença de Alzheimer. Fosfomonoésteres estão presentes em maiores quantidades no cérebro do que em outros órgãos. No cérebro concentrações intracelulares de fosfoetanolamina são de aproximadamente 0,5 a 1,5 micromols por grama (KLUNK et al, 1995).

Estudos realizados pelo GQATP comprovaram que a FOS neutralizada com a MEA mostrou-se efetiva na redução da ocorrência de ataques epiléticos de ratos Wistar (ALMEIDA, 2007). Muitas investigações têm sido realizadas na tentativa de se obter resultados efetivos contra a epilepsia, pois, aproximadamente, 25 a 30% de todos os pacientes epiléticos não respondem aos tratamentos e precisam de drogas mais eficazes (GHIDINI et al, 2006).

Alguns animais que apresentavam tumores de melanoma B16, foram tratados com FOS durante 20 dias e após análise histológica constatou-se tumores dorsais com lesões ocupando área e volume extremamente reduzidos com características amorfas, sem sinais de metástases macroscópicas em órgão alvo como os gânglios linfáticos, pulmão e fígado e ausência significativa de neovascularização, como também não apresentaram sinais de anemia e caquexia. Por outro lado, o

tratamento combinado com os quimioterápicos Taxol (Paclitaxel) e Etoposídeo administrados no mesmo esquema terapêutico, mostraram uma redução importante na carga tumoral, porém foi observada alta e significativa taxa de mortalidade além dos extremos efeitos colaterais (MENEGUELO, 2007).

1.2.1. Metodologias de obtenção da FOS

Após a publicação dos trabalhos de Outhouse (1936, 1937), outros pesquisadores (AWAPARA et al, 1950); (STONE,1943); (WALKER,1952) encontraram substâncias relacionadas com a síntese de fosfoetanolamina em intestinos de ratos e em tecidos cerebrais de bovinos. Cherbuliez e colaboradores não só sintetizaram, mas também caracterizaram e analisaram o comportamento químico de muitos ésteres fosfóricos, publicando trabalhos sobre o tema (CHERBULIEZ; PROBST; RABINOWITZ, 1958), (CHERBULIEZ et al, 1959), (CHERBULIEZ et al ,1960), (CHERBULIEZ et al, 1961), (CHERBULIEZ et al, 1962), (CHERBULIEZ et al, 1963). A síntese descrita por eles envolvia várias etapas, com formação de subprodutos e propiciava baixo rendimento.



Figura 4. Rota sintética de CHERBULIEZ (1959).

As sínteses descritas na literatura relatam a formação de vários subprodutos, propiciando um baixo rendimento. A síntese proposta por Ribeiro Filho (1999) requer somente ácido fosfórico, monoetanolamina e álcool etílico, atingindo um rendimento

de 80% e é constituída por duas etapas. Na primeira etapa da reação observa-se a formação de um sal, e na segunda etapa a formação do éster:

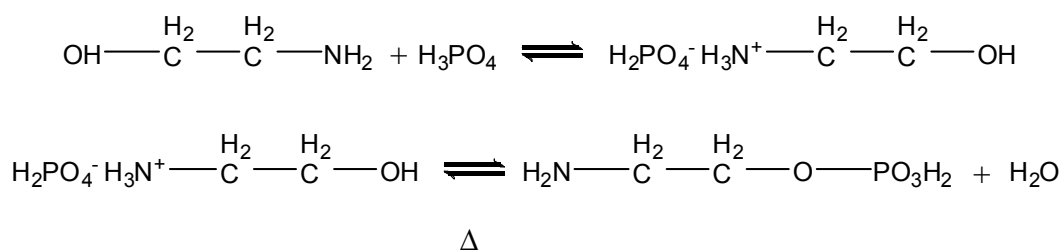


Figura 5. Síntese proposta por RIBEIRO FILHO (1999)

1.3. Estudos de equilíbrio

1.3.1. Estudos de agregação

Estudos realizados pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Carlos, comprovaram inicialmente a existência do fenômeno de agregação da monoetanolamina em soluções aquosas, determinando suas constantes de agregação por técnica potenciométrica com força iônica controlada (PLEPIS, 1984). Os resultados mostraram que a monoetanolamina forma dímeros e trímeros em soluções aquosas, mesmo nas menores concentrações medidas.

Ribeiro filho (1999) estudou o equilíbrio químico e a agregação da FOS (íon dipolar ou *zwitterion*). Por meio da utilização de várias equações de equilíbrios e posterior tratamento matemático das curvas de titulação realizadas em meio ácido, foi possível comprovar a existência da forma agregada:

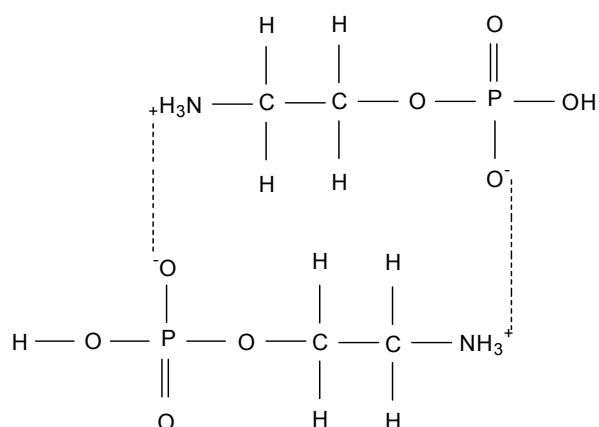
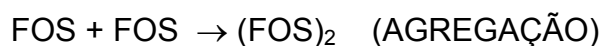
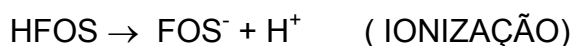


Figura 6. Estrutura do agregado - íon dipolar (fosfoetanolamina).

Sabe-se que em solução aquosa existe a competição entre os equilíbrios:



Os agregados são constituídos pela junção de moléculas do mesmo composto, estas podem se unir devido às interações hidrofóbica, eletrostática, van der Waals, pontes de hidrogênio. Estas interações podem variar com as condições externas, como a força externa ou interação com polímeros. Quando dois monômeros se unem de modo a interagirem eletronicamente entre si, cada monômero é perturbado pelo campo elétrico do outro. Os monômeros formam dipolos elétricos que vão interagir quando estes formarem dímeros, trímeros e agregados maiores.

Porém, nos trabalhos descritos na literatura sobre determinações dos pKs de anfóteros, com comportamento semelhante ao da FOS, não se considera o equilíbrio de agregação. No estudo realizado sobre o equilíbrio de agregação, verifica-se que em solução aquosa a constante de agregação é da ordem de 10^6 .

As constantes de ionização para os aminoácidos foram determinadas na ausência de influência do fenômeno de agregação (MOUCHRECK, 2003) de acordo com os equilíbrios propostos por RIBEIRO FILHO (1999) e CHIERICE (1979).

Questionamentos foram levantados sobre as razões da ocorrência dos 20 aminoácidos, a relação com a origem da vida e a evolução de Darwin. Por que os aminoácidos são usados para a formação das proteínas? (WEBER; MILLER, 1981). Estaria relacionado com a formação de agregados em solução aquosa pela interação de *zwitterions*?

As estruturas de complexos de aminoácidos, como a histidina, com ácido fórmico mostraram interações como agregação, que podem definir aspectos biológicos importantes (SURESH; VIJAYAN, 1995). Estudos mostram a interação molecular de agregados, por investigações das suas propriedades dielétricas (MALECKI;NOWAK, 2006). O equilíbrio monômero-dímero tem sido investigado por espectroscopia UV-vis e a caracterização termodinâmica dos equilíbrios de dimerização tem sido alvo de estudos recentes (GHASEMI et al, 2004).

O estudo de conformações de aminoácidos como a glicina mostrou a ligação hidrogênio intramolecular entre NH_3^+ e o oxigênio do grupo carbonila (NOGUERA et al, 2001), comprovando que os aminoácidos formam *zwitterions* em solução aquosa.

1.3.2. Estudos de complexação

Os ligantes com baixo peso molecular, como a FOS, podem agir como intermediários quando os íons metálicos são inseridos ou removidos de certas metaloenzimas transportadoras, no transporte de íons metálicos através das

membranas, na manutenção da concentração ideal de metais de fluidos do organismo e alteração do potencial de oxi-redução (CAVICCHIOLI, 2003).

Embora seja pequena a fração de íons metálicos que se encontram complexados a ligantes de baixa massa molar, como a fosfoetanolamina, em comparação com a fração de íons metálicos ligados a metaloproteínas, esta pequena fração é de grande significado devido à importância destes complexos em muitos processos fisiológicos e bioquímicos (GURD; WILCOX, 1956).

A formação do complexo fosforiletanolamina- Cu(II), foi estudada pela técnica potenciométrica (OSTERBERG, 1960), (HEDSTROM, 1955), verificando-se a formação de quatro espécies complexas, sugerindo os possíveis sítios de coordenação envolvidos nos complexos.

A estabilidade dos complexos formados entre Ca (II), Mg (II) e Mn (II) com FOS e outros fosfolipídeos foi estudada (OSTERBERG, 1962). A ordem de estabilidade encontrada foi Ca (II) < Mg (II) < Mn (II), resultado concordante com a teoria de Williams, quando sugeriu que os íons cálcio podem formar complexos diferentes dos de magnésio pela coordenação de mais grupos dentados basendo-se no tamanho iônico (WILLIAMS et al, 1959).

Estudos de equilíbrios de íons metálicos em biofluidos foram realizados com os ligantes mais comumente encontrados nos fluidos do organismo: alanina, aminobutirato, arginina, asparagina, cisteína, glicina, hidroxiprolina, leucina, lisina, ornitina, metionina, prolina, serina, treonina, histamina, triptofano, carbonato, fosfato, silicato, sulfato, tiocianato, citrato, amônia, lactato, malato e oxalato. Os autores utilizaram uma simulação computacional para estudar a distribuição dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} em 4000 complexos formados com cerca de 40 ligantes (MAY, 1977)

Estudos potenciométricos com Fe (III), Mn (II) e Zn (II) com vitamina D₃ foram realizados e as constantes de estabilidade foram determinadas, em força iônica 0,1 mol.L⁻¹, através do programa computacional MARTELL. Foi verificada a presença das espécies ML e ML₂ em todos os casos e ML₃ para o íon Fe (III) (MERCÊ et al, 1999).

As constantes de estabilidade de complexos de cobre, zinco, manganês, cálcio foram estudadas por titulações potenciométricas com o ligante glifosato, pois os valores destas constantes podem auxiliar no entendimento do comportamento do herbicida em solos e plantas (MADSEN; CHRISTENSEN; PETERSEN, 1978).

As constantes de estabilidade de complexos de cálcio, magnésio e níquel com alguns fosfolipídeos, como a fosfatidilserina, foram estudadas devido à importância biológica deste tipo de complexo no organismo humano (HENDRICKSON; FULLINGTON, 1965).

Por ser um intermediário de síntese fosfolipídica e antitumoral, despertou-se o interesse em estudar o comportamento da FOS com íons como cálcio e magnésio, que também são fatores de proteção ao câncer e pontos de controle da fosforilação oxidativa. Além disso, muitas reações enzimáticas envolvem substratos fosforilados com íons divalentes, como cálcio e magnésio (SHIN et al, 2002).

1.4. Determinação de constantes de ionização

É possível prever a absorção de um fármaco de acordo com a sua constante de ionização. A correlação dos valores de pKs de algumas substâncias com a permeação da membrana celular foi estudada para propor qual das moléculas apresentariam melhor atividade anticâncer, realizando titulações potenciométricas

(SOSNOVSKY; BELL, 1998). O pK_a dos fármacos é um fator muito importante em diversos aspectos, incluindo o metabolismo e o transporte transmembranar, que geralmente ocorre apenas com as moléculas na forma molecular, uma vez que esta é mais lipofílica.

O conhecimento das constantes de ionização é essencial na tentativa de se propor a velocidade de dissolução, velocidade de absorção gastrointestinal, incompatibilidades, bem como para se interpretar as relações entre a estrutura e a atividade biológica. A duração da atividade biológica depois da injeção intramuscular depende da diminuição da saturação da droga no solvente. Nesse sentido, as constantes de ionização de cinco antiinflamatórios foram determinadas em solventes orgânicos (GONZALEZ; HERRADOR, 1997).

Os valores de pK_s da literatura (CLARKE; DATTA; RABIN, 1955) para a FOS são <1,0; 5,9 e 10,6 incoerentes com o valor de pH experimentalmente medido de uma solução de FOS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, ao redor de 3,0.

Sabe-se que quanto mais neutro, maior a absorção do fármaco. O equilíbrio de agregação é um fenômeno que ocorre paralelamente ao efeito de ionização e deve ser considerado na determinação dos pK_s , a fim de se prever a absorção de um fármaco adequadamente em cada parte do organismo.

As constantes de ionização de alguns peptídeos fosforilados e derivados da serina e da etanolamina foram determinadas por titulações potenciométricas (FOLSCH; OSTERBERG, 1959).

Existem alguns programas para determinação de constantes de ionização, como MARTELL (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992) e formas clássicas para determinação de constantes de ionização da glicina (ALBERT; SERJEANT, 1971). Porém, a maioria destes requer apenas titulações dos ácidos com hidróxidos de

sódio, e não consideram a influência do fenômeno de agregação. No presente trabalho as constantes de ionização foram determinadas em meio ácido (pK'_{a1}), fracamente básico, com MEA, (pK'_{a2}), fortemente básico, com NaOH, (pK'_{a3} , na presença e ausência de formaldeído) . Por titulação de retorno determinaram-se as três constantes de ionização simultaneamente, na ausência do fenômeno de agregação.

1.5. Utilização do sistema FOS/MEA como tampão biológico

Os ácidos fracos têm para a bioquímica um interesse particular, pois, junto às suas bases conjugadas, constituem os sistemas-tampão, capazes de impedir grandes variações de pH quando há adição de outros ácidos ou bases (MARZOCCO, TORRES, 1999).

Os tampões biológicos são aqueles encontrados nos seres vivos e processos metabólicos normalmente mantêm o pH do sangue humano dentro de uma pequeno intervalo (7,35 -7,45) (PERRIN; DEMPSEY, 1974)

Os principais sistemas tampão encontrados nos fluidos celulares envolvem fosfatos, bicarbonatos, aminoácidos e proteínas. A importância dos tampões em todas as áreas da ciência é imensa; existe um interesse particular no estudo destes sistemas, pois o funcionamento apropriado de qualquer sistema biológico depende do pH (HARRIS, 2005).

Melhores valores das constantes de ionização do ácido carbônico e do ácido fosfórico foram determinados nas condições fisiológicas (JUNGAS, 2005), porém existe a dificuldade em descrever exatamente como atuam várias espécies

juntamente com as proteínas e macromoléculas com carga, que interferem nas condições intracelulares.

A maioria das substâncias com aplicação biológica, assim como a FOS e MEA, são ou ácidos fracos ou bases fracas e, em solução, estão ionizadas numa certa extensão que é determinada pelo seu pK e pelo pH do meio. O grau de ionização do fármaco no meio pode ser quantificado pela equação de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (1)$$

Assim, a distribuição transmembranar de um eletrólito fraco é geralmente determinado pelo seu pK e pelo gradiente de pH através da membrana (DE BRAZ, 2006) . Admitindo-se que a mucosa gástrica se comporta como uma barreira lipídica simples, permeável apenas a forma não ionizada, pode-se calcular a razão entre a forma não-ionizada e a ionizada no suco gástrico (pH=1,4) e no plasma (pH=7,4). Considerando um ácido fraco (pK=3,7) e aplicando a equação de Henderson-Hasselbach, verifica-se que a razão entre a forma molecular e ionizada é de 1:5000 no plasma e de 1:0,005 no suco gástrico, e assim, por um processo de difusão passiva, a substância é facilmente absorvida no estômago.

Para a determinação do pK_a de um dado composto as técnicas mais utilizadas em química analítica são a titulação potenciométrica e espectrofotométrica.

1.6. Estudos por condutimetria

A mobilidade dos íons em solução aquosa de substâncias com interesse farmacológico pode ser verificada por condutimetria (SJOBORG et al, 1996). Na

literatura consta que a titulação condutométrica simultânea dos grupos funcionais da glicina já foi realizada por titulação de retorno, a fim de se evitar a hidrólise e se verificar a protonação do grupo amino (LOISELEUR, 1945).

Ribeiro Filho (1999) verificou que a curva de titulação condutométrica para a FOS com HCl era crescente e as duas inflexões presentes poderiam ser interpretadas como sendo primeiramente a transformação do dímero (FOS)₂ em (FOS/HFOS⁺), correspondente a protonação da metade da fosfoetanolamina total .

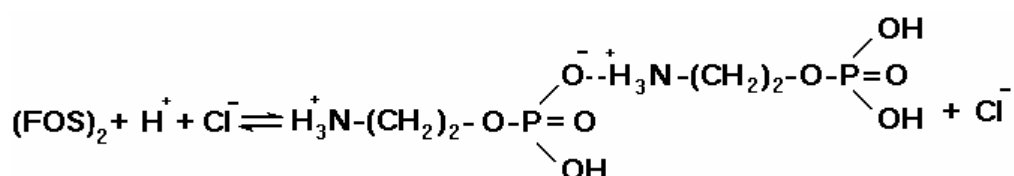


Figura 7. Protonação da metade da fosfoetanolamina.

Posteriormente, a protonação total desta espécie (FOS.HFOS) para formar a espécie catiônica HFOS.

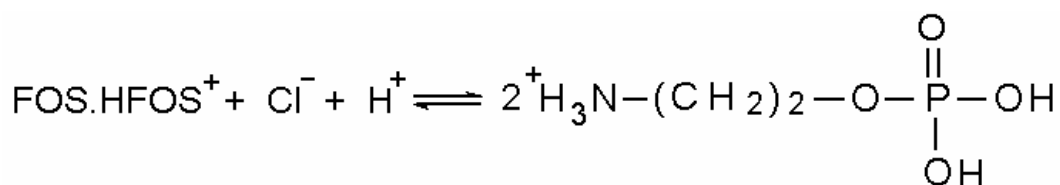


Figura 8. Protonação total da fosfoetanolamina.

A segunda inflexão sugeria a formação do par iônico do íon cloreto com a FOS protonada, resultando em diminuição da carga total do eletrólito,

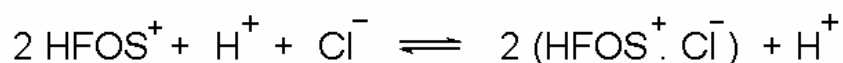


Figura 9. Reação de formação do par iônico do cloreto com a FOS.

Ou seja, formação da espécie:

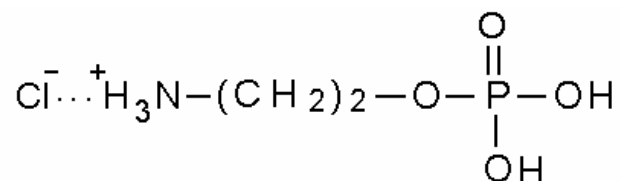


Figura 10. Fórmula do par iônico do cloreto com a FOS.

1.7. Método potenciométrico

O método potenciométrico consiste na medição e registro do pH da solução em função de um certo volume de titulante, que é adicionado ao longo da titulação (GONÇALVES, 2001)

Para a realização destas medidas, utiliza-se uma célula composta por dois eletrodos, um reversível ao íon H^+ (aq) e o outro cujo potencial se mantém constante – eletrodo de referência. O sistema de eletrodos mais frequentemente utilizado em titulações potenciométricas consiste num eletrodo de vidro reversível ao cátion H^+ e um eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Em 1989, um estudo efetuado pela IUPAC demonstrou uma enorme diversidade nos resultados de medidas de constantes de estabilidade, assim como nas metodologias utilizadas para a sua obtenção. Esta diversidade, associada à ocasional falta de especificação das condições experimentais utilizadas, não permitia avaliar a confiabilidade dos resultados e impedia a reprodutibilidade. Assim, a IUPAC propôs uma série de condições a observar, para a obtenção de constantes válidas: pureza dos reagentes, composição das soluções, especialmente em termos de força iônica, intervalo de pH, o titulante utilizado, instrumentação utilizada e

descrição explícita do método de calibração; temperatura; número de pontos experimentais e número de ensaios independentes; programa utilizado para cálculo dos valores e referências bibliográficas associadas ao mesmo; erros obtidos e metodologia utilizada para o seu cálculo.

1.8. Importância da força iônica

A função ácida de pH, definida por Sorensen como :

$$pH = -\log cH^+ \quad (2)$$

Representa cH^+ como concentração de íon hidrogênio e pode ser modificada para:

$$pH = -\log aH \quad (3)$$

Definida em termos de atividade de íon hidrogênio, aH , depois da introdução do conceito de atividade por Lewis e o sucesso do modelo de Debye-Huckel para soluções eletrolíticas (LITO; CAMÕES, 1990).

Um dos modelos que fala sobre a ação dos íons numa solução é o de Debye e Huckel. Este modelo considera uma solução iônica como pontos de carga que exercem atração eletrostática uma sobre as outras, sendo o solvente homogêneo e não estruturado. Um íon em particular tende a atrair outros íons, formando uma atmosfera carregada ao seu redor (LAITINEN, 1975).

As interações que ocorrem entre os íons e moléculas fazem com que ocorra diminuição do potencial químico do íon no estado padrão. A medida desse desvio do potencial químico é denominada atividade. A atividade, na essência, é uma quantidade sem dimensão; por convenção, a atividade de qualquer íon no estado padrão é igual a 1. Portanto, quanto maior o número e mais intensa a interação dos íons em solução, mais reduzida será a sua atividade.

A atividade de um determinado íon a_i é obtida pelo produto da concentração deste íon c_i pelo coeficiente de atividade γ_i :

$$a_i = c_i \cdot \gamma_i \quad (4)$$

O coeficiente de atividade pode ser estimado por meio de equações como as de Debye-Huckel, baseada em leis eletrostáticas e de termodinâmica, sendo a mais simples a chamada equação limite (limitante), considerando os íons como cargas pontuais nas condições de $\mu < 0,01 \text{ mol L}^{-1}$:

$$\log \gamma_i = -A \cdot Z_i^2 \cdot \mu^{1/2} \quad (5)$$

Em que $A=0,509$ para a água a 25° C , Z_i é igual a valência do íon, μ é igual à força iônica da solução .

A utilização de medidas de pH na determinação das constantes de estabilidade requer um cuidadoso tratamento e calibração do eletrodo de vidro e pHmetro.

A maioria dos estudos de equilíbrio é feita na presença de um eletrólito suporte inerte, no caso o NaCl, a fim de manter constante a força iônica. O eletrodo de vidro deve ser condicionado (longo tempo mergulhado numa solução de pH conhecido e mesma força iônica de trabalho) e calibrado nas mesmas condições de estudo, para que se possa medir com precisão a variação da concentração hidrogeniônica ao invés de atividade iônica. O eletrólito interno do eletrodo de referência, geralmente KCl, é substituído por solução de NaCl de mesma concentração. Quando é adicionado um sal em uma solução, o número de cargas livres dentro da solução aumenta. Com este aumento, as interações eletrostáticas crescem na solução, podendo produzir vários efeitos nos compostos. A quantidade

de partículas eletricamente carregadas numa solução define uma quantidade denominada força iônica. A força iônica pode ser matematicamente escrita como:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (6)$$

Na qual C_i é a concentração molar de cada íon em solução e Z_i sua respectiva carga, sendo a somatória dos produtos das concentrações com as cargas da solução. A definição da força iônica é válida para uma solução iônica em equilíbrio.

Quando algum composto carregado aparece num meio com alta força iônica, os íons com carga oposta formam uma nuvem ao redor das moléculas, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre elas e facilitando sua agregação através de outros tipos de interações atrativas.

A influência de alguns aminoácidos sobre a precipitação espontânea de oxalato de cálcio sob alta força iônica foi estudada (SKRTIC; MIHOFER, 1993). O crescimento dos cristais (interpretadas como início de agregação) depende da concentração e do aminoácido em questão.

1.9. OBJETIVOS

- ✓ Comparar o comportamento condutométrico da FOS com a glicina;
- ✓ Estudar a complexação de cálcio e magnésio com FOS por condutimetria;
- ✓ Estudar a influência do equilíbrio de agregação para a FOS, por titulações em meio ácido, determinação da constante de agregação (K_{ag}) e da primeira constante de ionização, K'_{a1} , e pelo método espectrofotométrico “Azul de Molibdênio”;
- ✓ Comparar os valores teórico e experimental para a segunda constante de ionização da FOS, por titulações com a monoetanolamina;
- ✓ Compreender a possibilidade de utilização do sistema FOS/MEA como um tampão biológico pelo gráfico de capacidade tamponante máxima vs. pH;
- ✓ Determinar o valor de K'_{a3} da FOS por titulações com NaOH na presença e ausência de formaldeído;
- ✓ Realizar a determinação simultânea das três constantes de ionização pela titulação da FOS com HCl 1 mol L⁻¹ e posterior adição de base e,
- ✓ Obter os gráficos de número médio de protonação vs. pH, distribuição de espécies e o diagrama logarítmico (ROSSOTTI, 1978), (ROSSOTTI; ROSSOTTI, 1960) e ENKE (2001).

CAPÍTULO 2: EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho constam na Tabela 1:

Tabela 1. Relação das procedências e dos reagentes

Reagente	Procedência
Cloreto de Cálcio dihidratado	J.T.Baker
Cloreto de Magnésio hexahidratado	Mallinckrodt
Nitrato de Prata	Cenabras
Ácido Clorídrico	Mallinckrodt
Ácido Sulfúrico	Mallinckrodt
Hidróxido de Sódio	Merck
Molibdato de Amônio	Merck
Monohidrogenoflato de potássio	Merck
Monoetanolamina	Riedel-de Haen
Fosfoetanolamina	Sintetizada no GQATP
Hidróxido de sódio	Vetec
Formaldeído	Synth
Sulfato de hidrazina	Riedel-de Haen
Cloreto de sódio	Vetec
Dihidrogenofosfato de sódio	Merck

A padronização dos cloretos dos metais foi realizada pelo Método de Mohr, por meio da titulação com nitrato de prata. A água das soluções de NaOH foram previamente fervidas para liberação de CO₂ e padronizadas com

monohidrogenoftalato de potássio. As soluções de HCl foram padronizadas com o NaOH. A fosfoetanolamina foi purificada por recristalização em água e posteriormente realizou-se a caracterização da FOS.

2.2. Caracterização da FOS

2.2.1. Análise Elementar

A determinação do teor de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio da fosfoetanolamina foi realizada no Analisador Elementar GA 1110 CHNS-O CE Instruments.

2.2.2. Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho

Para a obtenção do espectro de infravermelho da FOS utilizou-se um Espectrômetro BOMEM, Modelo MB-102, equipado com sistema de transformada de Fourier operando na região de número de ondas de 500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de IR foram obtidos por meio da leitura de uma pastilha preparada a partir de uma alíquota da amostra, que foi misturada e prensada com brometo de potássio.

2.3. Estudo da resposta do eletrodo de vidro

Foram realizadas adições sucessivas e medidas potenciométricas de NaCl 1,00 mol L⁻¹ com solução de HCl 0,01 mol L⁻¹ em força iônica 0,15 mol L⁻¹; 0,50 mol L⁻¹ e 1,00 mol L⁻¹ ajustada com NaCl, o pH foi medido utilizando eletrodo de vidro combinado.

2.4. Determinação do pK'_{a1} : estudo em meio ácido e determinação da constante de agregação

Foram realizadas titulações potenciométricas em várias concentrações de FOS e ácido clorídrico no intervalo entre 1.10⁻¹ a 1.10⁻³ mol L⁻¹. A força iônica foi ajustada com NaCl 1,00 mol L⁻¹. Incrementos de 0,50 mL de ácido foram adicionados a 10,00 mL de fosfoetanolamina, realizando-se as medidas de pH a cada incremento .

2.5. Estudo espectrofotométrico pelo Método Azul de Molibdênio: comprovação do fenômeno de agregação

Em determinações espectrofotométricas, pelo Método “Azul de molibdênio” os Íons fosfato e molibdato em solução ácida condensam-se a ácido molibdofosfórico e é reduzido a uma solução azul. Utilizou-se o sulfato de hidrazina como redutor e as soluções foram aquecidas a 100°C por 10 minutos. Para construção da curva analítica foram preparadas soluções padrão de dihidrogenofosfato de sódio, nas

concentrações de fosfato no intervalo entre 1,4 a 5,6 ppm (VOGEL, 1992); (MOUAD et al, 2005), (AL-ASFUR et al, 2007).

2.6. Determinação do $pK'a_2$: titulações com MEA

Utilizou-se um pH-metro Corning 130 e um eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl, da marca Digimed, célula de 50 mL, e um termostato para as titulações volumétricas. Todas as soluções foram ajustadas em força iônica $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, com NaCl, e a temperatura mantida constante em 25° C .

2.7. Determinação do $pK'a_3$: titulações com NaOH na presença e ausência de formaldeído

Titularam-se 10,00 mL de FOS $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência e na presença de 5 mL de formaldeído 37% vs NaOH $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, com força iônica $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl, temperatura constante em 25° C e atmosfera inerte de nitrogênio, para bloquear o grupo amino da FOS e determinar $K'a_3$.

2.8. Determinação simultânea das três constantes de ionização

A determinação simultânea das três constantes de ionização foi possível realizando-se uma titulação potenciométrica de 10,00 mL de fosfoetanolamina $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ com 1,00 mL HCl $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ e posterior adição de NaOH $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (titulação de retorno), com força iônica $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl, temperatura constante em 25° C e atmosfera inerte de nitrogênio.

2.9. Determinação do número médio de protonação

Baseando-se na equação 7, (ROSSOTTI, 1978), (ROSSOTTI; ROSSOTTI, 1960) muito utilizada em trabalhos de determinação de constantes de ionização de fármacos (ALEKSIC et al,2004), (JOVANOVIC et al, 2004), (COTISEL, 1999), determinou-se o número médio de protonação.

$$\bar{n} = \frac{CFOS + [HCl] - [NaOH] - [H^+] + [OH^-]}{CFOS} \quad (7)$$

$$\bar{n} = \frac{3[H^+]^2 + 2K'a_1[H^+] + K'a_1.K'a_2}{[H^+]^2 + K'a_1[H^+] + K'a_1.K'a_2} \quad (8)$$

2.10. Determinação da capacidade tamponante máxima ou índice de tampão

A determinação da capacidade tamponante foi realizada de acordo com definição de capacidade tamponante ou índice de tampão, segundo Van Slyke: “A razão entre a variação da concentração da base forte e a variação de pH”. Em termos de fórmula, a capacidade tamponante (PERRIN; DEMPSEY, 1974) pode ser representada:

$$\beta = \frac{dC_{base}}{dpH} = \frac{dC_{ácido}}{dpH} = 2,303 \left\{ \frac{CFOS.K'_a[H^+]}{([H^+] + K'_a)^2} + \frac{K_w}{[H^+]} + [H^+] \right\} \quad (9)$$

2.11. Curva de distribuição de espécies para a FOS

Com a determinação dos valores de constante de ionização e número médio de protonação, obteve-se a curva de distribuição de espécies por meio do programa ASCA (ENKE,2001). Para um ácido tribásico como a fosfoetanolamina, as equações dos equilíbrios a serem consideradas são as seguintes:

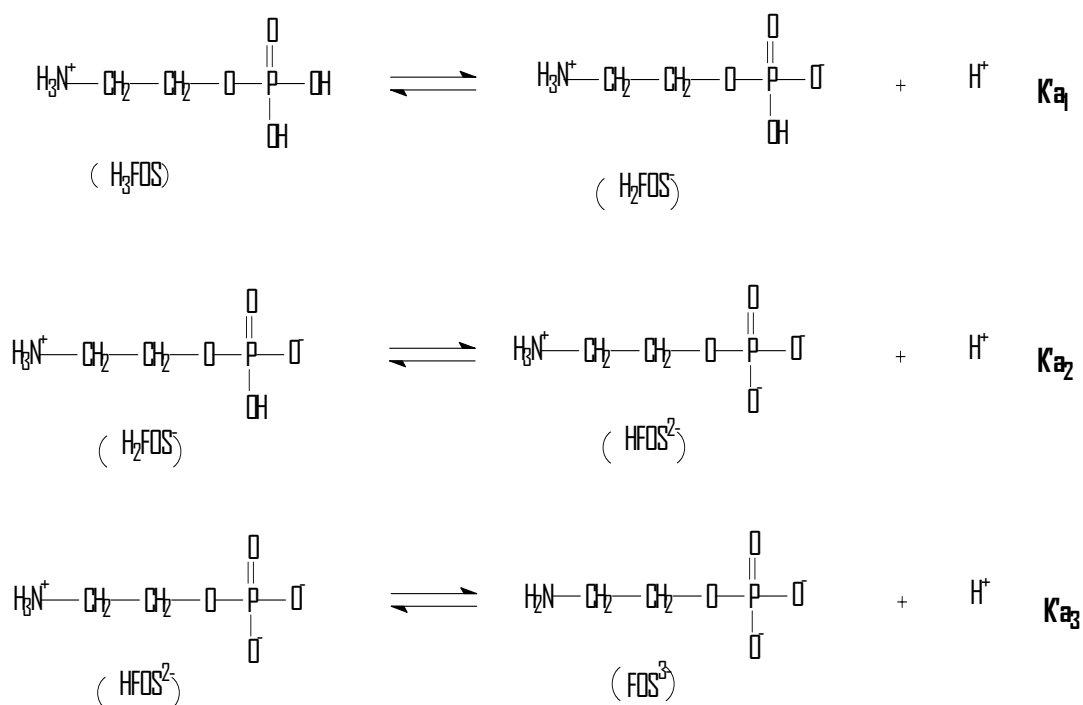


Figura 11. Espécies presentes nos equilíbrios da FOS

As equações de 10 a 13 representam o grau de ionização de cada uma das espécies H_3FOS , H_2FOS^- , $HFOS^{2-}$ e FOS^{3-} para a fosfoetanolamina :

$$\alpha_{H_3FOS} = \frac{[H^+]^3}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \quad (10)$$

$$\alpha_{H_2FOS^-} = \frac{K_1[H^+]^2}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \quad (11)$$

$$\alpha_{HFOS^{2-}} = \frac{K_1K_2[H^+]}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \quad (12)$$

$$\alpha_{FOS^{3-}} = \frac{K_1K_2K_3}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3} \quad (13)$$

2.12. Estudo do equilíbrio de complexação de íons cálcio e magnésio com fosfoetanolamina

A fim de se observar a interação de íons cálcio e magnésio com a FOS, foram realizadas titulações condutométricas da FOS $0,040 \text{ mol.L}^{-1}$ com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$. Adicionaram-se volumes de $0,50 \text{ mL}$ dos

sais dos íons metálicos a 25,00 mL de FOS 0,040 mol L⁻¹, previamente purificada e padronizada com NaOH. Os sais dos íons metálicos foram padronizados pelo Método de Mohr. A temperatura foi mantida a 25 ° C, sob a atmosfera inerte de nitrogênio. As medidas de condutâncias ou condutividade nas soluções foram realizadas em um condutivímetro digital DIGIMED, modelo DM31, com célula de condutividade DIGIMED Mod DMC-010 com constante da célula 1 cm⁻¹.

O tratamento dos dados foi realizado com o auxílio de um programa computacional CONDUT. BAS, em linguagem Quick Basic, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Eduardo Neves.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da FOS

3.1.1. Análise Elementar

Os resultados teóricos, ou seja, calculados foram concordantes com os resultados experimentais obtidos na Análise Elementar, estes valores constam na Tabela 2.

Tabela 2. Valores calculados e encontrados de N, C e H

% N _(calculado/encontrado)	% C _(calculado/encontrado)	% H _(calculado/encontrado)
9,92/9,54	17,01/16,60	5,67/ 5,80

Os dados de análise elementar e de infravermelho (Figura 12, Tabelas 2 e 3) estão concordantes com os obtidos por RIBEIRO FILHO (1999), que obteve a estrutura cristalina por Difractometria de raios-X e os valores de distância e ângulos similares aos da literatura (FERRIER; LINDSAY; YOUNG, 1962), (WEBER, 1984), (SWAMINATHAN; CRAVEN, 1984), (KRAUT, 1961) .

3.1.2. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

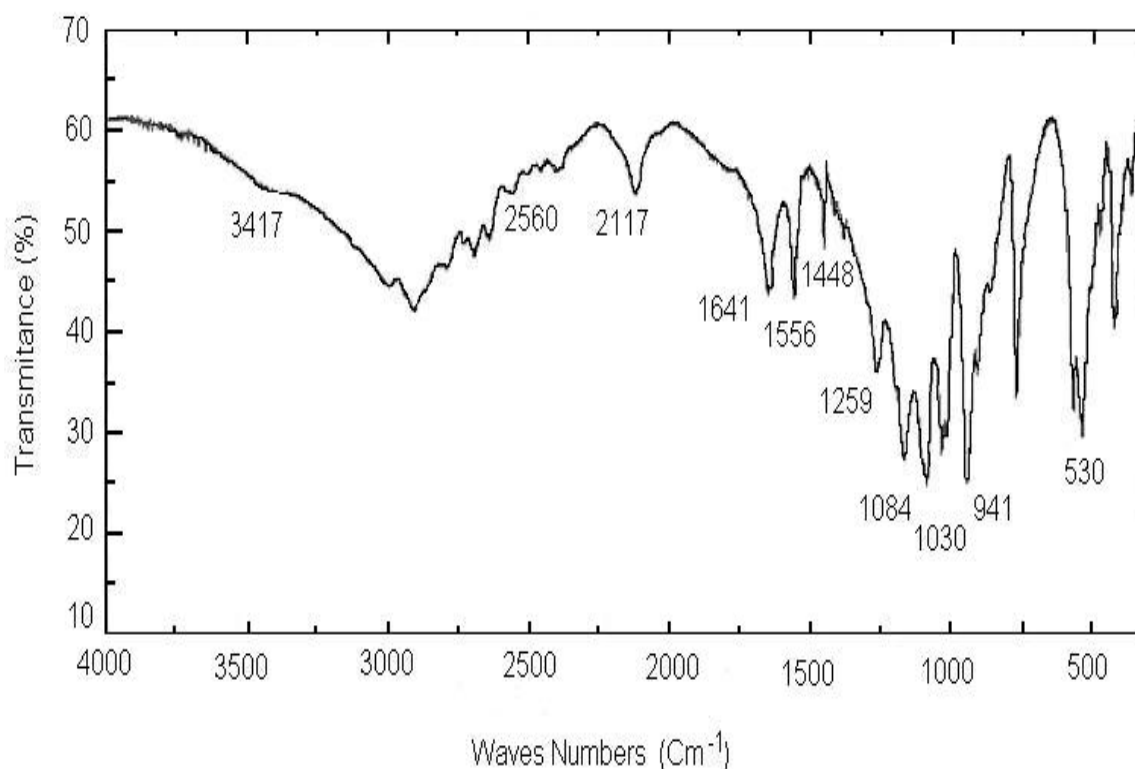


Figura 12. Espectro vibracional obtido na região do infravermelho da FOS.

Tabela 3. Números de onda observados no IR e as possíveis atribuições (SILVERSTEIN et al, 1979)

Número de onda / cm ⁻¹	Possíveis atribuições
3417-2560	Superposição de bandas de deformação axial NH ₃ ⁺ e OH ⁻
2117	Deformação angular simétrica de NH ₃ ⁺
1641	Deformação angular assimétrica de NH ₃ ⁺
1556	Deformação angular simétrica de N-H
1448	Deformação angular simétrica de CH ₂
1259	Deformação axial de P=O
1084-941	Deformação axial de P-OH
1030	Deformação axial de P-O-C
530	Oscilação com estiramento do grupo NH ₃ ⁺

3.2. Estudo da resposta do eletrodo de vidro

Os experimentos para determinação da resposta Nernstiana foram realizados utilizando um eletrodo de vidro. Foi utilizado o eletrólito NaCl em três concentrações distintas 0,15; 0,50 e 1,00 mol L⁻¹, em que alíquotas previamente termostatizadas a 25° C eram tituladas com ácido clorídrico padronizado e com mesma força iônica do eletrólito. Os valores obtidos nas medidas de potencial do eletrodo de vidro ao titular NaCl 0,15; 0,50 e 1,00 mol L⁻¹ com HCl 0,010 mol L⁻¹ constam nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Com o auxílio de um programa computacional elaborado em Quick Basic obtiveram-se as respostas do eletrodo nas titulações seqüenciais, com as devidas correções de volume nas diluições realizadas.

3.2.1. Estudo do slope da resposta do eletrodo de vidro $\mu = 0,15$

Tabela 4. Valores de medida de potencial para obtenção do desvio da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro, em titulação de HCl 0,010 mol L⁻¹ com NaCl, $\mu = 0,15$ mol L⁻¹

VH ⁺ (mL)	[H ⁺]	-LOG[H ⁺]	E(mV)	E ₀ '(mV)
0,5000	4,7619E-04	3,3220	0,1510	0,3036
1,0000	9,0909E-04	3,0414	0,1603	0,3000
1,5000	1,3043E-03	2,8846	0,1680	0,3005
2,0000	1,6667E-03	2,7781	0,1747	0,3023
2,5000	2,0000E-03	2,6990	0,1788	0,3028
3,0000	2,3077E-03	2,6368	0,1817	0,3028
3,5000	2,5926E-03	2,5863	0,1828	0,3016
4,0000	2,8571E-03	2,5441	0,1844	0,3013
4,5000	3,1034E-03	2,5082	0,1872	0,3024
5,0000	3,3333E-03	2,4771	0,1887	0,3025

$E_0' = 0,3019 \pm 0,0011$
 SLOPE = 0,0459
 $R^2 = 0,9918$
 SLOPE NERNST = 0,05916
 % DE RESPOSTA DO ELETRODO = 77,6519%

3.2.2. Estudo do slope da resposta do eletrodo de vidro $\mu = 0,50$

Tabela 5. Valores de medida de potencial para obtenção do desvio da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro, em titulação de HCl 0,010 mol L⁻¹ com NaCl, $\mu = 0,50$ mol L⁻¹

VH ⁺ (mL)	[H ⁺]	-Log[H ⁺]	E(mV)	E ₀ '(mV)
0,5000	4,7619E-04	3,3220	0,1420	0,3292
1,0000	9,0909E-04	3,0414	0,1528	0,3242
1,5000	1,3043E-03	2,8846	0,1650	0,3275
2,0000	1,6667E-03	2,7781	0,1701	0,3266
2,5000	2,0000E-03	2,6990	0,1743	0,3264
3,0000	2,3077E-03	2,6368	0,1786	0,3272
3,5000	2,5926E-03	2,5863	0,1817	0,3274
4,0000	2,8571E-03	2,5441	0,1840	0,3273
4,5000	3,1034E-03	2,5082	0,1862	0,3275
5,0000	3,3333E-03	2,4771	0,1883	0,3279

$E_0' = 0,3271 \pm 0,0013$

SLOPE = 0,05634

$R^2 = 0,99279$

SLOPE NERNST = 0,05916

% DE RESPOSTA DO ELETRODO = 95,2420 %

3.2.3. Estudo do slope da resposta do eletrodo de vidro $\mu = 1,00$

Tabela 6. Valores de medida de potencial para obtenção do desvio da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro, em titulação de HCl 0,010 mol L⁻¹ com NaCl, $\mu = 1,00$ mol L⁻¹

VH ⁺ (mL)	[H ⁺]	-Log [H ⁺]	E(mV)	E ₀ '(mV)
0,5000	4,7619E-04	3,3220	0,1533	0,3487
1,0000	9,0909E-04	3,0414	0,1693	0,3482
1,5000	1,3043E-03	2,8846	0,1785	0,3482
2,0000	1,6667E-03	2,7781	0,1847	0,3481
2,5000	2,0000E-03	2,6990	0,1898	0,3486
3,0000	2,3077E-03	2,6368	0,1937	0,3488
3,5000	2,5926E-03	2,5863	0,1964	0,3485
4,0000	2,8571E-03	2,5441	0,1989	0,3486
4,5000	3,1034E-03	2,5082	0,2008	0,3484
5,0000	3,3333E-03	2,4771	0,2027	0,3484

Com esses valores foi construída a curva analítica da Figura 18:

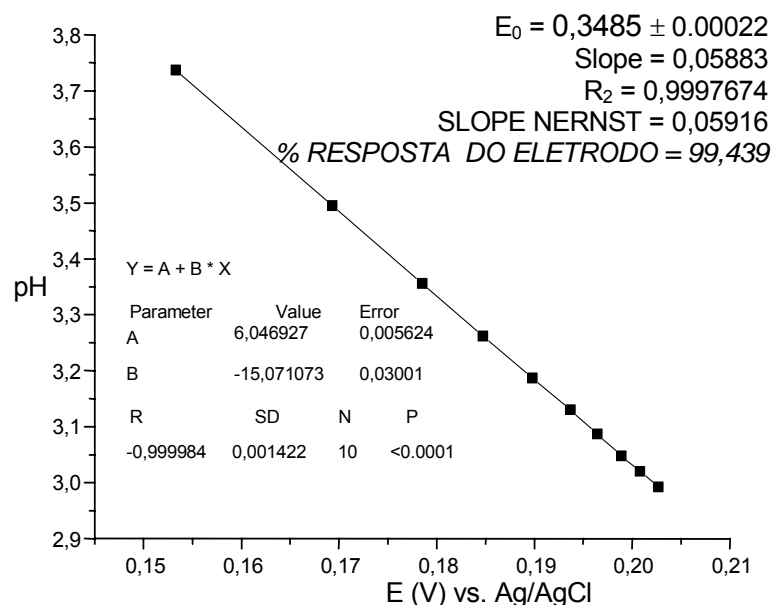


Figura 13. Determinação da resposta Nernstiana do eletrodo de vidro em relação ao potencial e pH em eletrólito de NaCl 1,00 mol L⁻¹.

Optou-se em realizar as medidas para determinação das constantes de equilíbrio no presente trabalho em $\mu = 1,00 \text{ mol L}^{-1}$ com NaCl, uma vez que nesta força iônica a resposta Nernstiana foi de 99,49% (Tabela 6 e Figura 13).

3.3. Determinação do $pK'a_1$

Primeiramente repetiu-se o estudo realizado por RIBEIRO FILHO (1999) , porém o tratamento matemático foi realizado utilizando Excel, seguindo as equações referentes aos equilíbrios da forma ionizada:

$$CH^+ = 10^{-pH} \quad (14)$$

$$CHH = CH \frac{(V_i)}{(V_i + V_{ad})} \quad (15)$$

$$CHFOS = CHH + (CH^+) \quad (16)$$

$$CFOS = CFOS \frac{(V_i)}{(V_i + V_{ad})} \quad (17)$$

$$CFOS' = CFOS - (CH^+) \quad (18)$$

O cálculo do pK foi realizado utilizando-se a Equação 1 (página 32). De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch; o gráfico de pK vs. pH deveria ser uma reta, e não uma curva, como a obtida experimentalmente (Figura 14). Tal fato evidencia o fenômeno de agregação, que deve estar influenciando na resposta do sistema.

Tabela 7. Valores para determinação de K'_{a1} com CFOS e CH^+ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

VFOS	VH⁺	pH	CHH	ΔH^+	CFOS	CFOS'	CHFOS
10,00	0,50	2,198	0,0047	0,0046	0,0952	0,0906	0,0093
10,00	1,00	1,945	0,0090	0,0096	0,0909	0,0812	0,0187
10,00	1,50	1,776	0,0130	0,0150	0,0869	0,0719	0,0280
10,00	2,00	1,656	0,0166	0,0203	0,0833	0,0629	0,0370
10,00	2,50	1,559	0,020	0,0258	0,08	0,0541	0,0458
10,00	3,00	1,486	0,0230	0,0309	0,0769	0,0460	0,0539
10,00	3,50	1,420	0,0259	0,0362	0,0740	0,0377	0,0622
10,00	4,00	1,360	0,0285	0,0419	0,0714	0,0295	0,0704
10,00	4,50	1,315	0,0310	0,0466	0,0689	0,0222	0,0777
10,00	5,00	1,276	0,0333	0,0512	0,0666	0,0154	0,0845
10,00	5,50	1,242	0,0354	0,0555	0,0645	0,0089	0,0910

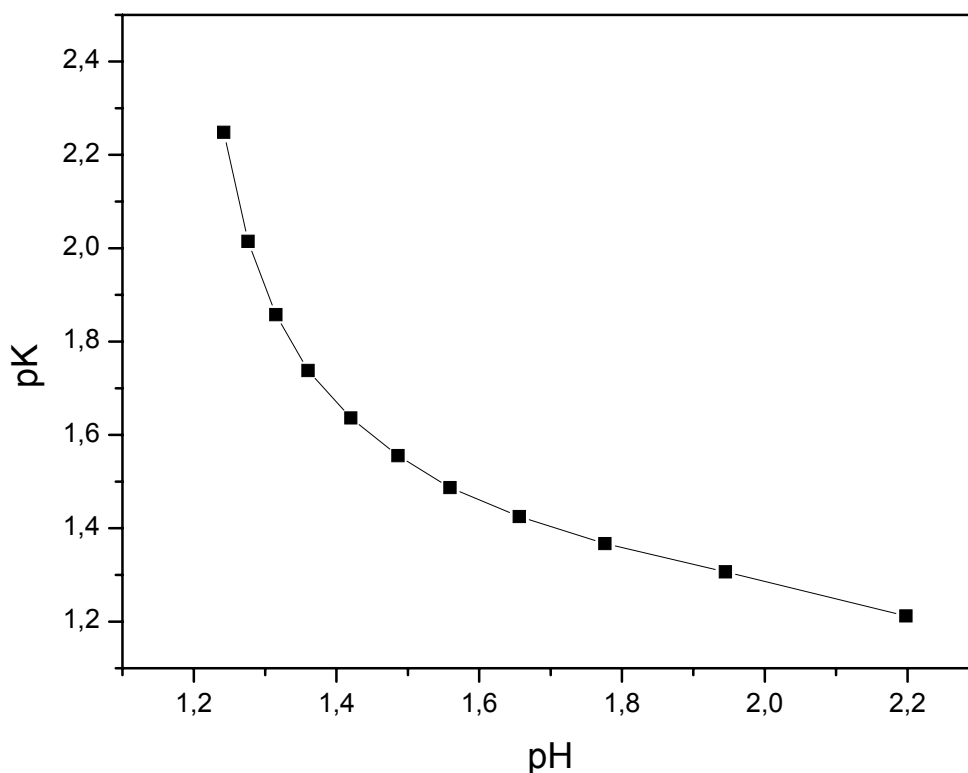


Figura 14. Valores de pK calculados seguindo a Equação 1 vs. valores de pH obtidos experimentalmente.

A partir do gráfico de pK vs. pH é possível verificar que existe um desvio da linearidade, pois segundo a Equação 1 o gráfico obtido deveria ser uma reta, e experimentalmente obteve-se uma curva.

O desvio da linearidade da curva sugere dois valores de pK, que pode estar relacionado com as interações do tipo HFOS⁺/FOS ou FOS/FOS. A fim de eliminar as interações do tipo [HFOS]/[FOS], extrapolou-se para níveis zero de concentração da forma HFOS e isto foi feito para cada CFOS. Calculou-se fazendo-se a correção de volume e balanço de massa para as constantes condicionais K'. A Figura 15 mostra K' de ionização vs. CHFOS.

Como observado, a equação de equilíbrio de ionização não é o suficiente para descrever os equilíbrios existentes para CFOS. O valor encontrado para essa nova constante convencionou-se chamar de K'_{a1} . Foram realizados vários experimentos para a determinação de K'_{a1} em função de CFOS. Obteve-se a Figura 16, que após extrapolação para zero forneceu o valor de K'_{a1} .

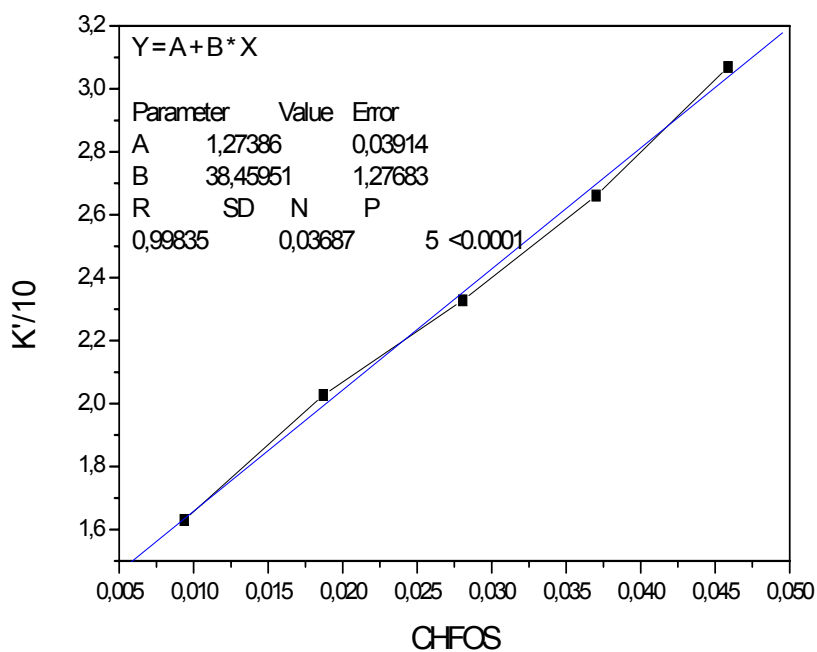


Figura 15. Valores de $K^{-1}/10$ calculados seguindo a Equação 1 vs. CHFOS.

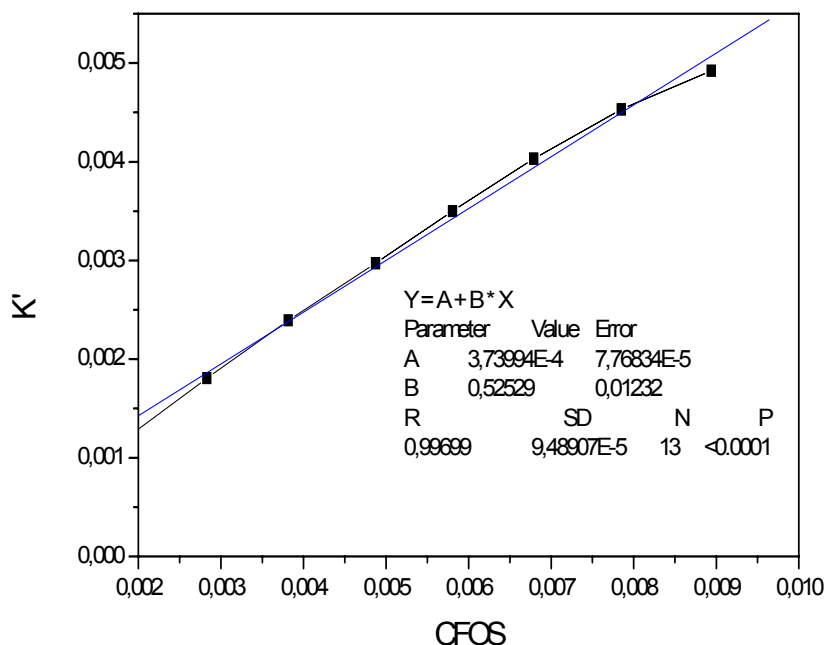


Figura 16. Valores de K'_{a1} obtidos pela extrapolação de vários gráficos obtidos em diversas concentrações, vs. CFOS.

3.3.1. Determinação da constante de agregação

Por meio dessas extrapolações obteve-se o valor da constante corrigida (K'_{a1}), isto é, excluído os efeitos da agregação ou de qualquer outra interação, que pode ser representado pela equação abaixo:

$$K'_{a1} = \frac{[H^+].[FOS]}{[HFOS^+]} \quad (19)$$

K'_{a1} representa a constante de equilíbrio de ionização corrigida, sem os efeitos da agregação, ou seja com os valores isentos de qualquer tipo de influência. A Figura 16 mostra que o valor de K'_{a1} é $3,7 \times 10^{-4}$, portanto o pK'_{a1} é 3,4.

Conhecendo o valor de K'_{a1} , pode-se calcular a fração livre (α_0) para concentração livre de fosfoamina [FOS] em cada CFOS. O valor de α_0 é obtido pela relação K_{a1} / K'_{a1} .

$$\frac{K_{a1}}{K'_{a1}} = \frac{[H^+].[FOS]}{[HFOS]^+} \cdot \frac{[HFOS^+]}{[H^+].CFOS} = \frac{[FOS]}{CFOS} = \alpha_0 \quad (20)$$

A concentração livre de agregação de [FOS] e a concentração de equilíbrio são obtidas a partir do produto de α_0 por CFOS, portanto:

$$[FOS] = \alpha_0 \cdot CFOS \quad (21)$$

Se houver somente a agregação da forma dímica esta será dada pelas equações:



$$K_{ag} = \frac{[(FOS)_2]}{[FOS]^2} \quad (22)$$

Sendo K_{ag} é a constante de agregação para a forma dímica

(23)

$$\frac{CFOS - [FOS]}{2} = K_{ag} [FOS]^2$$

Tabela 8. Valores referentes aos tratamentos matemáticos para determinação de K_{ag} , em várias concentrações, força iônica constante

CFOS	K_{a1}'	α_0	$\alpha_0 \cdot CFOS =$ [FOS]	$(CFOS -$ [FOS])/2	$[FOS]^2$
0	$2,1 \times 10^{-4}$	-	-	-	-
0,1	$1,3 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-8}$
0,02	$4,1 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$9,9 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-8}$
0,01	$2,4 \times 10^{-2}$	$8,8 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-3}$	$7,7 \times 10^{-9}$
0,005	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$8,1 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-9}$

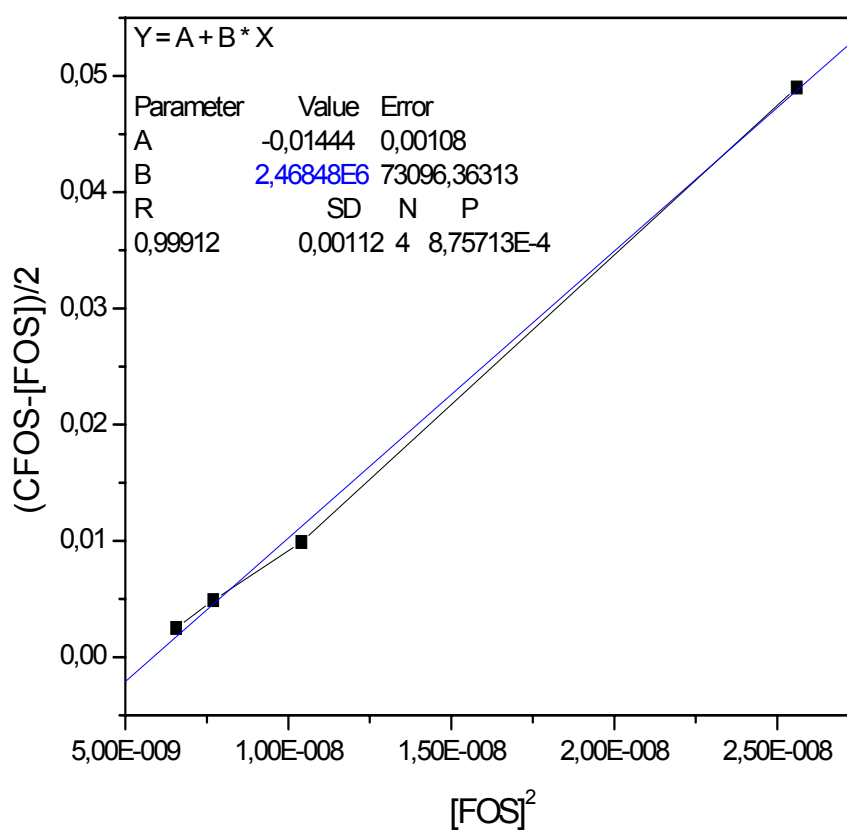


Figura 17. Determinação da constante de agregação.

O valor da Constante de agregação K_{ag} é obtido pelo coeficiente angular da reta da Figura 17. O valor encontrado para $K_{ag} = 2,46 \times 10^6$. Isso significa que a estabilidade da forma agregada é maior que a ionizada (a constante de ionização é da ordem de 10^{-4}).

3.3.2. Estudo espectrofotométrico pelo método “Azul de molibdênio”

Para determinação de fosfato em baixas concentrações é recomendado o método espectrofotométrico “Azul de molibdênio” (AOC, 1995). O método é um dos mais recomendados para a determinação de fósforo (ESTELA; CERDÁ, 2005) e consiste na condensação dos íons ortofosfato e molibdato para a formação do ácido molibdofosfórico, que, por redução (estado de oxidação + 6 para + 5) produz um complexo de coloração azul, cuja absorvidade molar se encontra elevada em torno de 660 nm (CHRISTIAN, 2004). A intensidade da cor azul é proporcional à quantidade de fosfato inicialmente incorporada ao heteropoliácido. Os agentes redutores empregados são ácido ascórbico, cloreto estanoso e sulfato de hidrazina. A reação de redução com ácido ascórbico é lenta, mas existe a possibilidade de utilizar o antimônio como catalisador. Empregando o cloreto estanoso, a sensibilidade é maior, sendo a reação de redução rápida. No entanto, o desenvolvimento da cor é instável e difícil de ser reproduzido (ESTELA; CERDÁ, 2005). Por isso, utilizou-se o sulfato de hidrazina como redutor no presente trabalho.

Preparou-se uma solução estoque de NaH_2PO_4 0,22 g/L; a partir da qual se obteve padrões de fosfato nas concentrações no intervalo de 1,39 a 5,56 ppm. A concentração do molibdato de amônio era 24,42 g/L, acidificada com H_2SO_4 5 mol L^{-1} .

Os espectros de absorção obtidos na região do visível são apresentados na Figura 18.

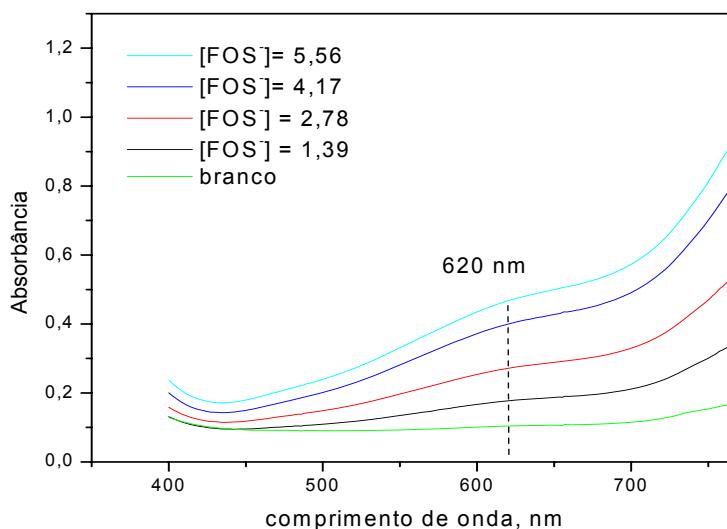


Figura 18. Espectros de absorção obtidos na região do visível.

A partir desses resultados foi obtida uma curva de calibração no comprimento de onda de 620 nm (Figura 19), por meio da qual se realizou determinação de fosfato na FOS.

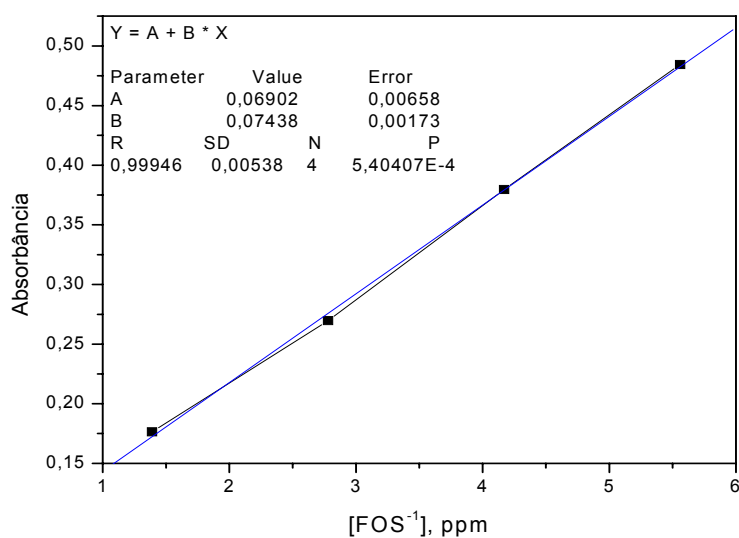


Figura 19. Curva analítica com padrões de dihidrogenofosfato de sódio.

Tabela 9. Valores calculado e experimental da porcentagem de fosfato livre da FOS

Amostra	FOS ⁻ calc. (ppm)	FOS ⁻ enc. (ppm)	% FOS ⁻
fosfoetanolamina	3800	43,7	1,15

Os dados obtidos sugerem que somente 1% do fosfato encontra-se na forma livre para formar o complexo de molibdênio. Tal fato pode ser explicado pela alta estabilidade da forma agregada da fosfoetanolamina (a constante de agregação é 10^6 vezes maior que a constante de ionização).

3.4. Determinação do pK'a₂

As curvas obtidas (Figura 20), curva derivada (Figura 21) da titulação potenciométrica e curva condutométrica (Figura 22) de 10,00 mL da FOS $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ com MEA $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ evidenciam que na proporção 1:1 de ácido:base, atingiu-se o valor do pK'a₂, 6,4.

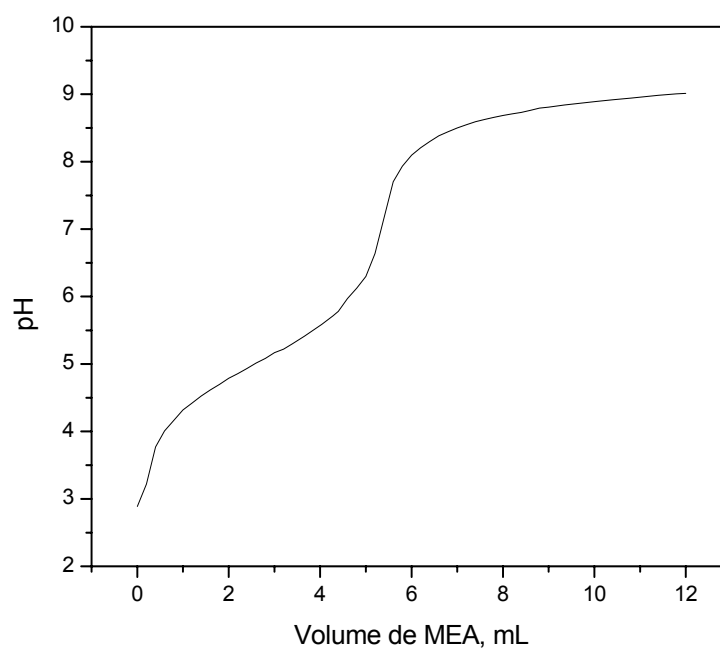


Figura 20. Curva de titulação da FOS $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ vs. MEA $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, $\mu = 1,00$.

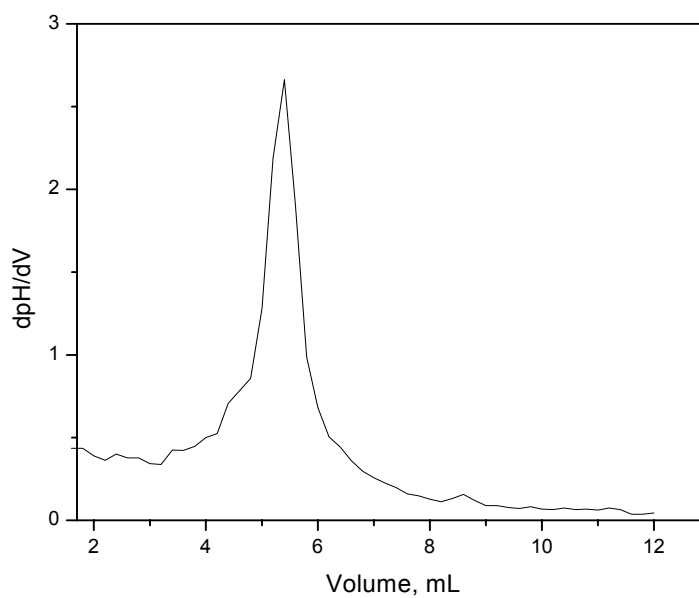


Figura 21. Derivada da curva da Figura 20.

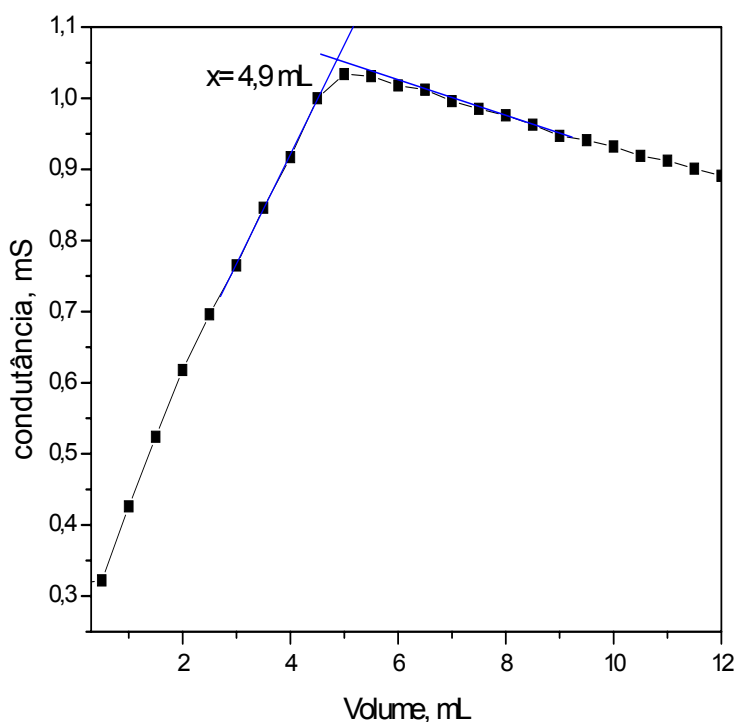
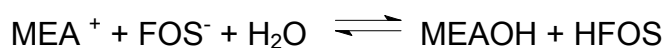
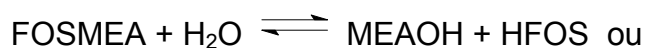


Figura 22. Curva de titulação condutométrica de 10 mL de FOS 0,020 mol L⁻¹ vs. MEA 0,040 mol L⁻¹.

A Figura 22 confirma a remoção dos dois prótons da FOS na proporção 1:1 por condutometria.

As reações dos equilíbrios de neutralização (KOLTHOFF, 1969); (FLASCHKA, 1980); (ALEXÉEV, 1966); (OHLWEILER, 1976); (BACCAN et al, 1979); (BARD, 1970) de um ácido fraco com uma base fraca como a FOS (ácido fraco) com a MEA (base fraca), para determinação do ponto de equivalência podem ser descritos das seguintes formas:



$$K_h = \frac{[\text{MEA}][\text{HFOS}]}{[\text{MEA}^+][\text{FOS}^-]} \quad (24)$$

$$K_h = \frac{[MEA^+].[OH^-].[H^+].[FOS^-]}{K_b.K_a.[MEA^+].[FOS^-]} = \frac{[OH^-].[H^+]}{K_b.K_a} = \frac{10^{-14}}{K_b.K_a} \quad (25)$$

Considerando $[MEA^+] = [FOS^-] = X$ e $[MEAOH] = [HFOS]$ e substituindo na Equação 24:

$$K_h = \frac{10^{-14}}{K_b.K_a} = \frac{[HFOS]^2}{X^2} \quad (26)$$

$$[HFOS^2] = \frac{10^{-14}.X^2}{K_a.K_b} \quad (27)$$

Como $K_a = \frac{[H^+].[FOS^-]}{[HFOS]} = \frac{[H^+].X}{[HFOS]}$, temos que:

$$[HFOS] = \frac{[H^+].X}{K_a} \quad (28)$$

Substituindo a equação 28 em 27, verifica-se que:

$$\frac{[H^+].[X]}{K_a} = \left(\frac{10^{-14}.x^2}{K_a.K_b} \right)^{1/2} \rightarrow [H^+] = \left[\frac{(10^{-14}.K_a)}{K_b} \right]^{1/2}$$

Logo, tem-se a Equação 29, que possibilita o cálculo do pH no ponto de equivalência:

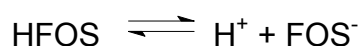
$$pH = 7 + 1/2 pK_a - 1/2 pK_b \quad (29)$$

Considerando-se o $pK'a_1$ da fosfoetanolamina determinado por meio do estudo em meio ácido, ou seja, o valor calculado desconsiderando-se o fenômeno de agregação: 3,42 e o valor do pK_b da monoetanolamina 4,54, têm-se que:

$$\text{pH} = 7 + \frac{1}{2}(3,42) - \frac{1}{2}(4,54) = 7 + 1,71 - 2,27 = \mathbf{6,44 \text{ (valor esperado)}}$$

O valor esperado está concordante com o resultado experimental obtido por meio das titulações potenciométricas e condutométricas.

Considerando-se os equilíbrios de neutralização da titulação com a MEA, têm-se que:



$$\text{Sendo que } \text{CHFOS}' = \text{CHFOS} - \text{MEA} + \Delta\text{H}^+ \quad (30)$$

$$\text{Porém } \text{CFOS}' = \text{MEA} - \Delta\text{H}^+ \quad (31)$$

Substituindo na equação de Henderson- Hasselbach e realizando-se o tratamento matemático do sistema FOS/MEA ,para o gráfico com os dados da curva de titulação da FOS 0,02 mol L⁻¹ vs MEA 0,04 mol L⁻¹ (força iônica 1,00 mol L⁻¹ em NaCl) , foi possível obter o gráfico de K' vs CHFOS. Realizando-se a extrapolação para zero (Figura 23), obteve-se o valor de K'_{a2}, 3,6x 10⁻⁷, ou seja, o pK'_{a2} seria 6,44, concordante com o valor teórico.

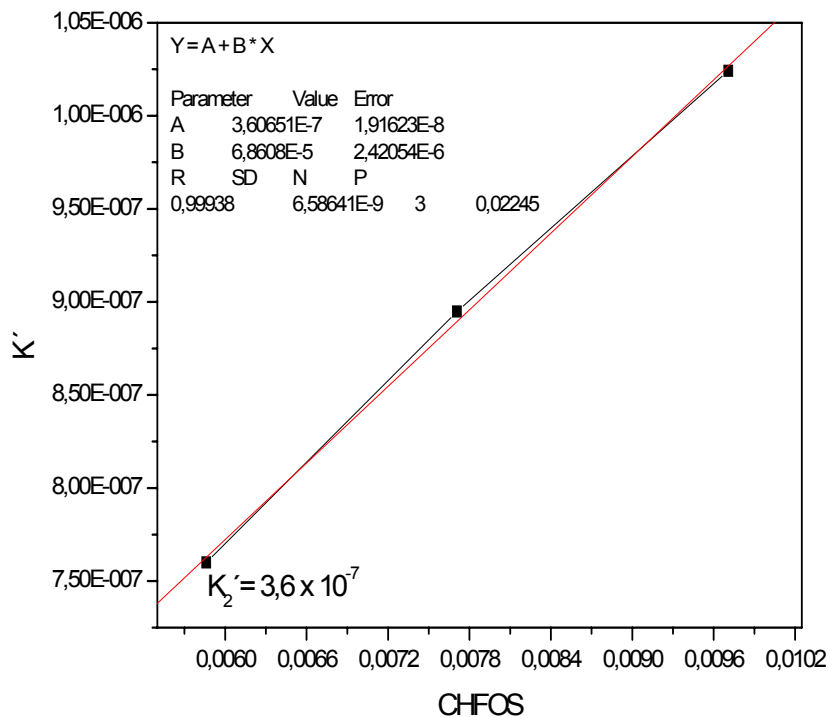


Figura 23. Determinação de $K'a_2$.

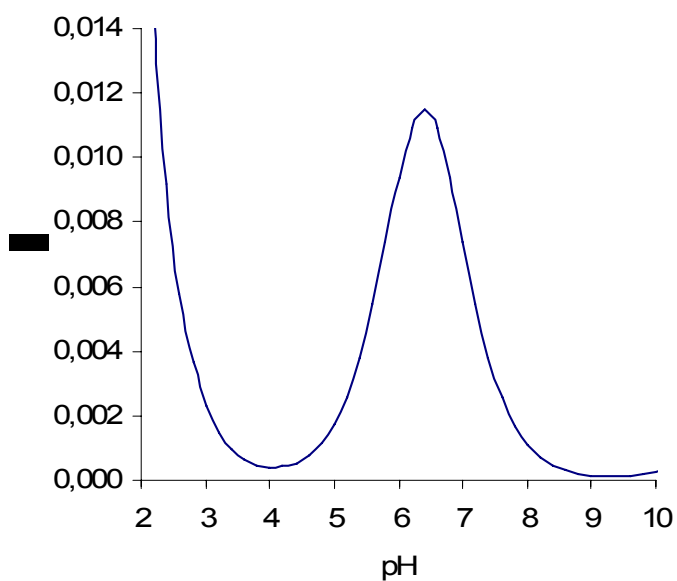


Figura 24. Capacidade tamponante máxima vs. pH .

A Figura 24 mostra a capacidade tamponante máxima para a FOS. Esta curva foi obtida com a utilização da equação 9 e os dados da Figura 20 (titulação da FOS com a monoetanolamina) em força iônica $1,00 \text{ mol L}^{-1}$.

3.5. Determinação do $pK'a_3$: interação de *zwitterions* com formaldeído

A formação de *zwitterion* foi confirmada pela titulação na presença e ausência de formaldeído, para determinação de $pK'a_3$. O formaldeído combina-se com o grupo amino neutro para formar derivados básicos fracos. Em titulação de aminoácidos com base, em presença de formaldeído, o pK' é apenas alterado quando atribuído ao bloqueio do grupo amino quando a estrutura é um íon dipolar. Nas reações de aminoácidos, em meio neutro ou fracamente básico, uma ou duas moléculas de formaldeído combina-se com a carga neutra para formar derivados mono ou dimetilol, como é possível observar na Figura 25:

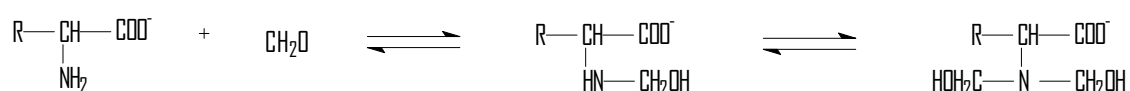


Figura 25. Reações de equilíbrios de aminoácidos com formaldeído.

Bloqueando-se o grupo amino da fosfoetanolamina, titulando-se a FOS na presença e na ausência de formaldeído, com posterior adição de NaOH,

obtendo-se duas curvas de titulações potenciométricas (Figura 26). É possível observar a determinação do valor do pK'_{a3} na Figura 27.

Devido ao fato de que todas as soluções são eletricamente neutras, a soma das cargas positivas é igual à soma das cargas negativas:

$$[\text{FOS}^-] + [\text{OH}^-] = [\text{Na}^+] + [\text{H}^+] \quad (32)$$

Além disso, todos os sais estão completamente ionizados: $[\text{Na}] = [\text{NaOH}]$

$$[\text{FOS}^-] = [\text{NaOH}] - [\text{OH}^-] + [\text{H}^+] \quad (33)$$

Então, a concentração total do ácido está presente em duas formas: $[\text{FOS}^-]$ e $[\text{HFOS}]$. Consequentemente:

$$\text{CFOS} = [\text{FOS}^-] + [\text{HFOS}] \quad (34)$$

E combinando-se as equações 33 e 34, têm-se que:

$$[\text{HFOS}] = [\text{CFOS}] - [\text{NaOH}] + [\text{OH}^-] + [\text{H}^+] \quad (35)$$

Assim, $[\text{FOS}^-] = [\text{NaOH}] - [\text{OH}^-]$, para as titulações que geram valores na região alcalina e $[\text{FOS}^-] = [\text{NaOH}] + [\text{H}^+]$, para as titulações que geram valores de pH na região ácida.

Da mesma forma, $[\text{HFOS}] = [\text{CFOS}] - [\text{NaOH}] + [\text{OH}^-]$ na região alcalina.

Portanto, para o cálculo do pK_3 , utilizou-se a equação:

$$pK = pH + \log \frac{[\text{CFOS}] - [\text{NaOH}] + [\text{H}^+]}{[\text{NaOH}] - [\text{H}^+]} \quad (36)$$

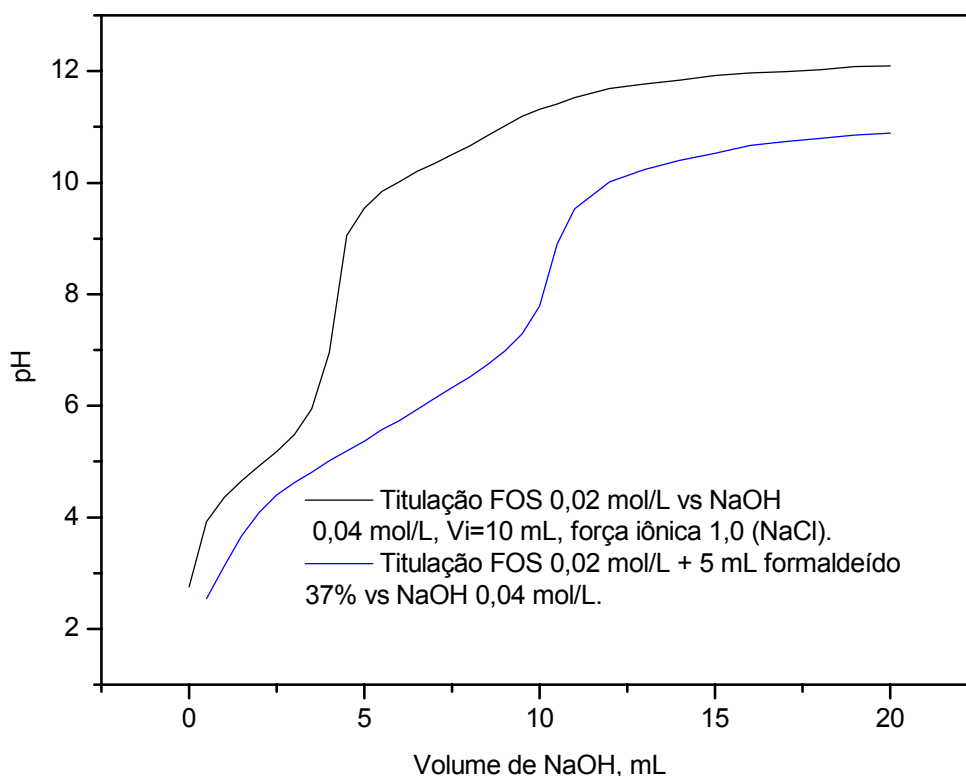


Figura 26. Curva de titulação de FOS $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ vs. NaOH $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ na presença e ausência de formaldeído 37%.

Na ausência de formaldeído na titulação da fosfoetanolamina, têm os equilíbrios de dissociação de K_1, K_2 e K_3 , sendo que:

$$K_{\text{total}} = K'_a1 \cdot K'_a2 \cdot K'_a3 \quad (37)$$

Na presença de formaldeído, K'_a3 é bloqueado, logo, para a constante de equilíbrio:

$$K_{eq} = K'a_1 \cdot K'a_2 \quad (38)$$

Sendo assim, o gráfico da razão K_{total}/K_{eq} em função de CFOS fornece o valor de $pK'a_3$ igual a 10,6 (Figura 27).

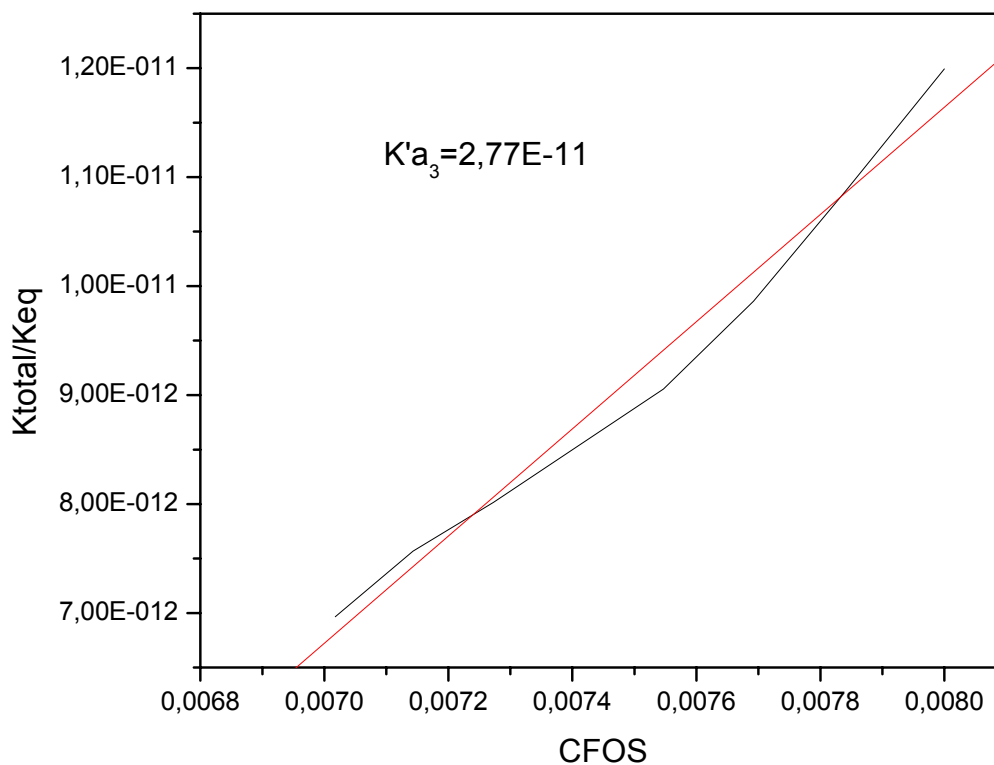


Figura 27. Razão total/ K_{eq} em função de FOS (determinação de $K'a_3$).

3.6. Determinação simultânea das três constantes de ionização

As Figuras 28 e 29 mostram as curvas de titulação obtida experimentalmente e a derivada da curva da FOS com 1,00 mL de HCl 1,00 mol L⁻¹ vs NaOH 0,20 mol L⁻¹ :

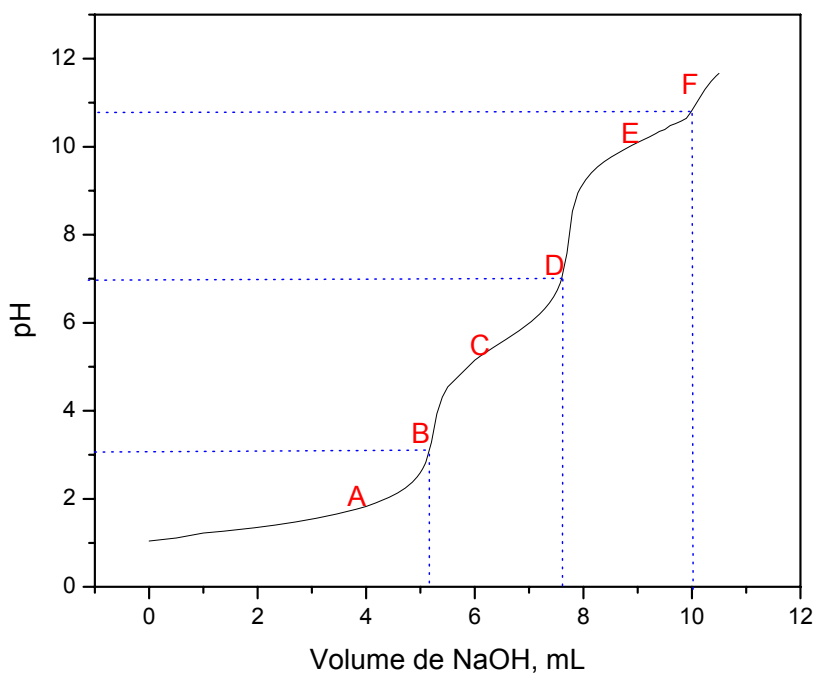


Figura 28. Curva de titulação de 10,00 mL da FOS 0,05 mol L⁻¹ com 1,00 mL HCl 1,00 mol L⁻¹ vs NaOH 0,20 mol L⁻¹.

Na região A da Figura 28 verifica-se a região ácida, ou seja, a titulação do excesso de ácido da solução H₃FOS. Na região B tem-se o ponto estequiométrico 1, ou seja, existência da espécie H₂FOS⁻. Nas regiões A, C e E, têm-se tampões. No ponto D verifica-se o ponto estequiométrico 2 e a existência da espécie HFOS²⁻. O ponto F seria a produção da espécie FOS³⁻. Quando essa reação se completa, as espécies em solução são os íons FOS³⁻ e Na⁺, que formam uma solução de Na₃PO₄(aq). Porém, como K₃ é comparável a K_w, o ponto F não se torna muito evidente. Os pontos B, D e F foram determinados (Figuras 16, 23,27).

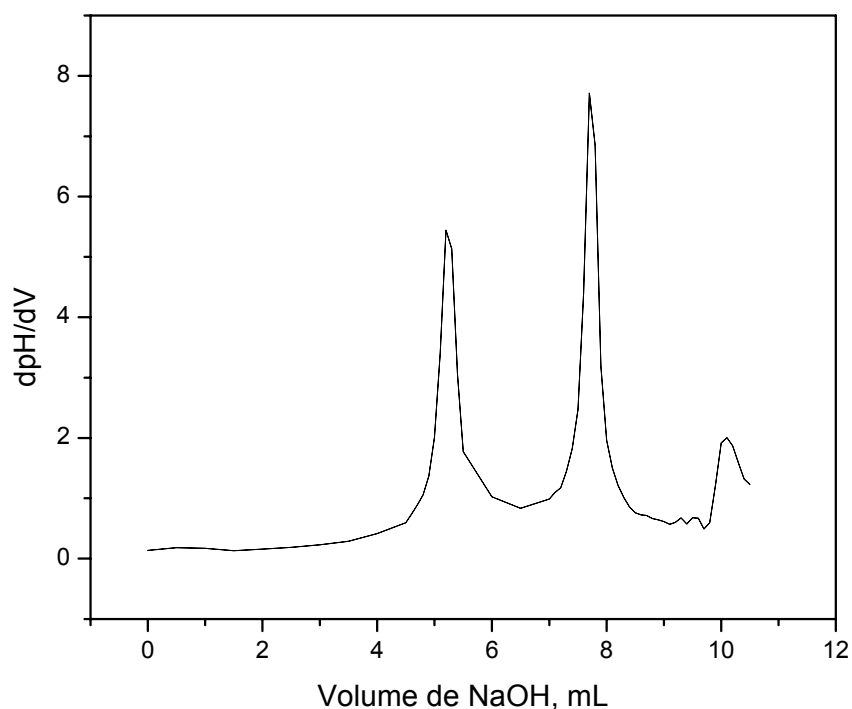


Figura 29. Curva derivada da titulação da FOS $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ com $1,00 \text{ mL HCl } 1,00 \text{ mol L}^{-1}$ vs. $\text{NaOH } 0,20 \text{ mol L}^{-1}$.

Com os valores obtidos no gráfico apresentados na Figura 29, foi possível determinar os valores de pK'_{a1} , pK'_{a2} e pK'_{a3} para a FOS: 3,4; 6,7 e 10,9. Vale ressaltar que os valores encontrados de pKs estão concordantes com os determinados pelo estudo em meio ácido, pK'_{a1} (3,4), valor de pK'_{a2} pela titulação com a MEA (6,4) e com o valor de pK'_{a3} pela titulação com NaOH na presença e ausência de formaldeído (10,6).

3.7. Determinação da capacidade tamponante máxima

A seguir, na Figura 30, observa-se um gráfico de capacidade tamponante ou índice de tampão, β , vs. pH, obtido com o tratamento da curva da Figura 32. Observa-se que uma das regiões da capacidade tamponante máxima é 6,4, fato que justifica a possível utilização do sistema FOS/MEA como tampão biológico.

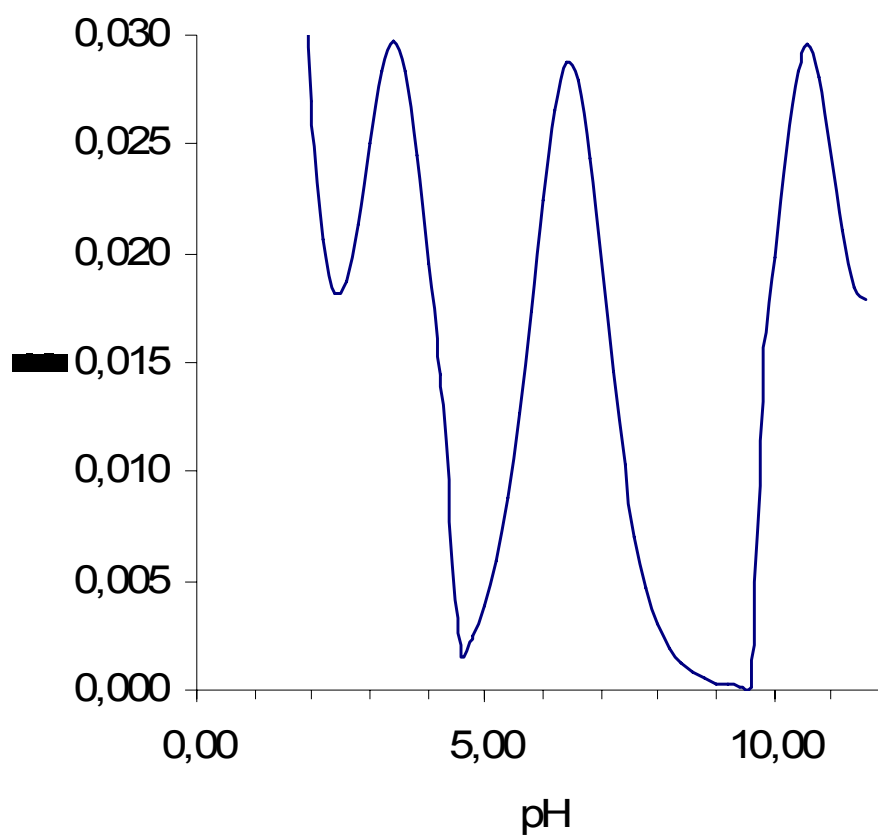
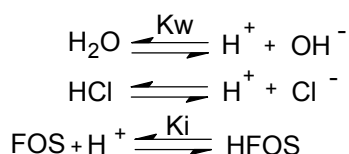


Figura 30. Capacidade tamponante vs. pH com os valores obtidos no presente trabalho.

3.8. Curva de distribuição de espécies e número médio de protonação

Considerando-se que na determinação potenciométrica de constantes de ionização (pK) de bases orgânicas como a fosfoetanolamina, isto é, ácidos conjugados de bases, usamos ácido clorídrico e existem os seguintes equilíbrios:



$$\text{Sendo } K_i = \frac{[\text{FOS}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HFOS}]}, [\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}, [\text{OH}^-] = 10^{14-\text{pH}}$$

$$\frac{[\text{HFOS}]}{[\text{FOS}]} = \frac{[\text{HCl}] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]}{[\text{FOS}]_{\text{total}} - [\text{HCl}] - [\text{OH}^-] + [\text{H}^+]} \quad (39)$$

$$[\text{HCl}] = \frac{[\text{HCl}]_{\text{inicial}} \times V_{\text{adicionado}}}{V_{\text{inicial}} \times V_{\text{adicionado}}} \quad (40)$$

Ou seja, [HCl] corrigida, multiplicada pelo efeito diluição.

$$[\text{FOS}]_{\text{total}} = \frac{m\text{FOS}_{(g)}}{PM_{(g/mol)}} \div V_{\text{solução}(L)} \quad (41)$$

$$\text{Então: } \text{p}K_i = \text{pH} + \log \frac{[\text{HCl}] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]}{[\text{FOS}]_{\text{total}} - [\text{HCl}] - [\text{OH}^-] + [\text{H}^+]} \quad (42)$$

O cálculo do número médio de protonação (\bar{n}), torna-se possível pela utilização da equação 7 e os dados da curva de titulação de retorno (Tabelas 10 e 11). A Figura 31 mostra a remoção destes prótons com a adição da base.

Tabela 10. Valores utilizados da titulação de retorno para cálculo de pK'

V(mL)	CFOS	efeito diluição	CFOS'	ef.dil.HCl	HCl	Cbase	pH
0,50	0,050	0,043	0,0021	0,0869	0,0869	0,00869	1,108
1,00	0,050	0,083	0,0041	0,0833	0,0833	0,0166	1,221
1,50	0,050	0,120	0,0060	0,08	0,080	0,0240	1,279
2,00	0,050	0,154	0,0076	0,0769	0,0769	0,0307	1,352
2,50	0,050	0,185	0,0092	0,0740	0,0740	0,0370	1,436
3,00	0,050	0,214	0,0107	0,0714	0,0714	0,0428	1,538
3,50	0,050	0,241	0,0120	0,0689	0,0689	0,0482	1,666
4,00	0,050	0,266	0,0133	0,0666	0,0666	0,0533	1,826
4,50	0,050	0,290	0,0145	0,0645	0,0645	0,0580	2,081
4,60	0,050	0,294	0,0147	0,0641	0,0641	0,0589	2,149
4,70	0,050	0,299	0,0149	0,0636	0,0636	0,0598	2,229
4,80	0,050	0,304	0,0151	0,0632	0,0632	0,0607	2,327
4,90	0,050	0,308	0,0154	0,0628	0,0628	0,0616	2,44
5,00	0,050	0,312	0,0156	0,0625	0,0625	0,0625	2,601
5,10	0,050	0,317	0,0158	0,0621	0,0621	0,0633	2,842
5,20	0,050	0,321	0,0160	0,0617	0,0617	0,0641	3,282
5,30	0,050	0,325	0,0162	0,0613	0,0613	0,0650	3,931
5,40	0,050	0,329	0,0164	0,0609	0,0609	0,0658	4,309
5,50	0,050	0,333	0,0166	0,0606	0,0606	0,0666	4,542
6,00	0,050	0,353	0,0176	0,0588	0,0588	0,0705	5,150
6,50	0,050	0,371	0,0185	0,0571	0,0571	0,0742	5,565
7,00	0,050	0,388	0,0194	0,0555	0,0555	0,0777	5,985
7,10	0,050	0,392	0,0196	0,0552	0,0552	0,0784	6,099
7,20	0,050	0,395	0,0197	0,0549	0,0549	0,0791	6,204
7,30	0,050	0,399	0,0199	0,0546	0,0546	0,0797	6,334
7,40	0,050	0,402	0,0201	0,0543	0,0543	0,0804	6,494
7,50	0,050	0,405	0,0202	0,0540	0,0540	0,0810	6,699
7,60	0,050	0,409	0,0204	0,0537	0,0537	0,0817	6,989
7,70	0,050	0,412	0,0205	0,0534	0,0534	0,0823	7,579
7,80	0,050	0,415	0,0207	0,0531	0,0531	0,0829	8,532
7,90	0,050	0,418	0,0208	0,0529	0,0529	0,0835	8,949
8,00	0,050	0,421	0,0210	0,0526	0,0526	0,0842	9,170
8,10	0,050	0,424	0,0212	0,0523	0,0523	0,0848	9,341
8,20	0,050	0,427	0,0213	0,0520	0,0520	0,0854	9,470
8,30	0,050	0,430	0,0215	0,0518	0,0518	0,0860	9,584
8,40	0,050	0,433	0,0216	0,0515	0,0515	0,0865	9,673
8,50	0,050	0,436	0,0217	0,0512	0,0512	0,0871	9,755
8,60	0,050	0,439	0,0219	0,0510	0,0510	0,0877	9,825
8,70	0,050	0,442	0,0220	0,0507	0,0507	0,0883	9,900
8,80	0,050	0,444	0,0222	0,0505	0,0505	0,0888	9,968
8,90	0,050	0,447	0,0223	0,0502	0,0502	0,0894	10,033
9,00	0,050	0,450	0,0225	0,0500	0,0500	0,0900	10,097
9,10	0,050	0,453	0,0226	0,0497	0,0497	0,0905	10,156
9,20	0,050	0,455	0,0227	0,0495	0,0495	0,0910	10,211
9,30	0,050	0,458	0,0229	0,0492	0,0492	0,0916	10,276
9,40	0,050	0,461	0,0230	0,0490	0,0490	0,0921	10,346
9,50	0,050	0,463	0,0231	0,0487	0,0487	0,0926	10,391
9,60	0,050	0,466	0,0233	0,0485	0,0485	0,0932	10,482
9,70	0,050	0,468	0,0234	0,0483	0,0483	0,0937	10,525
9,80	0,050	0,471	0,0235	0,0480	0,0480	0,0942	10,581
9,90	0,050	0,473	0,0236	0,0478	0,0478	0,0947	10,644
10,00	0,050	0,476	0,0238	0,0476	0,0476	0,0952	10,824
10,10	0,050	0,478	0,0239	0,0473	0,0473	0,0957	11,028
10,20	0,050	0,481	0,0240	0,0471	0,0471	0,0962	11,225

Tabela 11. Valores referentes ao cálculo do número médio de protonação

pOH	H+	ΔH^+	OH-	log	pK	n médio
12,779	0,060	0,037	1,66E-13	0,040	1,26	1,59
12,721	0,052	0,029	1,90E-13	0,054	1,33	1,53
12,648	0,044	0,021	2,24E-13	0,068	1,42	1,49
12,564	0,036	0,013	2,72E-13	0,072	1,51	1,47
12,462	0,028	0,006	3,45E-13	0,077	1,62	1,45
12,334	0,021	-0,002	4,63E-13	0,081	1,75	1,44
12,174	0,014	-0,008	6,69E-13	0,085	1,91	1,43
11,919	0,008	-0,014	1,20E-12	0,087	2,17	1,42
11,851	0,007	-0,016	1,40E-12	0,088	2,24	1,42
11,771	0,005	-0,017	1,69E-12	0,088	2,31	1,42
11,673	0,004	-0,018	2,12E-12	0,089	2,42	1,41
11,56	0,003	-0,019	2,75E-12	0,089	2,53	1,41
11,399	0,002	-0,020	3,99E-12	0,090	2,69	1,41
11,158	0,001	-0,021	6,95E-12	0,090	2,94	1,40
10,718	0,001	-0,022	1,91E-11	0,091	3,37	1,40
10,069	0,001	-0,023	8,53E-11	0,092	4,02	1,38
9,691	4,91E-05	-0,023	2,03E-10	0,094	4,40	1,36
9,458	2,87E-05	-0,023	3,48E-10	0,096	4,64	1,34
8,85	7,08E-06	-0,023	1,41E-09	0,105	5,25	1,23
8,435	2,72E-06	-0,023	3,67E-09	0,114	5,68	1,12
8,015	1,04E-06	-0,023	9,66E-09	0,123	6,11	1,02
7,901	7,96E-07	-0,023	1,25E-08	0,124	6,22	0,99
7,796	6,25E-07	-0,023	1,59E-08	0,126	6,33	0,97
7,666	4,63E-07	-0,023	2,15E-08	0,128	6,47	0,96
7,506	3,21E-07	-0,023	3,11E-08	0,130	6,62	0,94
7,301	2E-07	-0,023	5,00E-08	0,132	6,83	0,92
7,011	1,03E-07	-0,023	9,74E-08	0,134	7,12	0,90
6,421	2,64E-08	-0,023	3,79E-07	0,135	7,71	0,88
5,468	2,94E-09	-0,023	3,40E-06	0,137	8,67	0,86
5,051	1,12E-09	-0,023	8,89E-06	0,139	9,08	0,85
4,83	6,76E-10	-0,023	1,47E-05	0,141	9,31	0,83
4,659	4,56E-10	-0,023	2,19E-05	0,143	9,48	0,81
4,53	3,39E-10	-0,023	2,95E-05	0,145	9,61	0,79
4,416	2,61E-10	-0,023	3,83E-05	0,146	9,73	0,78
4,327	2,12E-10	-0,023	4,70E-05	0,148	9,82	0,76
4,245	1,76E-10	-0,023	5,68E-05	0,150	9,91	0,75
4,175	1,5E-10	-0,023	6,68E-05	0,152	9,97	0,73
4,1	1,26E-10	-0,023	7,94E-05	0,154	10,05	0,71
4,032	1,08E-10	-0,023	9,28E-05	0,156	10,12	0,69
3,967	9,27E-11	-0,023	1,08E-04	0,157	10,19	0,68
3,903	8E-11	-0,023	1,25E-04	0,159	10,26	0,66
3,844	6,98E-11	-0,023	1,43E-04	0,161	10,32	0,65
3,789	6,15E-11	-0,023	1,62E-04	0,163	10,38	0,63
3,724	5,3E-11	-0,023	1,88E-04	0,164	10,44	0,62
3,654	4,51E-11	-0,023	2,22E-04	0,166	10,51	0,61
3,609	4,06E-11	-0,023	2,46E-04	0,168	10,56	0,59
3,518	3,3E-11	-0,023	3,03E-04	0,169	10,65	0,57
3,475	2,99E-11	-0,023	3,34E-04	0,171	10,69	0,56
3,419	2,62E-11	-0,023	3,81E-04	0,173	10,75	0,54
3,356	2,27E-11	-0,023	4,41E-04	0,174	10,82	0,53
3,176	1,5E-11	-0,023	6,66E-04	0,175	10,99	0,52
2,972	9,38E-12	-0,023	10,66E-04	0,176	11,20	0,51
2,775	5,96E-12	-0,023	1,67E-03	0,176	11,40	0,51
2,598	3,96E-12	-0,023	2,52E-03	0,176	11,57	0,51

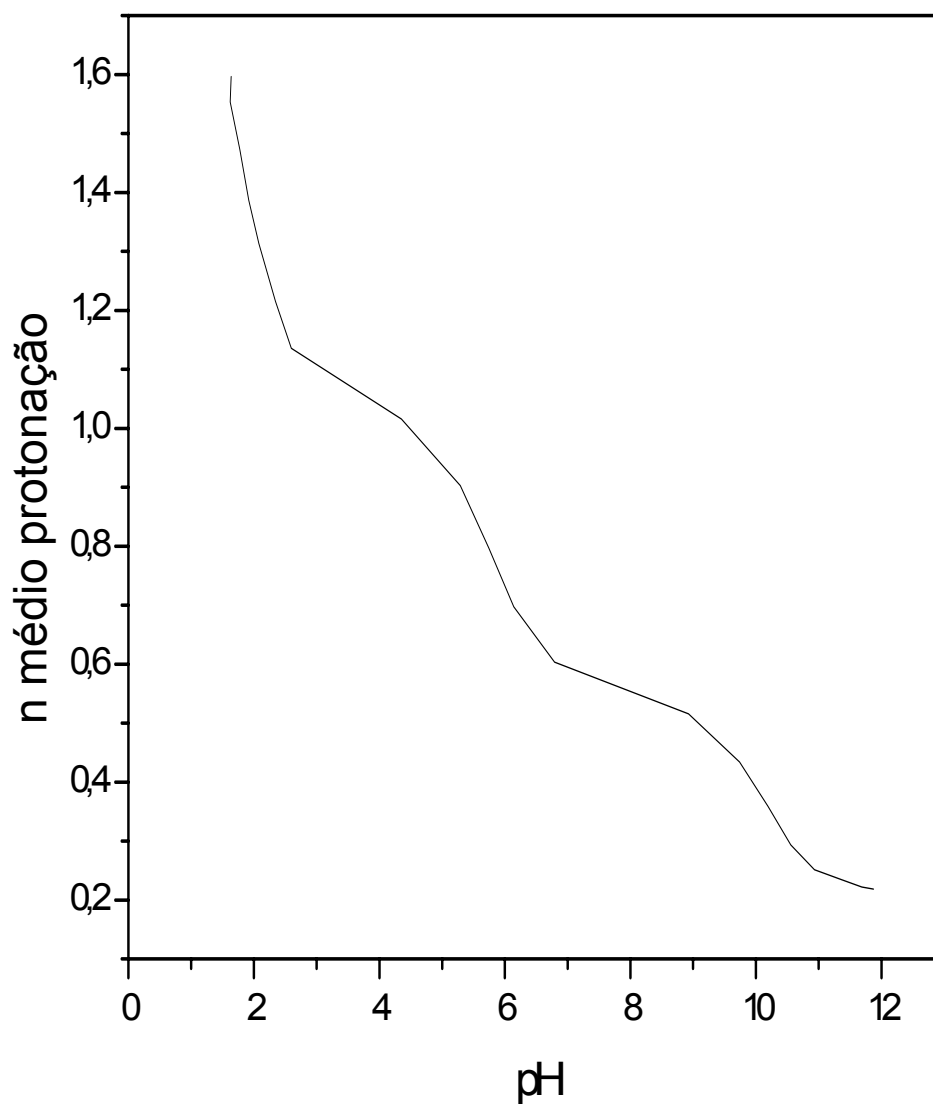


Figura 31. Número médio de protonação vs. pH.

Conhecendo-se o número médio de protonação, torna-se possível determinar $K'a_3$ (Figura 32) pela utilização da equação 43.

$$\frac{1-\bar{n}}{\bar{n}} = K'a_3x \frac{1}{[H^+]} \quad (43)$$

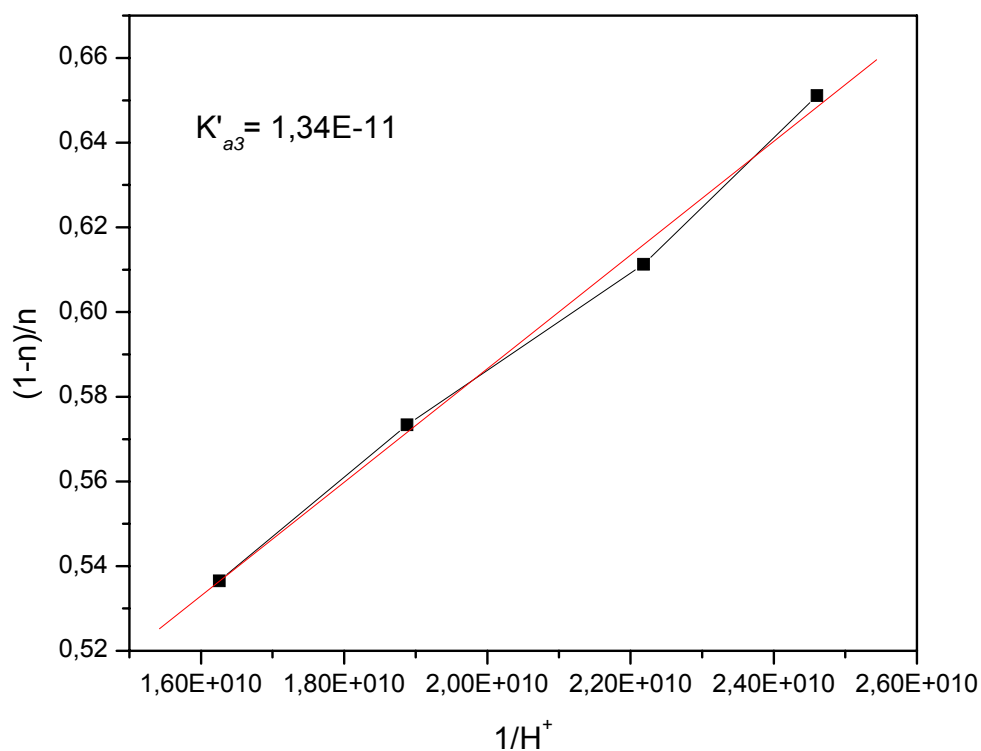


Figura 32. Determinação de $K'a_3$ ($pK'a_3=10,9$).

Considerando os os três valores de constante de equilíbrio da FOS ($K'a_1=3,7$ E-4; $K'a_2=3,6$ E-7; $K'a_3=1,3$ E-11), foi possível obter a curva de distribuição das espécies, Figura 33.

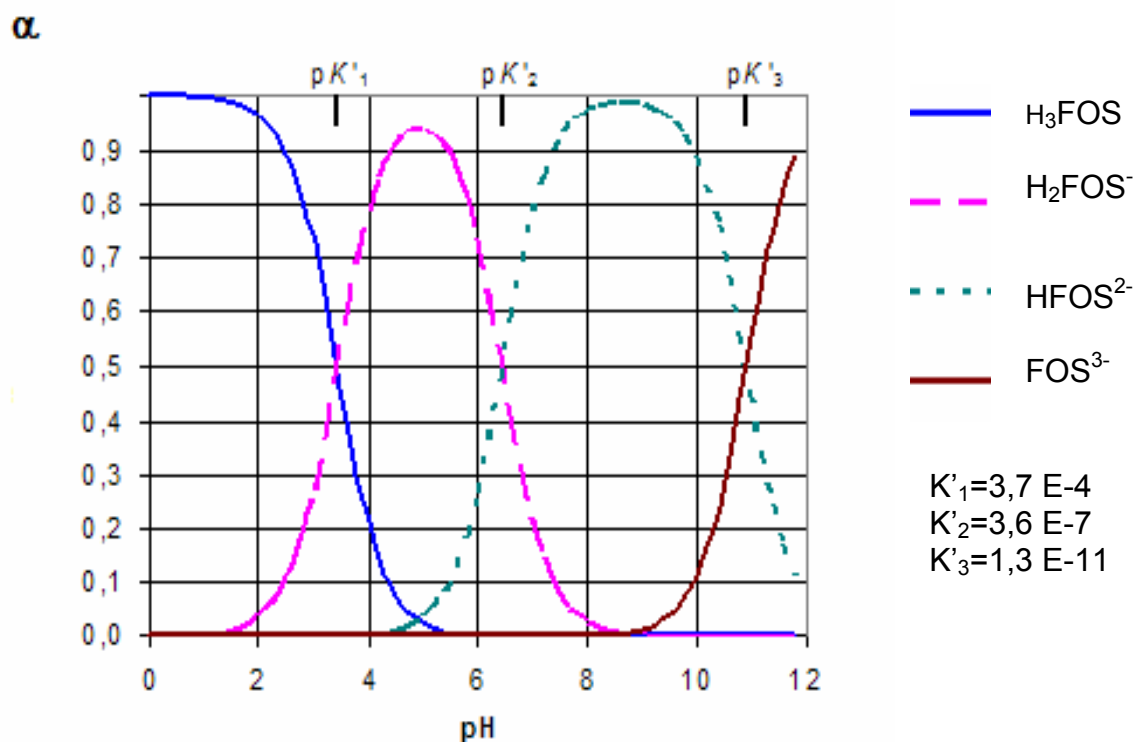


Figura 33. Curva de distribuição de espécies para a FOS.

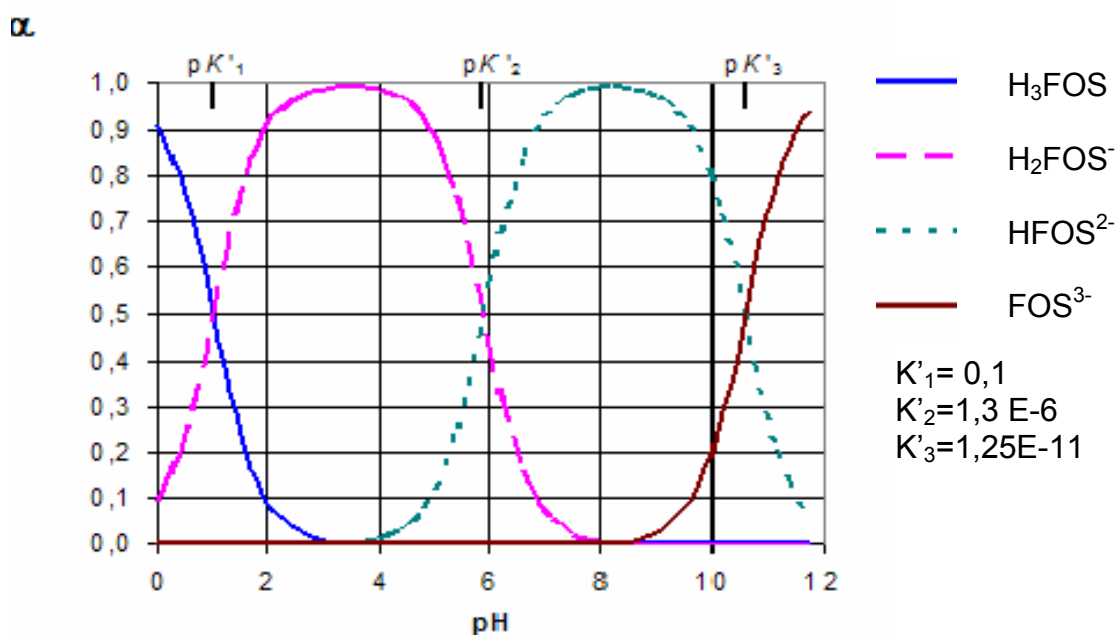


Figura 34. Curva de distribuição para a FOS com os valores da literatura.

Na Figura 33, observa-se que abaixo de pH 3,4 a maior parte da FOS se apresenta com uma protonação no sítio da amina (predominância da forma H_3FOS). Em pH =3,4, valor da primeira constante, tem-se 50% das moléculas possuindo esta protonação e as demais moléculas com uma dissociação no grupo fosfato (H_2FOS^-). Entre pH 3,7 e 6,4, tem-se predominância da forma com duas dissociações ($HFOS^{2-}$) e a partir de pH 6,4 até 10,6, têm-se três dissociações e então a FOS se apresenta totalmente desprotonada (FOS^{3-}).

A partir da curva de distribuição de espécies é possível perceber as formas em que a FOS se apresenta no organismo humano. No estômago, o pH é 1,4 (FOYE, 1995) e a FOS se encontra totalmente protonada. Em pH 7,4, a FOS está com duas dissociações no grupo fosfato, facilitando a formação de fosfatidiletanolamina. Já no intestino, pH ao redor de 8,0, existe a predominância da espécie FOS^{3-} .

A forma de como as substâncias com interesse biológico permeiam nas membranas são determinadas pelo valor do pK e o pH do meio celular, uma vez que a porcentagem da forma protonada corresponde a uma migração retardatária devido à baixa solubilidade lipídica. A forma desprotonada é mais compatível com a forma lipídica e exibe melhores propriedades de migração (SOSNOVSKY; BELL, 1998), se levar em consideração a bicamada lipídica.

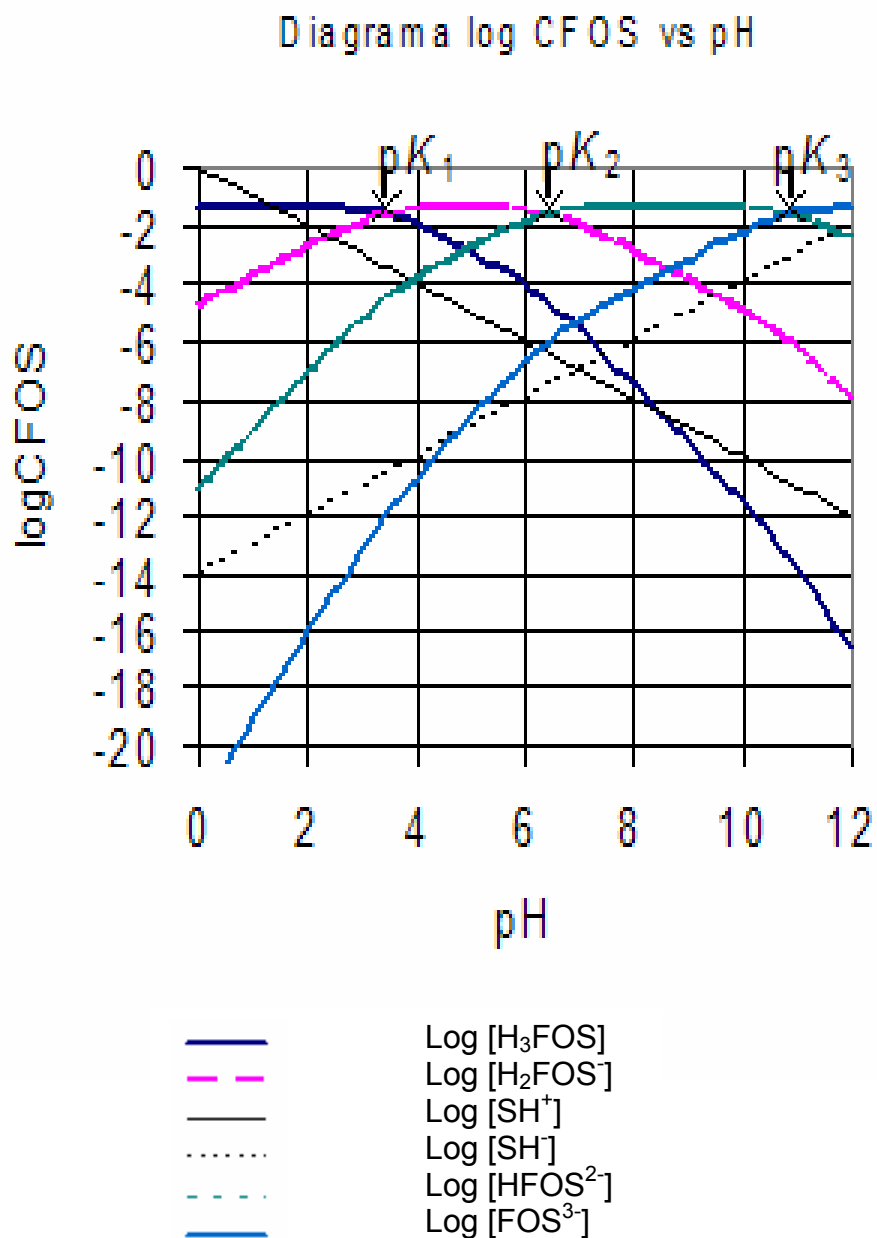


Figura 35. Diagrama de equilíbrio para fosfoetanolamina considerando os valores de constante de ionização calculados no presente trabalho.

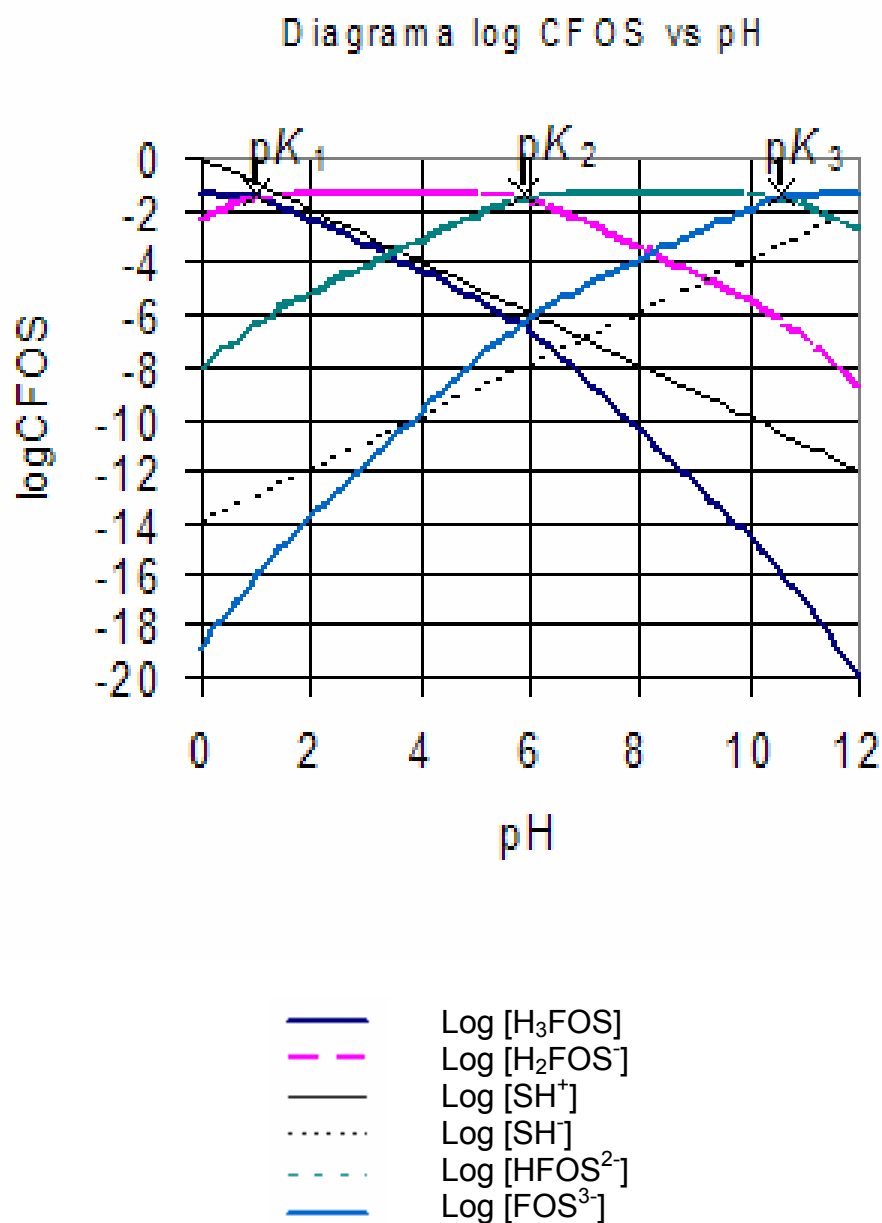


Figura 36. Diagrama de equilíbrio para fosfoetanolamina com os valores da literatura.

A interpretação dos diagramas logarítmicos (Figuras 35 e 36), é similar ao gráfico do $\log \alpha$, (SANTOS, 1991), porém estão incluídas as linhas de H_3O^+ (SH^+) e OH^- (S-H^-). O diagrama logarítmico mostra a relação entre as formas de equilíbrio, conforme o pH aumenta, a forma H_3FOS torna-se desprotonada.

O gráfico do logaritmo da concentração de FOS (Figura 35) mostra a concentração de todas as espécies na solução com $K'a_1 = 3,7\text{E-}4$, $K'a_2 = 3,6\text{E-}7$ e $K'a_3 = 1,3\text{E-}11$ em função do pH, valores encontrados no presente trabalho. O gráfico do logaritmo da concentração de FOS com os valores da literatura (Figura 36) mostra a diferença encontrada para os valores da primeira e segunda constantes de ionização.

3.9. Estudos de equilíbrio por condutimetria

A titulação condutométrica simultânea dos grupos funcionais de 10,00 mL da glicina já foi realizada por titulação de retorno, a fim de se evitar a hidrólise e se verificar a protonação do grupo amino (LOISELEUR, 1945).

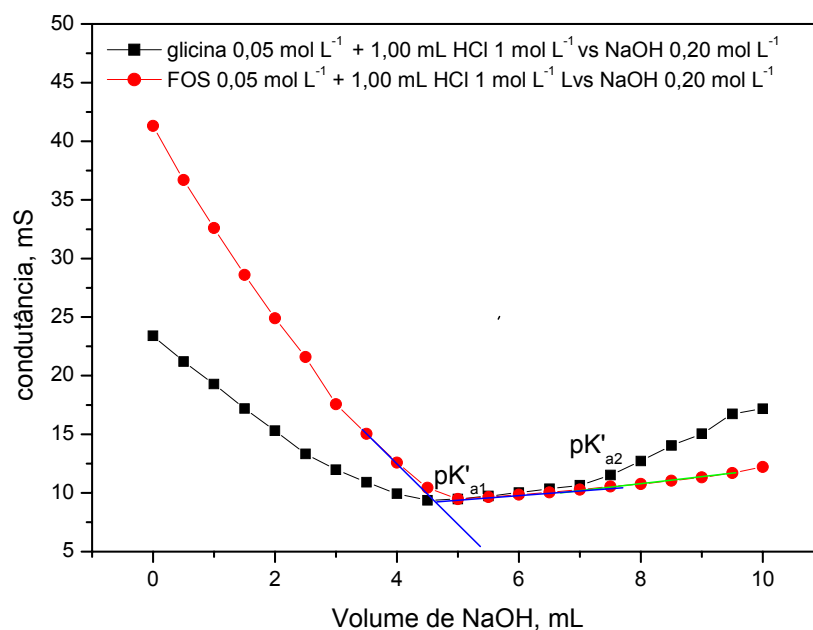


Figura 37: Comparação das curvas condutométricas da FOS e da Gli.

A Figura 37 mostra as curvas condutométricas da FOS e da glicina. Verifica-se um comportamento semelhante, ambas são *zwitterion*. Observa-se na curva da FOS que, com a adição da base, ocorre um decréscimo dos valores de condutância até atingir o primeiro ponto de equivalência (5,00 mL). A remoção do segundo próton da FOS ocorre com a adição de 7,5 mL de NaOH, como na Figura 28. O gráfico obtido está concordante com o gráfico da Figura 28, porém não foi possível visualizar a região do pK'_{a3} . O gráfico obtido da glicina está concordante com o da literatura (LOISELEUR, 1945). Verifica-se inicialmente na região da titulação de retorno a desprotonação do grupo amino e após o ponto de equivalência (5,00 mL), verifica-se a região da remoção do hidrogênio da carboxila.

3.9.1. Estudo condutométrico de complexação com cálcio e FOS

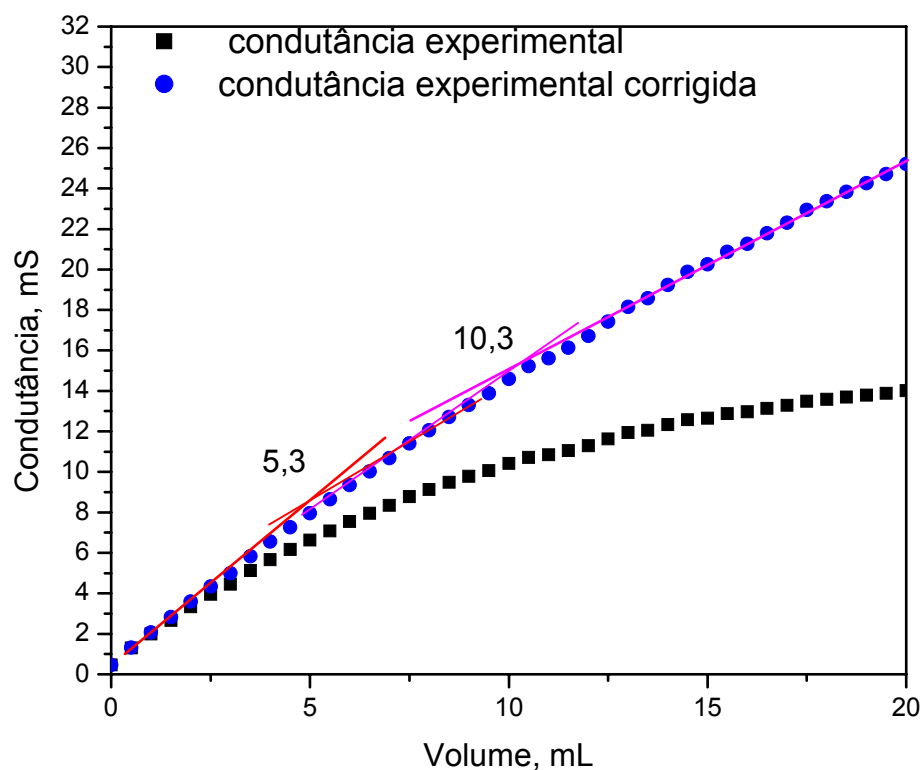


Figura 38. Curva de titulação condutométrica de 25,00 mL da FOS $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$

Espécies do tipo ML já foram relatadas para a fosfoetanolamina, por titulações potenciométricas com NaOH e posterior adição de sal de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (OSTERBERG, 1962). A Figura 38 mostra as possíveis espécies CaL (quebra em torno de 5,00 mL; assim a proporção cálcio-FOS é 1:1) e Ca_2L (considerando L= FOS, têm-se que a proporção cálcio-FOS é 2:1), sendo que a espécie Ca_2L não consta na literatura.

3.9.2. Estudo condutométrico de complexação com magnésio

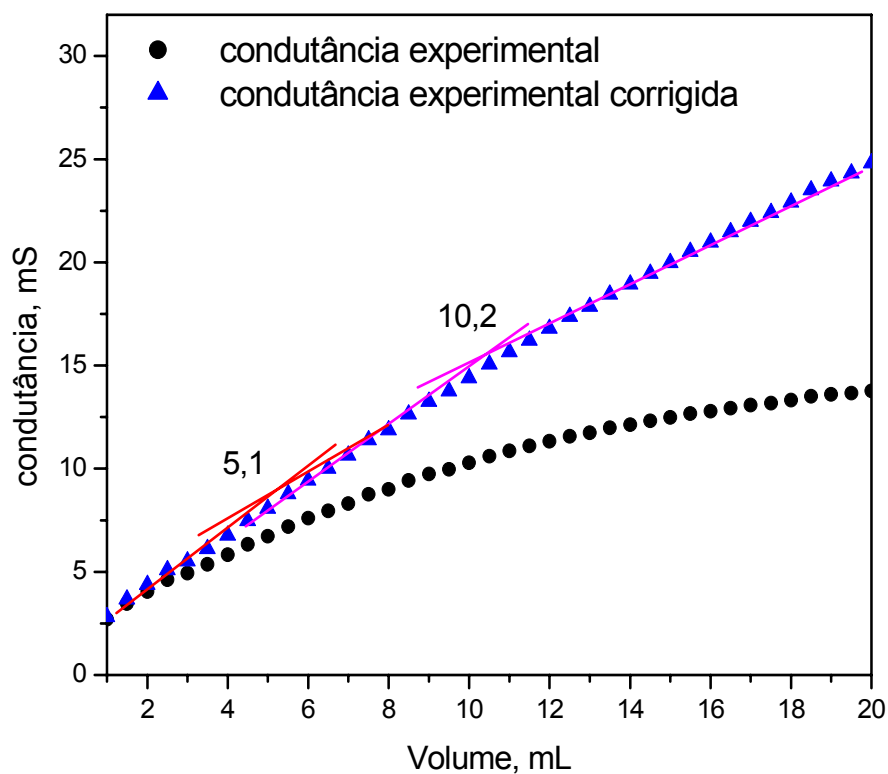


Figura 39. Curva de titulação condutométrica de 25,00 mL da FOS $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$.

Com base nos resultados obtidos nas Figuras 38 e 39, pôde-se verificar a presença das espécies ML e M_2L . Observando-se as curvas de titulações condutométricas de 25,00 mL da FOS $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, verificam-se duas quebras, uma no volume de aproximadamente 5,0 mL (por meio do cálculo do número de mols, conclui-se que a proporção metal-ligante é 1:1) e outra no volume de 10,00 mL (proporção metal-

ligante 2:1) As estruturas propostas para os complexos, estão representados nas Figuras 40 e 41 :

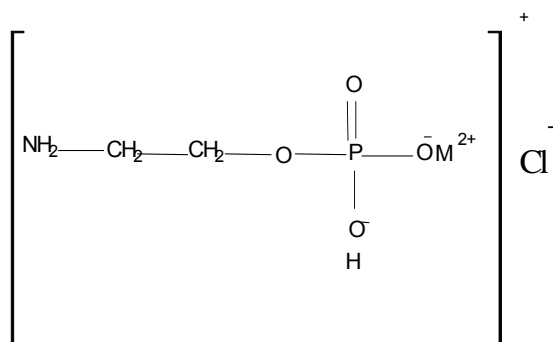


Figura 40. Estrutura proposta para o primeiro complexo.

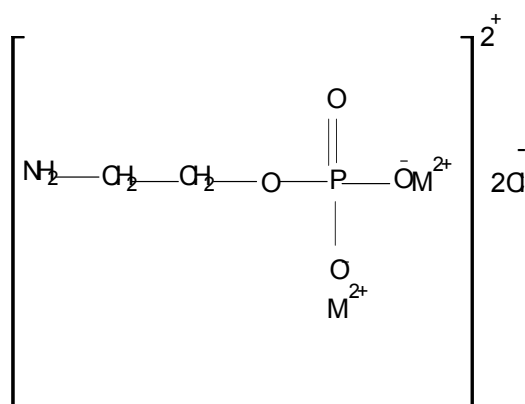
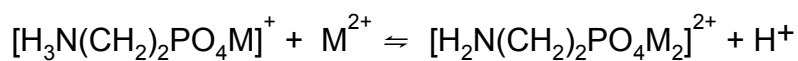
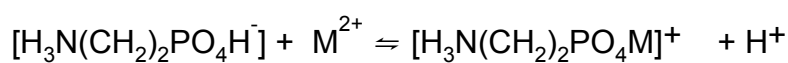


Figura 41. Estrutura proposta para o segundo complexo.

Desta forma, as prováveis reações do equilíbrio de complexação da FOS são:



Verificou-se a formação dos complexos do tipo ML e M_2L para o íon Ca^{2+} e Mg^{2+} com as titulações condutométricas. Concluiu-se as proporções metal-ligante observando-se as curvas de titulações condutométricas da FOS $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ com $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e FOS $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ com $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, verificando-se duas quebras, uma no volume de aproximadamente 5,0 mL (com os cálculos do número de mols, conclui-se que a proporção metal-ligante é 1:1) e outra no volume de 10 mL (proporção metal-ligante 2:1).

O estudo do equilíbrio de complexação por meio das titulações da FOS com o sal do íon metálico permitiu identificar a provável formação das espécies ML e M_2L , as quais não estão descritas na literatura.

CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudado o equilíbrio de complexação pelas titulações da FOS com sais de cálcio e magnésio. A formação das espécies ML e M₂L (provavelmente presentes no organismo humano), não haviam sido descritas na literatura.

Foi possível comprovar o fenômeno de agregação pelo método potenciométrico e espectrofotométrico de Azul de Molibdênio, sendo que a porcentagem de fosfato ionizado obtida experimentalmente (1,15%) está concordante com o valor teórico seguindo a equação da constante de agregação (1%), com um erro relativo de 13%. O valor de K'_{a1} foi obtido pelo estudo em meio ácido e pela titulação de retorno.

O estudo potenciométrico comprovou que a primeira constante de ionização da FOS sofre forte influência do fenômeno de agregação. Dados da literatura não definem um valor de pK'_{a1} da FOS, se resumindo a mencionar que este apresenta um valor menor que 1, sendo inviável sua determinação com eletrodo de vidro.

Foi possível obter o valor de $pK'_{a2,6,4}$, por meio de titulações potenciométricas e condutométricas com monoetanolamina, valor concordante com o valor esperado. O gráfico de máxima capacidade tamponante ou índice de tampão justifica a possível utilização do sistema FOS/MEA como um tampão biológico, uma vez que um tampão atua na faixa do valor do $pK \pm 1$, próximo ao pH do plasma sanguíneo 7,4.

Constatou-se que na proporção 1:1 de FOS:MEA existe a remoção dos dois prótons na proporção de 1:1 por titulações potenciométricas e condutométricas.

O valor de $pK'a_3$ foi determinado com as titulações da FOS vs NaOH na presença e ausência de formaldeído (10,6); com a equação que relaciona número médio de protonação (10,9), e para a titulação na presença de ácido e adição de base (10,9), com um erro relativo de 2,7%.

Com a titulação da FOS na presença de HCl vs NaOH, foi possível obter os três valores de constante de ionização simultaneamente. Por meio das constantes de ionização determinadas, obteve-se a curva de distribuição de espécies, gráfico de número médio de protonação vs pH e o diagrama logarítmico para a FOS, dados que não constam na literatura, foi possível compreender os equilíbrios existentes para a desprotonação da forma H_3FOS , relacionar os valores de pK da FOS e pH do meio com sua migração na membrana.

A partir da curva de distribuição de espécies é possível perceber as formas em que a FOS se apresenta no organismo humano. No estômago, o pH é 1,4 e a FOS se encontra totalmente protonada. Em pH 7,4, a FOS está com duas dissociações no grupo fosfato, facilitando a formação de fosfatidiletanolamina. Já no intestino, pH ao redor de 8,0, existe a predominância da espécie FOS^{3-} .

Na primeira coluna da Tabela 12, observam-se os dados obtidos por titulações em meio ácido, em meio fracamente básico (MEA) e fortemente básico (NaOH na presença e na ausência de formaldeído) e na segunda coluna os dados

obtidos pela titulação de retorno, a partir da qual se obteve a curva de distribuição de espécies e na Tabela 13 constam os valores de constante de ionização da literatura.

Tabela 12: Valores de constantes de ionização obtidos no presente trabalho

AL-ASFOUR (2008) Meio de estudo / Valores de pK'	AL-ASFOUR (2008) Titulação de retorno
Ácido / pK' _{a1} = 3,4	pK' _{a1} = 3,7
Fracamente básico/ pK' _{a2} = 6,4	pK' _{a2} = 6,4
Fortemente básico/ pK' _{a3} = 10,6	pK' _{a3} = 10,9

Tabela 13: Valores de constantes de ionização da FOS da literatura

RIBEIRO FILHO (1999)	CLARKE (1955)
pK' _{a1} = 3,4	pK' _{a1} < 1
pK' _{a2} = 6,7	pK' _{a2} = 5,8
pK' _{a3} = 10,6	pK' _{a3} = 10,9

O valor da segunda constante obtida no presente trabalho, juntamente com os gráficos da máxima capacidade tamponante com o pH justificam a utilização da FOS neutralizada com a MEA em tratamento de epilepsia, câncer e provavelmente em outras doenças. Afinal, um tampão atua na faixa de ± 1 ; como o valor da segunda constante calculado neste trabalho é 6,46 e o pH do plasma sanguíneo está na faixa entre 7,35 e 7,45, isso justificaria a utilização da FOS na forma líquida (injetável).

ETAPAS FUTURAS

- ✓ Realizar estudo de caracterização termodinâmica do equilíbrio de dimerização da FOS, utilizando a equação de Van't Hoff, que descreve a dependência da constante de equilíbrio com a temperatura, a fim de se determinar a resposta do dímero e do monômero em relação à entalpia e entropia do equilíbrio de dimerização.
- ✓ Estudar as contribuições atrativa e repulsiva da energia livre de agregação molecular e a interação entre micelas.
- ✓ Estudar a interação da FOS com extratos hidrofóbicos por filmes de Langmuir.
- ✓ Realizar estudos dielétricos da interação molecular ao da FOS.
- ✓ Dar continuidade aos estudos de agregação para substâncias com comportamento semelhante a FOS.
- ✓ Estudar o comportamento condutométrico da FOS com sulfatos e oxalatos de cálcio, magnésio e zinco, comparando com cloretos e nitratos dos metais, a fim de se verificar a influência do ânion na complexação.
- ✓ Verificar a influência da força iônica na agregação.
- ✓ Estudar a interação da FOS com polímeros.

CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ASFOUR, S.V., RIBEIRO FILHO, O.M.; ALMEIDA, M. V.; MENEGUELO, R.; CHIERICE, G. O. Estudo de agregação da fosfoetanolamina pelos métodos potenciométrico e espectrofotométrico azul de molibdênio . In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 14., 2007, João Pessoa. **Livro de Resumos...**João Pessoa: Editora Universitária da UFPB, 2007. ref. OT 025.

ALBERT, A.; SERJEANT, E.P. **Determination of ionization constants**. London: Chapman and Hall, 1971. p. 179.

ALEKSIC, M., SAVIC, V., POPOVIC, G., BURIC, N., KAPETANOVIC, V. Acidity constants of cefetamet, cefotaxime and ceftriaxone; the effect of the substituent at C3 position. **Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 752-756, 2004.

ALEXÉEV, V. **Analyse quantitative**. Moscou: Ed. Mir, 1966. 301p.

ALMEIDA, M.V. **Aplicação pré-clínica da fosfoetanolamina sintética sobre modelos experimentais de epilepsia em ratos**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)- Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

AOAC International. **Official methods of analysis of AOAC international**. Arlington: Association of official analytical chemists, 1995. p. 984.

APPEL, S. H. **Phosphoethanolamine for treatment of Alzheimer´s disease**. WO/1988/009171. 1 dec. 1988. 37 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA COMPLEMENTAR. Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca_doencas_alzheimer.asp>. Acesso em: 18 jul. 2005.

ATKINS, P. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001. 913 p.

AWAPARA, J.; LANDUA, A.J.; FUERST, R., SEALE, B. Free aminobutyric acid in brain . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1183, p. 545, 1950.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, D.E.S.; BARONE, J.S. **Química analítica quantitativa elementar**. São Paulo :Edgar Blucher, 1979. 52 p.

BARD, ALLEN J. **Equilíbrio químico**. Madrid: Del Castillo, 1970. p. 43 .

BEN-MENACHEM E. ; HAMBERGER A.; HEDNER T., HAMMOND,E.J.; UTHMAN,B.M.; SLATER,J.; TREIG,T.; STEFAN,H.;RAMSAY,R.E.; WERNICKE,J.F.;WILDER,B.J. Effect of vagus nervus stimulation on amino acids and others metabolites in the CSF of patients with partial seizures. **Epilepsy Research**, v. 20, p. 221-227. 1995

BOSTWICK R.; LANDERS D. W.; CRAWFORD G.; APPEL S. H. Purification and Characterization of a central cholinergic enhancing factor from rat brain: Its identity as phosphoethanolamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 53, p. 448-458, 1999.

BRUN, A.; ENGLUND, E. A White matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathological study. **Annals of Neurology**. v. 19, p. 253-262, 1986.

CAVICCHIOLI, M. **Interação dos íons metálicos Cu(II), Cd(II), Ag(I) e Au(I) com compostos adoçantes**. 2003. 142 f. Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2003.

CHERBULIEZ, E.; PROBST, H.; RABINOWITZ, J. Note sur la préparation des derives monophosphorylés des glycols. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, p. 1693, 1958.

CHERBULIEZ, E.; GANDILLON,C.; PICCIOTTO,A.; RABINOWITZ,J. Recherches sur la formation et la transformation des esters .Sur la phosphorylation d'alcools tertiaires et sur la viyesse d'hydrolyse des esters mono-t-alcoylphosphoriques **Helvetica Chimica Acta**,v. 42, p. 2277, 1959.

CHERBULIEZ, E.; CORDAHI, G.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters . Notes sur l'action de l'oxychlorure de phosphore et de l'acide phosphorique sur les esters phosphoriques tertiaires. **Helvetica Chimica Acta**, v. 42, p. 591, 1959.

CHERBULIEZ, E.; PROBST, H., RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters .Formation d'esters phosphoriques cycliques par l'action de l'acide polyphosphorique sur les glycols. **Helvetica Chimica Acta**, v. 43, p. 465, 1960.

CHERBULIEZ, E.;DENZLER,E.A.; HUNKELER,F.;RABINOWITZ,J. Recherches sur la formation et la transformation des esters. Sur la préparation des acides carboxy-alcoylphosphoriques. **Helvetica Chimica Acta**, v. 43, p.1841,1960.

CHERBULIEZ ,E.; CORDAHI, G.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters . Sur la phosphorylation des hydroxynitriles et sur la vitesse d'hydrolyse des dérivés phosphorylés obtunus. Helvetica Chimica Acta, v. 43, p. 863, 1960.

CHERBULIEZ ,E.; BAEHLER,B.; YAZGI,A.; RABINOWITZ,J. Recherches sur la formation et la transformation des esters .Phosphorylation de quelques amino-alcools. Helvetica Chimica Acta, v. 43, p. 1159, 1960.

CHERBULIEZ ,E. ; BAHLER,B.; HUNKELER,F.; RABINOWITZ,J. Recherches sur la formation et la transformation des esters .Sur la phosphonylation des alcools par les oxydes phosphoniques.Helvetica Chimica Acta, v. 44, p. 1813, 1961.

CHERBULIEZ ,E.; HUNKELER , F., RABINOWITZ, J., Recherches sur la formation et la transformation des esters .Sur la vitesse d'hydrolyse des monoesters phénylphosphoniques. Helvetica Chimica Acta, v. 44, p. 1817,1961.

CHERBULIEZ ,E.; HUNKELER,F.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters .Sur la phosphonylation des diols par l'oxyde phénylphosphonique. Helvetica Chimica Acta, v. 44, p.1825, 1961.

CHERBULIEZ ,E. ;YAZGI,A.; RABINOWITZ,J.Recherches sur la formation et la transformation des esters.Note sur la preparation de l'acide diéthylamino-1-ptopyl-2-phosphorique. Helvetica Chimica Acta, v. 44, p.1165,1961.

CHERBULIEZ ,E; GABBAI, A.; PROBST,H.; YAZGI, A.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters Sur lès esters phosphoriques primaires du type C(hal)₃-CHR-OPO₃H₂ .Helvetica Chimica Acta, v. 45, p. 2283, 1962.

CHERBULIEZ ,E.; HUNKELER,F.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters .Sur la phosphonylation des hydroxynitriles par l'oxyde phénylphosphonique. Helvetica Chimica Acta, v. 45, p. 2661, 1962.

CHERBULIEZ, E.; BAEHLER, B.; PROBST, H.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters. Sur la phosphorylation de divers types d'alcools. *Helvetica Chimica Acta*, v. 45, p. 2657, 1962.

CHERBULIEZ, E.; ANTIC, S.C.; SCHWARTZ, M.; RABINOWITZ, J. Recherches sur la formation et la transformation des esters. Sur la phosphorylation de différents types d'alcools, et particulièrement d'alcools non saturés. *Helvetica Chimica Acta*, v. 45, p. 1449, 1963.

CHIERICE, G.O. Potencialidades analíticas dos sistemas UO_2^{2+}/N_3^- e UO_2^{2+}/SCN^- . Estudos de equilíbrio e novas idéias para tratamento de dados experimentais. 1979. 231f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

CLARKE, H.B.; DATTA, S.P.; RABIN, B.R. Thermodynamic quantities for the dissociation equilibria of biologically important compounds. *Biochemistry*, v. 59, p. 209-215, 1955.

COHEN, G.; KESLER, N. Monoamine oxidase and mitochondrial respiration. *Journal of Neurochemistry*, v. 73, p. 2310, 1999.

CORAZZI, L.; PORCELLATI, G.; FREYDS, L.; BINAGLIA. Ethanolamine base-exchange reaction in rat brain microsomal subfractions. *Journal of Neurochemistry*, v. 46, p. 202-206, 1986.

CORBRIDGE, D.E.C. **Phosphorus- an outline of its chemistry:** biochemistry and technology. Amsterdam: Elsevier, 1978. 14 p.

COTISEL, M.T.; STEWART, L.C.; KATES, M.; ZSAKO, J.; CHIFU, E.I.; MOCCAN, A.; FRANGOPOL, P.T.; NOE, L.J.; QUINN, P.J. Acid dissociation constants of diphytanylglycerolphosphorylglycerol-methylphosphate and diphytanylglycerolphosphorylglycerophosphate and its deoxy analog. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 100, p. 41-54, 1999.

CHRISTIAN, G. D. **Analytical Chemistry**. 6.ed. New York: John Wiley , 2004, 828 p.

DAVIES, A. S. Ab initio and DFT computer studies of equilibria between quaternary nitrogen hydroxides, including those of choline and acetylcholine, with the water complexes of their ylidic forms. **Journal of Molecular Structure**, v. 776 , p. 33–39, 2006.

DE BRAZ, L. M.L.V. **Síntese e determinação das constantes de ionização de bis(cloridratos) de imidazolidin-4-onas derivadas da primaquina**.2006.104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Porto, Porto,2006.

ELLISON, D. W.; BEAL, M. F.; MARTIN, J. B. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. **Brain Research**, v. 417, p. 389-392, 1987.

ENKE, C.G. **The art and science of chemical analysis**. New York: John Willey, 2001. p. 90-135.

ESTELA, J.M.; CERDÁ, V. Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. **Talanta**, v.66, p. 307, 2005.

ESTEVEZ, A. Y.; O'REGAN, M.H.; SONG, D.; PHILLIS, J.W. Hypototically induced amino acid release from the rat cerebral cortex: role of phospholipases and protein kinases. **Brain Research**, v. 844, p.1-9, 1999.

FERRIER, W.G; LINDSAY, A.R.; YOUNG, D.W. Confirmation of the crystal structure of 2-aminoethanol phosphate. **Acta Crystallographica**, v. 15, p. 616, 1962.

FLASCHKA, H.A. **Quantitative analytical chemistry**. 2.ed. Boston: Willard Grant , 1980. p. 134.

FOLSCH, G.; OSTERBERG, R. The apparent acid ionization constants of some o-phosphorylated peptides and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, p. 2298-2303, 1959.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p.12.

GHASEMI, J.; NIASI, A.; WESTMAN, G.; KUBISTA, M. Thermodynamic characterization of the dimerization equilibrium of an asymmetric dye spectral of chemometric analysis. **Talanta**, v. 62, p. 835-841, 2004.

GHIDINI, E.; DELCANALE, M.; DE FANTI, R.; RIZZI, A.; MAZZUFER, M.; RODI, D.; SIMONATO, M.; LIPRERI, M.; BASSANI, F.; BATTIPAGLIA, L.; BERGAMASCHI, M.; VILLETTI, G. Synthesis and anticonvulsant activity of a class of 2-amino-3-hydroxypropanamide and 2-aminoacetamide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 3263-3274, 2006.

GONÇALVES M. **Métodos instrumentais para análise de soluções**: análise quantitativa. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste de Gulbenkian, 2001. p. 307-380 .

GONZÁLEZ, A.G; HERRADOR, M.A. Ionization constants of water insoluble arylpropionic acids in aqueous N,N-dimethylformamide mixtures from potentiometric pH-titrations. **Analytica Chimica Acta** , v. 356, p. 253-258, 1997.

GURD, F.R.N.; WILCOX, P.E. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and amino acids. **Advances in Protein Chemistry**, v.11, p. 311-427, 1956.

GUYTON, A. C. **Fisiologia humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 564 p.

HANAHAN, D.J. **A guide to phospholipid chemistry**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 214.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 912.

HEARSE, D.J. Cardioplegia: the protection of the myocardium during open heart surgery: a review. **The Journal of Physiology**, v. 76, p. 751-68, 1979.

HEDSTROM, B. Equilibria in systems with polynuclear complex formation, III: Derivation of a generalized Bodländer formula and a general method of calculating equilibrium constants. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 9, p. 613, 1955.

HENDRICKSON, H.S.; FULLINGTON, J.G. Stabilities of metal complexes of phospholipids: Ca(II), Mg(II) and Ni(II) complexes of phosphatidylserine and triphosphoinositide. **Biochemistry**, v. 4, n. 8, p.1599, 1965.

JOVANOVIĆ M.S.; POPOVIĆ, G.; KAPETANOVIĆ, V.; ORLIĆ, M.; VLADIMIROV, S. Determination of the ionization constants of 4-iodo-2, dimethylphenylcarbamoylmethyl iminodiacetic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1257-1261, 2004.

JUNGAS, R.L. Best literature values for the pK of carbonic and phosphoric acid under physiological conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 349, p. 1-15, 2006.

KISS, Z.; CRILLY, K.S.; ANDERSON, W.H. Carcinogens stimulate phosphorylation of ethanolamine derived from increased hydrolysis of phosphatidylethanolamine in C3H/101/2 fibroblasts. **Febbs Letters**, v. 336, p. 115-118, 1993.

KLUNCK, W.E.; MANIK, L.; DEBNATH, M.L.; RICHARD, J.; McCLURE, R.J.; PETTERGREW, J.W. Inactivity of phosphoethanolamine, an endogenous GABA analog decreased in Alzheimer's disease, at GABA binding sites. **Life Sciences**, v. 56, p. 2377, 1995.

KOLTHOFF, M.; SANDELL, I.B.; MEEHAN, E.J.; BRUCKENSTEIN, S. **Quantitative chemical analysis**. New York: Macmillan, 1969. 89 p.

KRAUT, J. The crystal structure of 2-amino-ethanol phosphate. **Acta Crystallographica**, v. 14, p. 1146, 1961.

LAITINEN, H.A. **Chemical analysis**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1975. p. 44.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 150.

LIPPARD, S.J.; BERG, J.M. **Principles of bioinorganic chemistry**. Califórnia: University Science Books Mill Valley, 1994. p. 144.

LITO, M.J.G.; CAMÕES, M.F. Calculation of reference pH values for standard solutions from the corresponding acid dissociation constants. **Analytica Chimica Acta**, v. 239, p. 129-137, 1990.

LOISELEUR, M.J. Titration conductimetric simultaneous of the two functional groups of aminic acids. **Académie des Sciences**, p. 136-139, 1945.

MADSEN, H.E.L., CHRISTENSEN, H., PETERSEN, G. Stability constants of copper (II), zinc, manganese (II), calcium and magnesium complexes of N-(phosphomethyl)glycine (glyphosate). **Acta Chemica Scandinavica**, v. 32, p. 79-83, 1978.

MALECKI, J.A.; NOWAK, J. Dielectric studies in benzene solutions of 4-heptyl-4'-nitrobiphenyl. **Journal of Molecular Liquids**, v. 129, p. 164-168, 2006.

MARTELL, M., MOTEKAITIS R. J. **Determination and use of stability constants**. 2. ed. New York: VCH, 1992. p.200.

MARZZOCO, A.; TORRES. B.B. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 360.

MAY, P.M. Computer simulation of metal-ion equilibria in biofluids: models for the low-molecular-weight complex distribution of calcium (II), magnesium (II), manganese(II), iron(III), copper(II), zinc(II), and lead(II) ions in human blood plasma. **Journal of Chemical Society: Dalton Transactions**, v. 6, p. 588-595, 1977.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1997. v. 2, p. 420-421.

MENDOZA, F.A.; SMITH, M. R.; BROWN, T.R. Predicting Treatment Response in Non-Hodgkin's Lymphoma From the Pretreatment Tumor Content of Phosphoethanolamine Plus Phosphocholine. **Academic Radiology**, v. 11, p. 368, 2004.

MENEGUELO, R. **Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10**. 2007.111 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)- Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

MERCE, A. L. R.; SZPOGANICZ B.; KHAN M.A.; THANH X.D.; BOUET G. Potentiometric study of vitamin D₃ complexes with manganese(II), iron(II), iron(III) and zinc(II) in water-ethanol medium. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.73, p. 167-172, 1999.

MOUAD, A.M., ASFOUR, S.V.;Semaan, F. S. ; CHIERICE, G. O.Determinação de fosfato iônico na fosfoetanolamina pelo método espectrofotométrico Azul de Molibdênio: uma comprovação de formação de agregado em solução. In: ENCONTRO REGIONAL DE QUÍMICA DA SECRETARIA REGIONAL ARARAQUARA- RIBEIRÃO PRETO E SÃO CARLOS, 15., 2005, Ribeirão Preto. **Livro de resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Química, 2005. ref. SOIB28.

MOUCHRECK, J.E. **Técnica potenciométrica no equilíbrio de aminoácidos com força iônica controlada: constante de agregação na forma dímero.** 2003. 155f. Tese (Doutorado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

NIEPER, H. A. P.V. **Médicament à base d'un sel ester monoaminoéthylique de l'acide phosphorique.** PV n. 58.410, 21 apr.1966.
NITSCH, R. M. ; BLUSZTAJN, J.K., PITTAS, A.G., SLACK, B.E., GROWDON, J.H., WURTMAN, R.J. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 1671-1675, 1992.

NOGUERA, M.; RODRIGUES-SANTIAGO, L.; SODUPE, M.; BERTRAN, J. Protonation of glycine, serine and cysteine. Conformations, proton affinities and intrinsic basicities. **Journal of Molecular Structure**, v. 537, p. 307-318, 2001.

OHLWEILER, O. A. **Química analítica quantitativa.** 2.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 2, p. 452-494.

OLMO, E., PLAZA, A., MURO, A., MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R., NOGAL-RUIZ, J.J., LOPES-PEREZ, J.L., SAN FELICIANO, A. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 6091-6095, 2006.

OSTERBERG, R. The copper (II) complexity of o-phosphorylethanolamine. **Acta Chemica Scandinavica**, v.14, p. 471, 1960.

OSTERBERG, R. Calcium, magnesium and manganese (II) complexes of some o-phosphorylated peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v.16, p. 2434-2451, 1962.

OUTHOUSE, E.L. XXX. amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochemical Journal**, v. 30, p. 143, 1936.

OUTHOUSE, E. L . CLXXXI. Further studies of amino-ethyl phosphoric ester-a compound apparently specific to malignant tumours. **Biochemical Journal**, v. 31, p. 1459–1463, 1937.

PERRIN, D.D.; DEMPSEY, B. **Buffers for pH and metal ion control**. London: Chapman and Hall, 1974. p.175

PERRY, T.L.; BERRY, K.; HANSEN, S.; DIAMOND, S.; MOK, C. Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy . **Journal of Neurochemistry**. v. 18, p. 513 -519, 1971.

PHILLIS, J. W; REGAN, M.H.O'. Characterization of models of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. **Neurochemistry International**, v. 43, p. 461-467, 2003.

PILITSIS J. G.; DIAZ F. G. ; O'REGAN M. H. ; PHILLIS J. W. Inhibition of Na /Ca exchange by KB-R7943, a novel selective antagonist, attenuates phosphoethanolamine and free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury. **Brain Research**, v. 916, p.192, 2001.

PLEPIS, A. M. DE GUZZI. **Estudos de agregação em monoetanolamina por Potenciometria**. 1984. 106 f . Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1984.

RIBEIRO FILHO, O.M. **Síntese, caracterização, estudo do equilíbrio e agregação do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato**. 117f. Tese (Doutorado)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

ROSSOTTI, H. **The study of ionic equilibria**. New York : Longman, 1978. p.39-53

ROSSOTTI, F.J.C.; ROSSOTTI, H. **The determination of stability constants and other equilibrium constants in solution**. New York: McGraw-Hill, 1960. p. 246-248.

SANTOS, A.M. **Oxidação de ligas metálicas especiais e o comportamento do filme de metal/óxido de metal como sensor de pH**. 1991. 218f. Tese (Doutorado). Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1991.

SHIN, M. H.; HOLMES, M. D.; HANKINSON, S. E.; WU, K.; COLDIZ, G. A.; WILLETT, W. C. Intake of dairy products, calcium, and vitamin D and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 1301-1310, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. G.; MORRIL, T. C. **Identificação de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979. 200 p.

SJOBERG, H.; KARAMI, K.; BERONIUS, P.; SUNDELOF, L. O. Ionization conditions for iontophoretic drug delivery. A revised pK_a of lidocaine hydrochloride in aqueous solution at 25 °C established by precision conductometry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 141, p. 63-70, 1996.

SKRTIC D.; MIHOFER, H. F. Influence of some aminoacids on the spontaneous precipitation of calcium oxalate from high ionic strength solutions. **Journal of Crystal Growth**, v. 129, p. 449-455, 1993.

SOSNOVSKY, G.; BELL, P. In the search for new anticancer drugs. A study on the correlation of lipophilicities. Ionization constants and anticancer activities of aminoxyl labeled TEPA congeners. **Life Sciences**, v. 62, p. 639-648. 1998.

STONE, W. E. Acid-soluble phosphorus compounds of cerebral tissue. **Journal of biological chemistry**, v. 149, p. 29, 1943.

SUEOKA, T. K.; KING, D. M. Phosphatidylethanolamine biosynthesis in rat mammary carcinoma cells that require and do not require ethanolamine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 6074-6081, 1987.

SURESH, S.; VIJAYAN, M. Variability in ionization state, stoichiometry and aggregation in histidine complexes with formic acid. **Journal of Biosciences**. v. 20, p. 225-234, 1995.

SWAMINATHAN, S.; CRAVEN, B. M. Electrostatic properties of phosphorylethanolamine at 123 K from crystal diffraction. **Acta Crystallographica**, B40, p. 511-518, 1984.

TOY, A. D.; WALSH, E. N. **Phosphorus chemistry in everyday living**. 2. ed. Washington: American Chemical Society, 1987. 362 p.

TREEDE, I., BRAUN, A., SPARLA, R., KUHNEL, M., GIESE, T., TURNER, J. R.; ANES, E., KULAKSIZ, H., FULLERKRUG, J., STREMMEL, W., GRIFFITHS, G., EHEHALT, R. Anti-inflammatory Effects of Phosphatidylcholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 27155-27164, 2007

VOET, D.; VOET, J.D. **Biochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley, 1994. p. 563-595.

VOGEL, A.I. **Análise inorgânica quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1992. p.189.

WALKER, D.M. The free amino-acids occurring in the body tissues and blood of the rat and of the cow. **Biochemical Journal**. v. 52, p. 679-683, 1952.

WEBER, H.P., MUCMULLAN, K., SWAMINATHAN, S.; CRAVEN, B.M. The structure and thermal motion of phosphorylethanolamine at 122 K from neutron diffraction. **Acta Crystallographica**, v.40 p. 506-511, 1984.

WEBER, A.; MILLER, S.L. Reasons for the occurrence of the twenty coded protein aminoacids. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, p. 273-284, 1981.

WILLIAMS, R.J.P.; BOYER, P. D. ; LARRY, H.; MYRBACK, T. **The Enzymes**. 2.ed. New York : Academic Press, 1959. p. 1391.