APLICAÇÃO DE MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

E ESPECTROSCÓPICOS AO ESTUDO DE

INTERACÇÕES ENTRE MOLÉCULAS COM RELEVÂNCIA BIOLÓGICA MEDIADAS POR CATIÕES METÁLICOS

Alberta Paula Lobo Machado Gameiro dos Santos

Dissertação para Doutoramento em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

PORTO

1994

Interacções entre Moléculas com Relevância Biológica Mediadas por Catiões Metálicos

APLICAÇÃO DE MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

E ESPECTROSCÓPICOS AO ESTUDO DE

INTERACÇÕES ENTRE MOLÉCULAS COM RELEVÂNCIA BIOLÓGICA MEDIADAS POR CATIÕES METÁLICOS

Alberta Paula Lobo Machado Gameiro dos Santos

Dissertação para Doutoramento em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

PORTO

1994

"Content myself with the conclusion;

In theory there is no solution"

(W.H.Auden, em "The Labyrinth"; the collected Poetry of W.H. Auden, Random House, Nova Iorque, 1945)

Índice Geral

Índice de Figuras xvii

Índice de Tabelas xxi

Abreviaturas xv

Prefácio xvii

Agradecimentos xxxiii

Resumo xxxvii

Abstract xxxix

PARTE PRIMEIRA: A TEORIA 3

CAPÍTULO 1 EQUILÍBRIO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS 5

1 Aspectos gerais sobre a acção de drogas 6

1.1 Parâmetros físico-químicos e actividade farmacológica 8

	Parâmetros de solubilidade	9
	Parâmetros empíricos	9
	Parâmetros electrónicos	9
	Efeitos estereoquímicos	10
1.2	Actividade biológica e interacções químicas	11
	Ligações covalentes	11
	Ligações não covalentes	11
	Interacções hidrofóbicas	13
2	**Drogas que actuam no SNC: 1,4-benzodiazepinas**	15
	GABA	18
	Benzodiazepinas	19
3	**Metais e sua actividade biológica no SNC**	20
	Níquel	22
	Cobre	22
	Zinco	23
	Cádmio	23
	Interacções metal/ligando	24
CAPÍTULO 2	**EQUILÍBRIO QUÍMICO: ASPECTOS TERMODINÂMICOS**	27
1	**Sistemas químicos em solução**	27
	Equilíbrio termodinâmico	28
2	**Sistemas químicos em soluções mistas ou não aquosas**	34
	Efeito do meio	34

Função de Gibbs de transferência 36

Efeito da concentração 38

3 **O conceito de constante de equilíbrio** 38

CAPÍTULO 3 EQUILÍBRIO EM SOLUÇÃO: MÉTODOS MATEMÁTICOS 41

1 **Métodos lineares: análise gráfica e numérica** 44

Variáveis secundárias 44

Função de formação 44

Grau de formação 45

Análise gráfica 46

Análise numérica 50

2 **Métodos não lineares** 53

3 **Comentário final** 56

CAPÍTULO 4 EQUILÍBRIO EM SOLUÇÃO: MÉTODOS EXPERIMENTAIS 59

1 **Técnicas potenciométricas** 61

Variável dependente 61

Aquisição de dados 62

Tratamento matemático 64

2 **Espectrofotometria de ultravioleta/visível** 67

Variável dependente 61

Aquisição de dados 62

Tratamento matemático 64

3 **Ressonância magnética nuclear** 72

4	**A escolha de métodos experimentais**	75
CAPÍTULO 5	COMPLEXOS TERNÁRIOS	77
1	**Caracterização da estabilidade de complexos ternários**	78
	Definição de $\Delta\log K$	78
	Definição de $\log X$	79
	Valor estatístico de $\Delta\log K$	81
	Valor estatístico de $\log X$	82
	Limitações destes métodos	82
2	**Factores que influenciam a formação de complexos ternários**	84
	Neutralização de carga	84
	Repulsão estereoquímica	85
	Retrodoação π	*86*
	Interacções entre ligandos	86
	Equilíbrio fechado/aberto	88
	Basicidade e estabilidade	89
3	**Considerações gerais**	90
PARTE SEGUNDA: A TEORIA		93
CAPÍTULO 6	METODOLOGIA GERAL	95
1	**Reagentes e soluções**	95
	Reagentes	95
	Soluções	96
2	**Instrumentação utilizada**	97

Potenciometria 97

Espectroscopia 97

3 Métodos de cálculo utilizados 98

Programa SUPERQUAD 99

Programa BEST 102

Programa SQUAD 104

RMN 107

Erros 108

CAPÍTULO 7 TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS 109

1 O sistema de titulação 110

Aquisição de dados 111

2 Calibração do sistema em solução aquosa 112

Definição de pH 113

Determinação de pH 114

O eléctrodo de vidro 115

Calibrações com tampões 116

Calibrações por titulação ácido forte/base forte 116

Calibração do sistema 118

Método de Gran/zona ácida 118

Método de Gran/zona alcalina 119

3 Calibração do sistema em água/metanol 124

Elétrodos de referência 124

Definição de $^{s}_{s}$pH 125

Calibração do sistema 126
pK_s operacional 130
Potenciais de junção 131
Considerações gerais 131
4 **Conclusões** 133

PARTE TERCEIRA: OS RESULTADOS 135

CAPÍTULO 8 SISTEMA CITIDINA/GLICILGLICINA/CATIÃO DO GRUPO 12 137

1 **Glicilglicina: protão e catiões metálicos** 139
pK_a Glicilglicina 139
Constantes de formação 141
Catião zinco (II) 142
Catião cádmio (II) 143
2 **Citidina: protão e catiões metálicos** 145
pK_a da citidina 146
Constantes de formação 147
Locais de coordenação 150
3 **Complexos ternários metal/citidina/glicilglicina** 151
Complexos mistos 152
Catião zinco (II) 153
Catião cádmio (II) 153
Cooperatividade 154
4 **Conclusões** 156

CAPÍTULO 9 CONSTANTES DE ACIDEZ DE BENZODIAZEPINAS 159

1 Execução experimental e métodos de cálculo 160

1.1 Determinação potenciométrica em água 160

Hidrólise das benzodiazepinas 164

1.2 Determinação espectrofotométrica em água 164

Espectros de UV/VIS 165

Determinação de pK_a 167

1.3 Determinação potenciométrica em água/metanol 172

2 Análise e discussão dos resultados 174

2.1 Valores obtidos para soluções aquosas puras 174

MDZ/ClDZ 175

Diazepam e prazepam 176

2.2 Valores obtidos para soluções hidrometanólicas 178

3 Conclusões 181

Extrapolação de pK_a 182

pK_a em água/metanol 184

CAPÍTULO 10 CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO GABA/BENZODIAZEPINAS 187

1 Constantes de acidez do ácido γ - aminobutírico 188

1.1 Determinação potenciométrica 188

1.2 Determinação espectroscópica 189

2 Constantes de associação 193

2.1 Determinações potenciométricas 193

Medazepam 194

Clorodiazepóxido 197

2.2 Determinações espectrofotométricas (UV/VIS) 199

Medazepam 201

Clorodiazepóxido 204

3 Conclusões 205

CAPÍTULO 11 CONSTANTES DE FORMAÇÃO CATIÃO METÁLICO/GABA/BENZODIAZEPINA 213

1 Constantes de formação metal/GABA 213

Condições gerais 214

GABA/cobre (II) 215

K_{CuHG} associados à equação 11.2 216

K_{CuHG} associados à equação 11.3 218

Diagramas de distribuição 218

GABA/Zn, Cd e Ni (II) 218

Equilíbrios encontrados 219

2 Constantes de formação metal/benzodiazepinas 221

Diazepam 222

Medazepam 224

Clorodiazepóxido 226

3 Análise dos resultados obtidos para as espécies binárias 227

GABA 227

Benzodiazepinas 230

4 Constantes de formação metal/GABA/benzodiazepinas 231

CONSIDERAÇÕES FINAIS 237

A BIBLIOGRAFIA 245

BIBLIOGRAFIA 247

Índice de Figuras

Figura 1.1 Esquema de uma possível interacção hidrofóbica entre fragmentos que contém os grupos isopropilo e isopentilo 14

Figura 1.2 Representação esquemática da função das sinapses 17

Figura 3.1 Esquema de cálculo do método de mínimos quadrados lineares 51

Figura 3.2 Esquema da estrutura geral dos programas utilizados na determinação de constantes de equilíbrio 52

Figura 6.1 Exemplo do arquivo de entrada do programa SUPERQUAD 101

Figura 6.2 Fluxograma simplificado do programa SQUAD 106

Figura 7.1 Esquema do sistema automático de titulação 110

Figura 7.2 Representação gráfica da 1ª derivada da curva de titulação de HCl com NaOH referente à primeira linha da Tabela I: (a) 1º eléctrodo; e (b) 2º eléctrodo. Evidenciando a ausência de carbonato que parecia existir para o caso (b) dada a diferença en-

tre os volumes equivalentes determinados pelos dois ramos do método de Gran 121

Figura 7.3 Representação gráfica da função ${}^{s}E = f(-\log c_H+)$ para as diferentes percentagens de água/metanol utilizadas:(a) zona ácida; e (b) zona alcalina 128

Figura 8.1 Diagramas de distribuição para o sistema zinco/glicilglicina. A: $1x10^{-3}$ *M* de glicilglicina; B: $1x10^{-2}$ *M* de glicilglicina 143

Figura 8.2 Diagramas de distribuição para o sistema cádmio/glicilglicina. A: $1x10^{-3}$ *M* de glicilglicina e $2x10^{-3}$ *M* de Cd^{2+}; B: $1x10^{-2}$*M* de glicilglicina e $2{,}5x10^{-2}$ *M* de Cd^{2+}. Resultados obtidos a força iónica 0,1 *M* com $NaClO_4$ e a 25°C 144

Figura 8.3 Diagramas de distribuição para o sistema cádmio/citidina. A: $1x10^{-3}$*M* de citidina e $1x10^{-2}$*M* de Cd^{2+}; B: $1x10^{-3}$*M* de citidina e $6x10^{-2}$*M* de Cd^{2+}. Resultados obtidos a foça iónica 0,1*M* com $NaClO_4$ e a 25°C 149

Figura 8.4 Diagrama de distribuição para o sistema cádmio/citidina/glicilglicina: $1x10^{-2}$*M* de citidina, $1x10^{-2}$*M* de glicilglicina e $2{,}5x10^{-2}$ *M* de Cd^{2+} a força iónica 0,1*M* com $NaClO_4$ e a 25°C 155

Figura 9.1 Espectros típicos de *diazepam* (A), *medazepam* (B), *clorodiazepóxido* (C) e *prazepam*(D) 166

Figura 9.2 Representação gráfica de $A_\lambda = f(-\log c_H+)$ para o *diazepam* (A) e para o *clorodiazepóxido* (B), mostrando uma inflexão perto do valor obtido para os pK_a, para vários comprimentos de onda 168

Figura 9.3 Representação gráfica da relação linear existente entre os ${}^{s}pK_a$ das benzodiazepinas e quantidade de metanol no solvente. A-*diazepam*; B-*medazepam*; C-*clorodiazepóxido*; D-*prazepam* 173

Figura 10.1 Espectros de RMN de ^1H do ácido γ-aminobutírico a pH 2,8 (A) e 10,3 (B) 190

Figura 10.2 Representação gráfica das curvas de titulação $\delta = f(-\log c_H+)$; (A) desvios químicos obtidos para o multipleto associado ao C - 2; (B) desvios químicos obtidos para o multipleto associado ao C- 3; (C) desvios químicos obtidos para o multipleto associ-

ado ao C - 4 193

Figura 10.3 Diagrama de distribuição para o sistema GABA/*medazepam*. A: $6x10^{-4}$ *M* de *medazepam* e $2,5x10^{-3}$ *M* de GABA; B: $6x10^{-4}$ *M* de *medazepam* e $1,0x10^{-3}$ *M* de GABA 196

Figura 10.4 Interacções possíveis entre o *clorodiazepóxido* e o GABA. A: interacção correspondente ao equilíbrio definido pela equação 10.10; B: Interacção correspondente à associação do grupo amina do GABA com o grupo N-O do *clorodiazepóxido* 197

Figura 10.5 Diagrama de distribuição para o sistema GABA/*clorodiazepóxido*. A: $6x10^{-4}$ *M* de *clorodiazepóxido* e $2,5x10^{-3}$ *M* de GABA; B: mesmas condições mas considerando a segunda protólise do *clorodiazepóxido* determinada potenciometricamente 198

Figura 11.1 Diagramas de distribuição do sistemas cobre(II)/GABA. A: $2x10^{-3}$ *M* Cu^{2+} e $5x1^{-3}$ *M* GABA; B: $1x10^{-3}$ *M* Cu^{2+} e $2x10^{-3}$ *M* GABA incluindo os hidróxo complexos de Cu^{2+} 219

Figura 11.2 Diagramas de distribuição dos sistemas. A: Zinco(II)/GABA, $2x10^{-3}$ *M* Zn^{2+}/$4x10^{-3}$ *M* GABA; B: Níquel(II)/GABA, $2x10^{-3}$ *M* Zn^{2+}/$5x10^{-3}$ *M* GABA 221

Figura 11.3 Diagramas de distribuição dos sistemas. A: Cobre(II)/*diazepam*, $4x10^{-3}$ *M* Cu^{2+}/ $6x10^{-4}$ *M diazepam*; B: Zinco(II)/*diazepam*, $1x10^{-2}$ *M* Zn^{2+}/$7x10^{-4}$ *M diazepam* 224

Figura 11.4 Diagramas de distribuição dos sistemas. A: Cobre(II)/*medazepam*, $2,5x10^{-3}$ *M* Cu^{2+}/ $9x10^{-4}$ *M medazepam*; B: Zinco(II)/*medazepam*, $9x10^{-3}$ *M* Zn^{2+}/$9x10^{-4}$ *M medazepam* 226

Figura 11.5 Diagramas de distribuição dos sistemas. A: Cobre(II)/*clorodiazepóxido*/GABA, $2x10^{-3}$ *M* Cu^{2+}/$8x10^{-4}$ *M medazepam*/$2x10^{-3}$ *M* Cu^{2+}/$9x10^{-4}$ *M clorodiazepóxido*/$2x10^{-3}$ *M* GABA 235

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	Interacções não covalentes importantes em sistemas biológicos	10
Tabela 1.2	Neurotransmissores: localização, funções, e efeitos e exemplo de drogas que os afectam	18
Tabela 1.3.	Algumas características gerais de complexos de iões metálicos presentes nos sistemas biológicos	21
Tabela 4.1	Programas mais utilizados em potenciometria	64
Tabela 4.2	Funções gráficas que permitem inferir a estéquiometria de espécies em estudo	69
Tabela 4.3	Transformações lineares utilizadas na determinação de constantes de acidez e de formação por espectrofotometria de UV/VIS	71
Tabela 4.4	Programas computacionais mais utilizados em espectrofotometria de UV/VIS	72
Tabela 5.1	Exemplo de valores estatísticos de $\Delta\log K$ para diferentes geometrias	81
Tabela 5.2	Dependência de $\Delta\log K$ e log X de complexos ternários quadrados de Cu^{2+} com o	

	número de lados dos anéis quelantos formados com ligandos bidentados	85
Tabela 5.3	Dependência de $\Delta \log K$ e log X de complexos ternários quadrados de Cu^{2+} com a natureza dos átomos coordenadores	87
Tabela 7.1	Volumes equivalentes obtidos pelo método de Gran para dois eléctrodos de vidro diferentes, numa mesma solução amostra	120
Tabela 7.2	Variação da diferença entre os valores de V_{ac} e de V_{alc} (ΔV), determinados pelo método de Gran ao longo de sete semanas, para dois eléctrodos diferentes (1 - Philips; 2 - Ingold) numa mesma solução amostra	122
Tabela 7.3	Parâmetros de calibração do sistema de titulação nas diferentes percentagens água/metanol	130
Tabela 8.1	Constantes de acidez da glicilglicina	140
Tabela 8.2	Constantes de formação da glicilglicina com o catião zinco(II) e cádmio(II)	141
Tabela 8.3	Constantes de acidez da citidina	147
Tabela 8.4	Constantes de formação do complexo de citidina com o catião zinco(II) e o catião cádmio(II)	148
Tabela 8.5	Constantes de formação do complexo ternário catião cádmio(II)/citidina/glicilglicina	154
Tabela 9.1	$^{s}pK_a$ das benzodiazepinas determinados por métodos potenciométricos e espectrofotométricos em solução aquosa e em água/metanol	162
Tabela 9.2	Valores de λ_{max} (nm) e das obsortividades molares para as bandas de absorção de espectros típicos de benzodiazepinas	165
Tabela 9.3	pK_a obtidos com a equação 9.4 para o *diazepam* e com a equação 9.5 para o *clorodiazepóxido*	170
Tabela 9.4	$^{s}pK_a$ de benzodiazepinas em meios hidrometanólicos com diferentes composições	172
Tabela 9.5	ΔpK_a experimental e calculado a partir da equação 9.7 em diferentes meios	

	hidrometanólicos	181
Tabela 10.1	pK_a do GABA e de alguns aminoácidos análogos	188
Tabela 10.2	Desvios químicos obtidos para o pico central do multipleto associado a cada tipo de átomos de hidrogénio em função de -logc_H+	191
Tabela 10.3	Valores de pK_a do GABA determinados por RMN de ^{1}H e desvios químicos limite obtidos para as espécies $H_2G(\delta_{H_2G})$, $HG(\delta_{HG})$ e $G(\delta_G)$	192
Tabela 10.4	Constantes de associação obtidas por titulação potenciométrica para os sistemas GABA/*medazepam* e GABA/*clorodiazepóxido*	194
Tabela 10.5	Constantes de associação determinadas por espectrofometria para os sistemas GABA/*medazepam* e GABA/*clorodiazepóxido*	202
Tabela 10.6	Constantes de associação globais e equilíbrios, possíveis, a elas associados para benzodiazepinas estudadas	207
Tabela 11.1	Constantes de equilíbrio globais e constantes de formação para os sistemas M^{2+}/GABA	217
Tabela 11.2	Constantes de equilíbrio globais e constantes de formação a elas associadas para os sistemas M^{2+}/benzodiazepina	223
Tabela 11.3	Constantes de formação MG, para o GABA, glicina e β-alanina	229
Tabela 11.4	Constantes de formação globais e $\Delta\log K$ obtidas para os sistemas ternários M^{2+}/GABA/BZP	232

Abreviaturas

SNC	Sistema Nervoso Central
GABA	ácido γ-aminobutírico
DNA	ácido deoxiribonucleico
en	1,2-diaminoetano
1,3-prop	1,3-diaminopropano
pyr	pirocatecolato
ser	serina
mal	anião malonato
ha	histamina
bipy	2,2'- bipiridilo
gly	glicina

6,7-dsn	6,7,diidróxinaftaleno-2-sulfonato
o-phen	o-fenantrolina
Ade	adenosina
phen	fenantrolina
leu	leucina
ala	alanina
HL	glicilglicina na forma de ião dipolar
C	citidina
HG	ácido γ-aminobutírico na forma de ião-dipolar
G	ácido γ-aminobutírico na forma desprotonada
DZP	*diazepam*
MDZ	*medazepam*
ClDZ	*clorodiaxepóxido*
HH	ácido 6-aminohexanoíco
BZP	benzodiazepina
HBZP	benzodiazepina na forma protonada

PREFÁCIO

O ESTUDO DO PAPEL DOS CATIÕES METÁLICOS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS TEM REVELADO a sua importância fulcral para muitos processos bioquímicos essenciais, com funções reguladoras estruturais ou enzimáticas. Actualmente, tem sido dado particular interesse ao estudo de possíveis interacções entre drogas e catiões metálicos numa tentativa de se clarificar o papel destes na actividade biológica de várias drogas. Sendo a maioria das drogas moléculas com vários átomos potencialmente coordenadores e dada a existência de vários catiões metálicos na maioria dos fluidos biológicos é natural que ocorram várias interacções droga/catião metálico. Estas interacções podem ser mais ou menos fortes e o envolvimento do metal no funcionamento da droga pode acontecer a diferentes níveis. Assim, é de prever a existência de:

- drogas que são um composto metálico cuja acção é atribuída ao próprio catião metálico;
- drogas que são ligandos com uma elevada afinidade para catiões metálicos, estando a sua acção directamente relacionada com a sua força como ligandos;

- drogas que contêm estruturas quelantes além de outros grupos farmacológicamente activos, embora não seja conhecida nenhuma correlação entre o seu efeito e a afinidade a catiões metálicos e;
- drogas que não formam quelatos mas que contêm grupos dadores, embora não tenha sido ainda detectada nenhuma correlação entre a sua acção biológica e a capacidade de formação de complexos.

Considerando que a regulação da actividade de uma droga está intimamente relacionada com aspectos de equilíbrio de associação entre os vários ligandos e catiões metálicos existentes nos fluidos biológicos é de grande interesse o estudo do equilíbrio de complexação de catiões metálicos com este tipo de ligandos, nomeadamente a interacção de um metal com vários ligandos potencialmente competitivos e que possam actuar simultaneamente.

Para se poder determinar o mecanismo molecular associado à actividade biológica dos catiões metálicos em relação ao funcionamento de uma droga é necessário conhecer o comportamento da droga como ligando e a natureza das possíveis interacções catião metálico/droga. Este tema, bastante abordado para sistemas que contêm aminoácidos essenciais e nucleotídeos, não tem sido muito explorado em termos de se tentar explicar relações do tipo estrutura/actividade de drogas que formam complexos metálicos ao pH fisiológico.

Com o actual desenvolvimento da química bioinorgânica e o reconhecimento da importância dos catiões metálicos nas funções neuronais é necessário estudar a possível influência dos catiões metálicos a nível do sistema nervoso. Estudos efectuados *in vitro* indicam que as drogas que influenciam processos biológicos associados aos neurotransmissores

(armazenamento, libertação ou "uptake") produzem modificações nas concentrações endógenas de catiões metálicos e também que a administração de catiões metálicos exógenos a nível cerebral provoca variabilidade a nível do comportamento. Assim, torna-se importante estudar as possíveis interacções entre catiões metálicos e drogas que actuam a nível do sistema nervoso central, não só em termos de quantificação destas interacções, como em termos de caracterização estrutural dos adutos formados.

As 1,4-benzodiazepinas são as drogas psicoterapêuticas actualmente mais prescritas dado a sua elevada eficiência e inocuidade no tratamento da ansiedade. No entanto, pouco se sabe sobre o comportamento destas drogas como ligandos em solução, apesar de terem sido efectuados alguns estudos sobre as propriedades complexantes das benzodiazepinas com catiões metálicos, que revelaram alterações importantes das propriedades farmacológicas destas drogas na presença de catiões metálicos.

Numa tentativa de elucidar a relação que existe entre a estrutura química e a actividade biológica destas substâncias foram efectuados os estudos que se passam a apresentar.

A baixa solubilidade das benzodiazepinas, aliada à sua tendência para hidrolisar, em solução aquosa, tem dificultado a determinação das respectivas constantes de acidez destas drogas, parâmetro importante não só para a obtenção de correlações estrutura/actividade como para a posterior determinação de parâmetros de complexação com catiões metálicos. Neste trabalho apresentam-se três metodologias diferentes que permitem a determinação precisa e exacta dos valores das constantes de acidez em água e em água/metanol de quatro benzodiazepinas, *diazepam*, 7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona, *medazepam*, 7-cloro-2,3-diidro-1-metil-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepina, *clorodiazepóxido*, 7-cloro-N-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina-2-amina-4-óxido e *prazepam* 7-clo-

ro-1-ciclopropilmetil-5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona. As determinações em água/metanol permitem esta última obviar o problema da baixa solubilidade destas substâncias em água, pois verificou-se que é possível obter o valor das constantes de acidez em solução aquosa a partir da extrapolação dos valores determinados para diferentes misturas hidrometanólicas ricas em água.

Dada a relação entre a actividade biológica das benzodiazepinas e do neurotransmissor GABA é possível que o estudo da interacção entre estas substâncias permita obter resultados elucidativos para o mecanismo de acção das mesmas a nível do sistema nervoso central. Foram, por isso, determinadas as constantes de associação benzodiazepina/GABA para verificar a possível existência de interacções droga/neurotransmissor.

Conhecendo-se em muitos sistemas de interesse biológico, a existência de um efeito sinérgico entre as interacções de ligandos biológico mediadas por catiões metálicos, efectuou-se o estudo das propriedades complexantes das benzodiazepinas *diazepam*, *medazepam* e *clorodiazepóxido* com os catiões metálicos níquel(II), cobre(II), zinco(II) e cádmio(II), do GABA com os mesmos catiões metálicos e dos complexos ternários entre catiões metálicos/benzodiazepina/GABA.

A potenciometria foi utilizada como método preferencial para a determinação dos valores das constantes de equilíbrio atrás mencionadas sãopelo que neste trabalho é dada especial atenção ao sistema de titulação potenciométrico utilizado e respectiva calibração. Para testar o referido sistema e verificar a hipótese descrita por Li *et al*, da ocorrência de um efeito sinérgico entre a citidina e a glicilglicina mediado pelo catião zinco(II), é apresentado o estudo da formação de complexos binários e ternários mistos de citidina e glicilglicina com zinco (II) e cádmio (II).

Esta dissertação está dividida em três partes; **A teoria**, em que

se começa por fazer um enquadramento da importância das interacções moleculares a nível biológico e em que são definidos os conceitos básicos necessários para a compreensão e execução do trabalho experimental. Esta parte é constituída por cinco capítulos dedicados à descrição de alguns aspectos da química médica que estuda a interligação entre propriedade químicas de uma droga, sua actividade biológica e importância dos catiões metálicos nesta relação (Capítulo 1), os conceitos termodinâmicos associados às constantes de equilíbrio, em solução (Capítulo 2), aos métodos experimentais e matemáticos utilizados na determinação das constantes de equilíbrio dos sistemas estudados neste trabalho (Capítulo 3 e 4) e às características gerais que permitem prever a formação preferencial de complexos mistos em sistemas biológicos (Capítulo 5).

A segunda parte, **A metodologia**, encontra-se dividida em dois capítulos em que se descreve as várias metodologias utilizadas para a determinação das constantes de equilíbrio deste trabalho (Capítulo 6)com especial ênfase no sistema de titulação potenciométrico utilizado e a algumas observações experimentais relevantes para a determinação de constantes de equilíbrio por esta técnica tanto em solução aquosa com em solventes mistos água/metanol (Capítulo 7).

A parte três, **Os resultados**, dividida em quatro capítulos onde se apresentam os resultados obtidos no estudo da formação de complexos binários e ternários mistos de citidina e glicilglicina com zinco (II) e cádmio (II) (Capítulo 8), das constantes de acidez das quatro benzodiazepinas já mencionadas, em água e em água/metanol (Capítulo 9), das possíveis interacções, em solução aquosa, entre as benzodiazepinas e o ácido γ-aminobutírico (GABA) (Capítulo 10), das constantes de formação destas espécies com os catiões metálicos níquel(II), cobre(II), zinco(II) e cádmio(II) e da possível formação de complexos ternários catião metálico/benzodiaze-

pina/GABA (Capítulo 11). Finalmente são apresentadas considerações gerais acerca dos resultados experimentais obtidos ao longo de todo o trabalho e da sua possível interpretação em termos de relações estrutura/actividade entre drogas e catiões metálicos.

Agradecimentos

À Reitoria da Universidade do Porto a autorização para a dispensa de serviço docente durante três anos ao abrigo do artigo 27 do E.C.D.U..

À Reitoria da Universidade do Porto e à Fundação Gomes Teixeira o apoio financeiro concedido.

Ao Grupo de Química da Faculdade de Ciências do Porto o ter-me aceite como membro do seu corpo docente e o apoio concedido para a dispensa de serviço docente.

Ao Professor Doutor Baltazar de Castro, a dedicação com que cumpriu a sua missão de orientador científico, a oportunidade de realizar trabalho nesta área de investigação e principalmente o apoio e a amizade com que me distingue.

Ao Professor Doutor José Luís Costa Lima, a disponibilidade concedida para a realização deste trabalho no seu Laboratório, o apoio, incentivo e amizade desde sempre demonstrados e a paciência para as meus acessos de mau génio.

Ao Professor Doutor Adélio Machado a oportunidade de integrar o Grupo de Química Inorgânica e o apoio desde sempre demonstrado.

Ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto a utilização do espectrofotómetro de Ultravioleta/Visível.

À Doutora Maria Fernanda Cabral a possibilidade de utilização do espectrofotómetro de Ultravioleta/Visível e a simpatia sempre demonstrada.

À Doutora Maria Cândida Vaz o apoio na utilização do programa SUPERQUAD e a proveitosa troca de impressões sobre determinação de constantes de equilíbrio.

Ao Doutor João Pessoa o apoio na utilização do programa SQUAD.

A todos os Membros do Departamento de Química da Faculdade de Ciências que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os Membros do Departamento de Química-Física da Faculdade de Farmácia que de alguma forma deram o seu contributo para a realização deste trabalho e me proporcionaram uma agradável convivência durante o período da sua execução.

À Locas a saudável loucura e o 4π.

Ao Rui Lapa, a amizade, a colaboração no encaminhamento dos bits e as infindáveis *discussões*.

À Conceição, os meus agradecimentos globais e extra-termodinâmicos.

À Salette, minha colega *constantímetra*, a amizade e solidariedade sempre demonstradas.

Ao João, a boa disposição e a contribuição para a manutenção da minha sanidade mental.

À Ana Cristina a camaradagem sempre demonstrada desde o tempo de estudante.

À Amélia a ajuda imprescindível na montagem final deste trabalho.

A todos os Amigos que com a sua colaboração e amizade permitiram a realização deste trabalho.

À minha Família o apoio e ajuda nunca regateados.

Ao Rui, ao Miguel e à Rita a presença e incentivo constantes e em especial a compreensão das ausências.
Aos Meus Pais, a educação, as oportunidades que me proporcionaram e o incondicional apoio ao longo de toda a minha vida.

Resumo

O OBJECTIVO DO TRABALHO DESCRITO NESTA DISSERTAÇÃO CENTROU-SE NO ESTUDO de interacções entre moléculas com interesse biológico mediadas por catião metálico por métodos potenciométricos e espectroscópicos. Para a determinação das constantes de equilíbrio potenciométricas foram efectuadas várias titulações com o eléctrodo sensível ao catião hidrogénio, num sistema de titulação automático, controlado por um microcomputador compatível com IBM. O comportamento deste sistema de titulação foi testado no estudo das constantes de acidez dos ligandos citidina e glicilglicina, e de formação dos mesmos ligandos com o catião zinco(II) e cádmio(II). O mesmo sistema foi ainda testado na determinação de constantes de equilíbrio de sistemas mistos pela determinação das constantes de equilíbrio dos sistemas catião metálico/citidina/glicilglicina. Os valores das constantes de equilíbrio para os sistemas referidos, obtidos com o sistema de titulação utilizado ao longo de todo este trabalho, foram sempre concordantes com resultados publicados na literatura, o que garante a qualidade do sistema utilizado.

Este estudo foi estendido à determinação de constantes de equilíbrio de sistemas com interesse fisiológico e farmacológico. Nesta perspecti-

va, estudaram-se os equilíbrios catião/metálico/GABA/benzodiazepinas, tendo-se realizado estudos com os catiões metálicos níquel(II), cobre(II), zinco(II) e cádmio(II), com o *diazepam*, o *medazepam*, o *clorodiazepóxido* e *prazepam*.

A determinação das constantes de equilíbrio catião/metálico/GABA/benzodiazepinas em solução aquosa (25 °C e I= 0,1*M* em NaCl) foi efectuada potenciometricamente com o sistema de titulação automático anteriormente referido.

As constantes de acidez das benzodiazepinas foram estudadas por três metodologias diferentes designadamente, titulação potenciométrica em solução aquosa e em soluções hidrometanólicas ricas em água e, por espectrofotometria de ultravioleta/visível, à mesma temperatura e força iónica.

As constantes de associação GABA/benzodiazepinas e as constantes de formação catião metálico/GABA e catião metálico/benzodiazepina foram estudadas, nas condições experimentais já referidas, por potenciometria e por espectrofotometria de ultravioleta/visível.

Abstract

Metal ion mediated interactions between molecules of biological interest were studied in this work by means of potentiometric and spectrophotometric techniques. Several titrations, using a glass electrode and an automatic titration system controlled by an IBM compatible microcomputer, were performed to determine potentiometric equilibrium constants. To test the titration system the ionization constants of cytidine and glycylglycine, the formation constants of the ligands with the metal ions Zn(II) and Cd(II) were determined and the values obtained are in good agreement with those published in the literature. The equilibrium constants for the system metal ion/cytidine/glycylglycine were also determined in this work.

The titration system was then used in equilibrium studies of physiological and pharmacological importance such as the system metal ion/GABA/benzodiazepine. Interactions between *diazepam*, *medazepam*, *chlorodiazepoxide* and *prazepam*, the metal ions Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) and GABA were studied in this work.

The equilibrium constants metal ion/GABA/benzodiazepines in aqueous solution (25 C and I=0,1 *M* in NaCl) were determined potentiometrically with the automatic titration system.

Ionization constants of benzodiazepines were determined potentiometrically in water and methanol/water mixtures (up to 50% methanol) and UV/VIS spectrophotometry, at the same temperature and ionic strength.

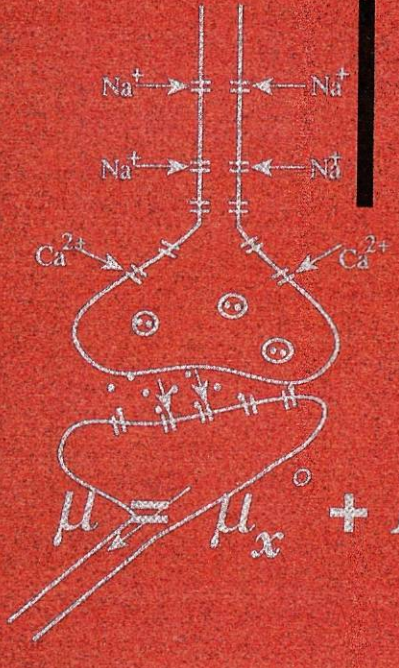
Association constants GABA/benzodiazepines, formation constants metal ion/GABA and metal ion/GABA/benzodiazepines were determined in the same experimental conditions using both potentiometry and UV/VIS spectrophotometry.

APLICAÇÃO DE MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

E ESPECTROSCÓPICOS AO ESTUDO DE

INTERACÇÕES ENTRE MOLÉCULAS COM RELEVÂNCIA BIOLÓGICA MEDIADAS POR CATIÕES METÁLICOS

Parte Primeira



$$K_a/h\,e\,Z = 1+K_a/h$$

$$(A - \varepsilon_M M) - \varepsilon L$$

$$\mu_x = \mu_x^{\circ} + RT\,[\ln \gamma_x$$

$$\Sigma \nu_i \mu_i = 0$$

A Teoria

Capítulo

1

Equilíbrio em Sistemas Biológicos

A ENORME COMPLEXIDADE DOS SISTEMAS VIVOS DIFICULTA O SEU ESTUDO E COMPREensão razão pela qual os investigadores tentam utilizar sistemas mais simples que, embora não traduzam todas as funções que ocorrem *in vivo*, permitam mimetizar um certo número de propriedades importantes associadas a um determinado comportamento do sistema mais complexo, de modo a que a manipulação molecular e a utilização de métodos físico-químicos precisos seja possível. Assim, a caracterização do comportamento em solução de ligandos com interesse biológico e o estudo das suas possíveis interacções em sistemas simples permitiu lançar alguma luz sobre relações estrutura/actividade em sistemas biológicos.[1]

A importância hoje indiscutível dos catiões metálicos na reactividade, estabilidade e estrutura de vários sistemas biológicos faz com que o conhecimento das interacções de ligandos com catiões metálicos seja essencial para compreender os mecanismos de acção destes sistemas e, especialmente, a caracterização das interacções metal/ligandos, em solução, tem permitido prever a existência de equilíbrios simultâneos que parecem estar na base de processos biológicos específicos.[2]

Neste capítulo, após uma introdução geral sobre a parte da química médica que estuda as interacções de substâncias com acção terapêutica e em que são resumidas as propriedade físico-químicas que permitem relacionar a estrutura química de drogas com a sua actividade farmacológica e as interacções químicas mais usuais entre espécies de sistemas biológicos, é referida a acção terapêutica das 1,4-benzodiazepinas como drogas que actuam a nível do sistema nervoso central (SNC) e esboçados aspectos gerais sobre as interacções que parecem estar na base da sua actividade biológica, focando especialmente o papel do ácido γ-aminobutírico nessa actividade.

Como a presença de catiões metálicos, endógenos ou exógenos, pode influenciar as funções neuronais,[3] é feita uma descrição sucinta de algumas das funções conhecidas dos catiões metálicos utilizados na terceira parte deste trabalho com especial destaque para a sua possível relação com a acção terapêutica das 1,4 - benzodiazepinas.

1 Aspectos gerais sobre a acção de drogas

Droga: produtos de natureza animal, vegetal ou mineral empregues na preparação de medicamentos.

Fármaco: droga utilizada em Farmácia dotada de acção farmacológica ou, pelo menos, de interesse médico.

Medicamento: preparação farmacêutica contendo um ou mais fármacos, destinada ao diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças e seus sintomas.

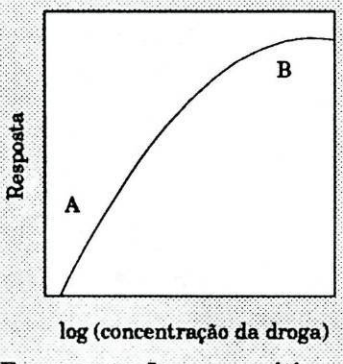
EMBORA A QUÍMICA MÉDICA SEJA UMA CIÊNCIA QUE PROCURA COMPREENDER E explicar o mecanismo de acção, a nível molecular, de todas as substâncias biologicamente activas, uma das suas actividades dominantes reside na compreensão do comportamento de substâncias com acção terapêutica (drogas) e na procura de relações estrutura/actividade que permitam explicar a sua acção biológica.[4-6]

A acção terapêutica, e eventualmente, a concepção de novas drogas começou por ser analisada apenas com base nas suas características físicas, mas desde o início deste século,[4] considera-se que o efeito de determinada droga só pode ser explicado com base numa interacção específica entre a droga e um componente celular específico – o receptor. Os recepto-

res são parte integrante de algumas macromoléculas biológicas, na maioria dos casos enzimas, ácidos nucléicos ou proteínas de membranas. As interacções droga/receptor dependem das características estruturais, conformacionais e configuracionais da droga e do receptor e a sua ocorrência dá origem a transformações químicas e conformacionais que provocam ou inibem reacções biológicas.

Independentemente do mecanismo de acção, o efeito da maioria das drogas tem um tempo limite de duração pelo que a reacção de formação de um complexo DR

$$D + R \rightleftharpoons DR \qquad (1.1)$$



Representação esquemática da resposta biológica em função da concentração de uma droga

onde D = droga, R = receptor, DR = complexo droga/receptor, é considerada reversível.[5] Este facto permite que as leis que governam o equilíbrio químico *in vitro* possam ser também aplicadas à reacção descrita pela equação 1.1. Então, como em qualquer reacção de equilíbrio, o aumento da concentração de um reagente desloca a reacção no sentido dos produtos (lei de acção das massas). Para sistemas biológicos prevê-se que o aumento da concentração de uma droga junto a um receptor aumente a sua resposta biológica. A resposta de um receptor a uma determinada concentração de droga é traduzida, de uma maneira geral, por uma curva *resposta biológica = f (concentração de droga)* e verifica-se que com o aumento da concentração da droga no receptor aumenta o número de interacções e o número de locais de coordenação ocupados até que todos os locais de possível coordenação droga/receptor sejam ocupados segundo a reacção representada na equação 1.1 (parte A da curva). Acima de uma dada concentração, que corresponde à saturação dos locais de coordenação do receptor, a resposta a um aumento de concentração deixa de se verificar (parte B da curva).

Como a acção de uma drogas está relacionada com todas as reacções de equilíbrio em que esta possa participar, não só com o receptor mas também com outras substâncias que façam parte do fluído biológico que a rodeia, a droga vai estar sujeita a vários processos metabólicos e de excrecção o que faz com que a sua concentração efectiva no receptor dependa também do meio que a rodeia.

1.1 Parâmetros físico-químicos e actividade farmacológica

O RECONHECIMENTO DE QUE A RESPOSTA BIOLÓGICA À ACÇÃO DE DROGAS É FUNÇÃO da estrutura química destas últimas, data do fim do século XIX, mas dada a complexidade das relações estrutura/actividade só actualmente é que estes estudos têm sido intensificados, numa tentativa de se obterem drogas mais específicas, mais potentes e menos efeitos secundários.[4,7,8] As drogas são substâncias químicas com propriedades fisico-químicas e/ou estruturais que provocam uma acção farmacológica e podem ser, de uma maneira geral, divididas em

- drogas sem estrutura específica cuja acção biológica só depende da sua estrutura química pelas propriedades físico-químicas que lhe estão inerentes como a solubilidade, o grau de ionização, o potencial de oxidação/redução e capacidade coordenador, ou
- drogas estruturalmente específicas cuja estrutura química lhe confere a reactividade química, a estereoquímica e a distribuição electrónica que, conjuntamente com as suas propriedades fisico-químicas, são a base da sua acção terapêutica.

Numa tentativa de entender a relação estrutura/propriedades químicas/actividade farmacológica de uma droga, têm sido deduzidas vári-

as equações matemáticas que incluem parâmetros que traduzem as propriedades físico-químicas dessas drogas. Vários parâmetros têm sido utilizados, mas considera-se que, genericamente, podem ser divididos em quatro categorias.[4]

Parâmetros de solubilidade

Estes parâmetros medem a interacção entre as drogas e as regiões hidrofóbicas de macromoléculas e estão relacionados, por um lado, com o transporte das drogas desde a sua administração até ao seu local de acção e, por outro, com a possibilidade de existirem interacções entre as regiões hidrofóbicas das drogas e dos receptores. Os parâmetros mais utilizados são os coeficientes de partição, a constante de hidrofobicidade, a solubilidade, a tensão superficial, a polarizabilidade e a densidade electrónica.

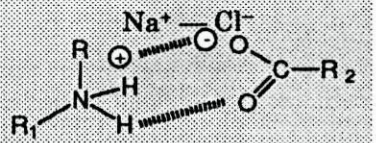
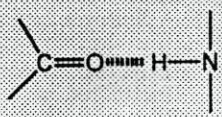
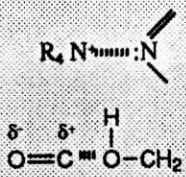
Parâmetros empíricos

A actividade biológica da maior parte das drogas depende do seu grau de ionização, não só pelo facto de umas actuarem na forma neutra e outras na forma ionizada, mas também porque o seu transporte através de membranas depende da sua lipossolubilidade que é afectada pelo pH do meio o que por sua vez afecta o grau de ionização das drogas. Os parâmetros denominados por Korolkovas[4] por parâmetros electrónicos empíricos, são constantes que medem o efeito electrónico de um substituinte na variação de energia duma reacção química e/ou duma interacção droga/receptor e estão directamente relacionados com as propriedades ácido/base de drogas através do seu pK_a e do seu grau de ionização.

Parâmetros electrónicos

Como uma grande maioria das drogas são substâncias com sistemas π deslocalizados e estes são muitas vezes os responsáveis pela sua actividade farmacológica utilizam-se parâmetros que traduzem o carácter dador ou aceitador π, o potencial de ionização, as energias de transferência de

Tabela 1.1 Interacções não covalentes importantes em sistemas biológicos (adaptado da ref. 5)

Interacção	Energia de Ligação ($Kcalmol^{-1}$)	Dependência com a distância	Exemplo
Iónica	5	$1/r$	
Iónica reforçada	10	—	
Hidrogénio	1-7	—	
Ião dipolar	1-7	$1/r^2$	
Dipolo—dipolo	1-7	$1/r^3$	
van der Waals	0,5-1	$1/r^6$	

carga e a energia de ressonância de drogas nas expressões matemáticas que vão ser utilizadas para tentar interpretar a correlação estrutura/propriedades químicas/actividade farmacológica de drogas

EFEITOS ESTEREOQUÍMICOS

Os parâmetros estereoquímicos tentam traduzir a contribuição geométrica e do tamanho de um substituinte numa droga e medir o efeito estereoquímico intramolecular. Estes parâmetros são bastante importantes pois muitas interacções droga–receptor são esteroespecíficas.

1.2 Actividade biológica e interacções químicas

Não existe nenhuma correlação directa entre a energia de uma interacção química e actividade biológica, no entanto, a partir do modelo proposto para a interacção droga/receptor é possível estimar a energia das interacções que parecem promover a actividade biológica num determinado sistema utilizando valores médios para os diferentes modos de interacção (Tabela 1.1), pois, em termos moleculares, a actividade das drogas está relacionada com o tipo de associações que podem ocorrer entre droga/receptor e entre a droga e as outras substâncias que compõem os fluídos biológicos. A maioria destas interacções tem um carácter iónico, dipolar ou apolar embora por vezes sejam verificadas interacções covalentes.[5-7,9]

Ligações covalentes

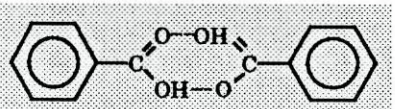
Por vezes a interacção droga/receptor é acompanhada do estabelecimento de ligações covalentes, mas a ruptura espontânea deste tipo de ligações, nas condições fisiológicas do corpo humano, só ocorre através de catálise enzimática e como tal, estas drogas têm um efeito farmacológico prolongado e por vezes actuam de uma maneira irreversível. Em algumas situações o efeito prolongado pode ser necessário, como por exemplo no tratamento de uma doença crónica ou de uma infecção de parasitas, contudo, felizmente a maioria das drogas actua de uma maneira reversível actuando através de interacções não covalentes.

Ligações não covalentes

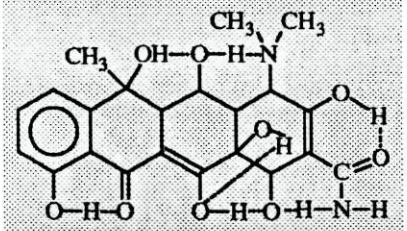
Embora sejam relativamente fracas, as interacções não covalentes têm uma enorme influência na acção de drogas, pois na maioria das interacções droga/receptor há a formação simultânea de inúmeras interacções não covalentes e é esta sinergia que provoca a actividade biológica. Por exemplo, a interacção da epinefrina com o receptor-α do sistema nervoso adrenérgico que permite regular a pressão sanguínea ocorre devido à exis-

tência simultânea de ligações iónicas, dipolo-dipolo e de van der Waals entre a epinefrina e o receptor.

Como a formação de ligacões intermoleculares entre o receptor e a droga ocorre através de interacções não covalentes, estas vão depender da distância entre os centros de atracção (Tabela 1.1) e é postulado[5] que à medida que a droga se aproxima do receptor vai aumentando o número de interacções simultâneas possíveis: primeiro formar-se-ão interacções iónicas, depois dipolares e finalmente interacções do tipo van der Waals. De referir que esta dependência do tipo de interacção com a distância é marcadamente influenciada pelos requisitos estereoquímicos do receptor e da droga, o que reflete a importância decisiva dos factores estereoquímicos na actividade biológica de fármacos.



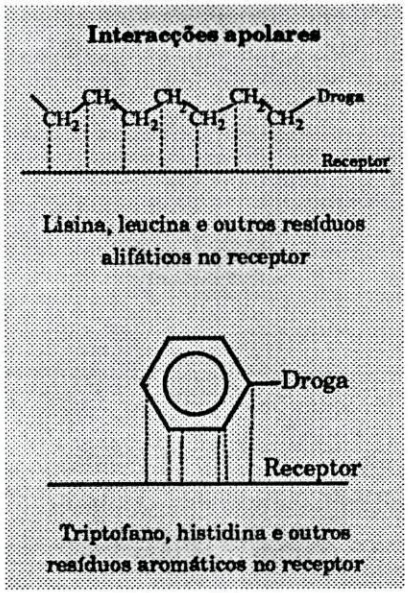
Ligação de hidrogénio intermolecular



Ligação de hidrogénio intramolecular

A estrutura de substâncias como a água, o DNA, as proteínas e várias drogas está directamente relacionada com as numerosas ligações de hidrogénio que nelas ocorrem, pelo que este tipo de interacções tem uma importância decisiva na actividade biológica. As ligações de hidrogénio mais frequentes em sistemas biológicos ocorrem entre o grupo hidroxílico e o grupo amina e podem ser ligações inter ou intramoleculares (exemplos em anexo) observando-se a seguinte ordem de estabilidade para essas ligações O–H···N > O–H···O > N–H···N ≈ N–H···O . Este tipo de ligações está na base de muitas das interacções droga–receptor e droga-componentes dos fluídos biológicos dada a existência de inúmeras espécies biológicas (aminoácidos, bases nucléicas, neurotransmissores, hormonas, etc) com grupos específicos dadores/aceitadores de protões e de drogas com estas mesmas características.

Drogas, iónicas ou dipolares, têm uma maior solubilidade em água e, muitas vezes, o seu transporte através de membranas é dificultado



ou mesmo impossível. Como tal, a maioria das substâncias com acção terapêutica contêm uma mistura de grupos polares e apolares para permitir uma actividade biológica mais eficaz. As interacções entre os grupos apolares são do tipo van der Waals principalmente interacções dipolo induzido–dipolo induzido (forças de dispersão de London) e verifica-se que drogas que contenham cadeias laterais com anéis aromáticos ou com cadeias hidrocarbonadas interactuam com grupos semelhantes nos receptores ou nos fluídos biológicos, através deste tipo de interacções. Embora alguns estudos *in vitro*, pareçam mostrar que ocorrem preferencialmente interacções resíduo aromático–resíduo aromático ou cadeia linear alifática–cadeia linear alifática as interacções resíduo aromático–cadeia linear alifática ocorrem em alguns fluídos biológicos. Dada a quantidade de grupos aromáticos e alifáticos em drogas e em biomoléculas é de esperar que as forças de London tenham um papel importante nas interacções droga/receptor, sendo intensificado na presença de ligações hidrofóbicas.

Interacções hidrofóbicas

As interacções hidrofóbicas serão talvez as mais importantes para determinar o efeito terapêutico de muitas drogas.[5,6,10] A energia deste tipo de interacções não está directamente relacionada com a energia de ligação entre dois resíduos hidrofóbicos, mas com o ganho de entropia do sistema. A formação de interacções hidrofóbicas advém da capacidade que as moléculas apolares têm em se agregar em solução aquosa, pois esta agregação provoca a libertação de moléculas de água o que faz aumentar a entropia do sistema e consequentemente diminuir a função de Gibbs correspondente. Esta proximidade dos resíduos hidrofóbicos torna possível a ocorrência de interacções dipolo induzido–dipolo induzido, e faz com que este tipo de interacções seja um factor importante na actividade biológica de várias drogas. A existência de ligações hidrofóbicas nas interacções droga/receptor está esquematizada na Figura 1.1 e tem sido postulado[5] que é apenas

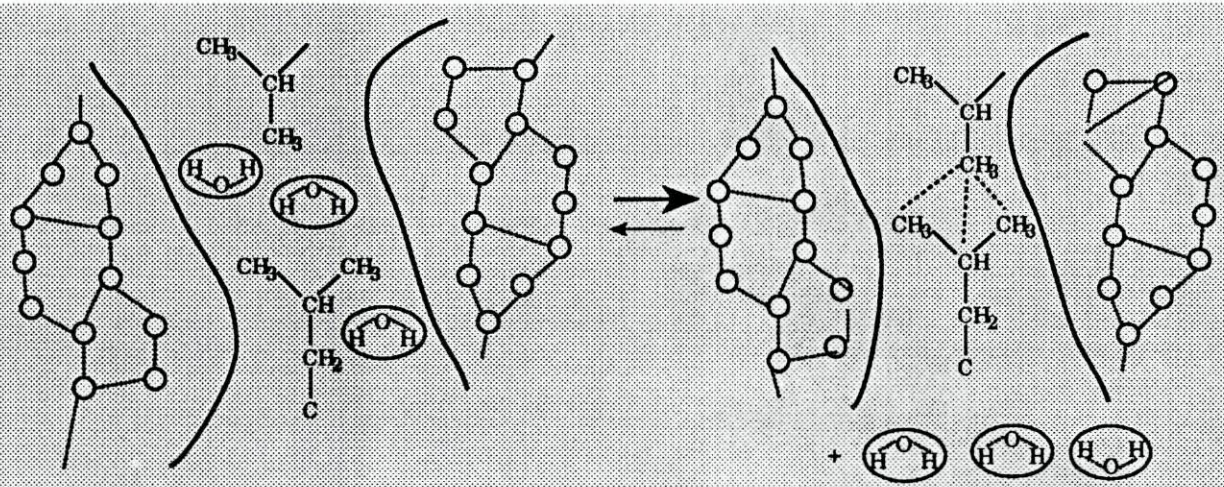


Figura 1.1 **Esquema de uma possível interacção hidrofóbica entre fragmentos que contém os grupos isopropilo e isopentilo**

pela libertação de moléculas de água que é possível a existência deste tipo de interacções entre resíduos não polares.

A existência de metais vestigiais na maioria dos fluídos biológicos faz prever que as interacções metal–droga, metal–receptor ou metal–droga–receptor, tenham uma importância significativa no modo de acção de várias drogas e como tal a quantificação das interacções metal/ligando com relevância biológica pode permitir a compreensão do modo de acção e da actividade de drogas, por isso a especiação de metais vestigiais em sistemas biológicos tornou-se actualmente uma área importante na química médica.[11]

2 Drogas que actuam no SNC: 1,4-benzodiazepinas

Neurotransmissores

Substâncias químicas que se encontram armazenadas nas sinapses das células nervosas e cuja libertação, provocada pelo potencial de acção (impulso eléctrico) do neurónio anterior, estimula a produção de um impulso eléctrico nas várias células nervosas adjacentes

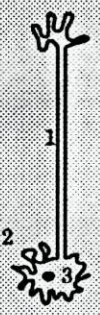
PARA SE COMPREENDER O FUNCIONAMENTO DAS DROGAS QUE ACTUAM A NÍVEL DO sistema nervoso central é necessário ter uma ideia geral da estrutura e funcionamento das células nervosas. Assim, antes de se descrever o modo de acção proposto[12,13] para as 1,4-benzodiazepinas faz-se uma breve descrição da estrutura e funcionamento das células nervosas, neurónios, e da importância dos neurotransmissores no seu funcionamento focando, mais pormenorizadamente o funcionamento do neurotransmissor GABA (ácido γ-aminobutírico) dada a sua interligação com o modo de acção destas substâncias.

Componentes básicos de um neurónio

1 Axónio: conduz os impulsos eléctricos desde o corpo da célula até à sinapse.

2 Membrana denditrica: recebe os impulsos químicos e transmitios ao corpo da célula

3 Corpo de célula: recebe um conjunto de impulsos químicos e transforma-os num único sinal eléctrico

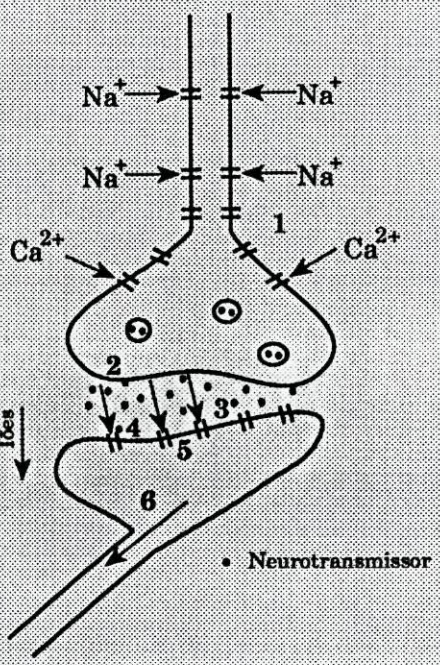


As células nervosas embora tenham uma estrutura diferente consoante a sua localização no sistema nervoso têm todas os mesmos componentes básicos (ver anexo): axónio, membrana denditrica e corpo celular (núcleo). Todos estes componentes estão rodeados por uma membrana composta por uma camada semi-permeável de lipoproteínas, que é apenas permeável a iões, sendo a célula nervosa composta por uma solução coloidal de lipoproteínas contendo uma grande porção de água onde se encontram várias substância dissolvidas (glucose, sais, oxigénio, dióxido de carbono, etc...). Devido à diferente permeabilidade da membrana aos vários iões (K^+, Na^+, Ca^{2+},Cl^-, HCO_3^-, etc) a composição dos sais no interior e no exterior da membrana é diferente o que faz com que a membrana neuronal, no seu estado de repouso, esteja polarizada, sendo o seu interior mais negativo do que o seu exterior o que dá origem ao chamado potencial de repouso.[4,14]

Quando um estimulo exógeno atinge um neurónio a sua actividade eléctrica é alterada gerando um impulso eléctrico, o chamado potencial

de acção. A transmissão intraneuronal faz-se apenas através de processos eléctricos, mas a transmissão interneuronal é um processo químico. O termo sinapse é utilizado para descrever esta transmissão interneuronal e considera-se como sinapse o conjunto da membrana pré-sináptica, a fenda sináptica e a membrana pós-sináptica. Esta transmissão sináptica envolve a transferência de energia da membrana dendítrica para a célula nervosa adjacente, ou seja, entre o neurónio pré-sináptico e o neurónio pós-sináptico através da fenda sináptica (Figura 1.2). A despolarização da membrana, provocada pelo estímulo exógeno percorre o axónio e faz com que uma determinada quantidade de neurotransmissor seja libertado da membrana pré-sináptica para a fenda sináptica e interactue com receptores da membrana pós-sináptica. Esta interacçcão provoca alterações conformacionais nas moléculas da membrana o que por sua vez faz variar a permeabilidade iónica da membrana e consequentemente o seu potencial. Após esta interacção o neurotransmissor é removido ou por "uptake" activo ou através da sua destruição por desactivação metabólica (ver Figura 1.2).

É através de interacções com os receptores sinápticos que as drogas que actuam a nível do sistema nervoso promovem a sua acção biológica. Esta acção pode ser devida a: a) interacção com autoreceptores, receptores que controlam a produção de neurotransmissores, inibindo a produção e libertação de neurotrasmissores; b) interacção com receptores da membrana pós-sináptica o que influencia a formação do novo impulso eléctrico; c) destruição das enzimas que degradam as moléculas de neurotransmissores provocando um aumento da sua concentração. A actividade biológica das drogas que actuam a nível do sistema nervoso é pois obtida por alteração do funcionamento de neurotransmissores. Na Tabela 1.2 encontram-se indicados alguns dos neurotransmissores mais comuns, a sua localização e função bem como alguns tipos de drogas que afectam a sua função.



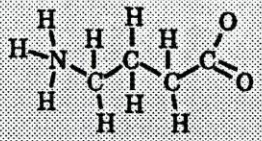
Quando o potencial de acção atravessa o axónio pré-sináptico (1) ocorre a sua excitação o que se traduz por um aumento de permeabilidade a catiões, (2) estimulando a libertação de neurotransmissores que é o resultado de pequenas variações na composição da membrana produzidas pela estimulação eléctrica. Após a sua libertação na fenda sináptica, (3) algumas moléculas atingem a membrana pós-sináptica e interactuam com receptores específicos(4). Esta interacção provoca uma variação na permeabilidade da membrana (traduzida por alteração na carga eléctrica da membrana pós-sináptica) que consoante o tipo de neurotransmissor pode ser excitatória ou inibitória. Excitatória se a carga eléctrica diminuir (entrada de iões positivos, despolarização sináptica) e inibitória quando a sua permeabilidade está limitada aos iões K^+ e Cl^-, havendo a deslocação de Cl^- para o interior da membrana e de K^+ no sentido inverso traduzindo uma aumento de carga positiva no exterior da membrana (5) e (6). Este último fenómeno ee desigando por hiperpolarização sináptica (saída de iões positivos) e este tipo de sinapses impede a despolarização da membrana o que impede a iniciação dos impulsos.

Figura 1.2 **Representação esquemática da função das sinapses.**[4,14]

Tabela 1.2 Neurotransmissores: localização, funções e efeitos e exemplo de drogas que os afectam[14]

Neurotransmissor	Droga	Localização	Função e efeito
Acetilcolina	Nicotina	Cérebro e sistema nervoso parasimpático	Excitação do cérebro Afecta a memória
Norepinefrina	Anfetamina	Cérebro e sistema nervoso simpático	Inibição no cérebro Regula a resposta emocional
Dopamina	Anfetamina	Cérebro	Inibição
Serotonina	Antidepressivos	Cérebro	Inibição Afecta o sono e o humor
Histamina	Antipsicóticos	Cérebro e sistema nervoso periférico	Afecta as emoções e a temperatura do corpo
GABA	Sedativos/Hipnóticos	Cérebro	Inibição Afecta as emoções

GABA



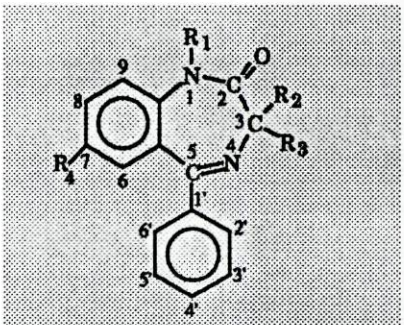
Ácido γ - amino butírico

O GABA é um aminoácido detectado apenas em tecidos do SNC de vertebrados e que se forma a partir do ácido glutâmico através de uma reacção catalizada pela enzima descarboxilase de ácido glutâmico [5,6,14,15] e parece estar envolvido na regulação de mecanismos cardiovasculares, na regulação de funções endócrinas, na sensação de dor e na ansiedade. O estudo do seu modo de acção foi intensificado por se ter verificado que as benzodiazepinas, agentes ansiolíticos, actuam no sistema neuronal GABAérgico. Tal como outros neurotransmissores, encontra-se armazenado nos terminais das células nervosas sendo libertado por um processo que

depende da concentração de catião cálcio após despolarização da membrana. A sua actividade neuronal parece estar associada a dois mecanismos inibitórios diferentes: a) despolarização pré-sináptica (entrada de iões positivos) de um neurónio excitado, o que causa uma diminuição da libertação do neurotransmissor quando este neurónio recebe um impulso eléctrico; ou b) hiperpolarização (saída de iões positivos) de um neurónio excitado por diminuição do fluxo de anião cloreto, o que torna o neurónio inactivo quando recebe um impulso normal. É este segundo mecanismo que parece estar associado à acção das benzodiazepinas.[12,16]

Benzodiazepinas

A primeira benzodiazepina a ser comercializada foi o *clorodiazepóxido* (Librium) em 1960 e que se tornou rapidamente a droga mais receitada nos Estados Unidos dado os reduzidos efeitos secundários que a sua utilização provocava. Nos anos setenta apareceu uma nova benzodiazepina o *diazepam* (Valium) que dadas as suas propriedades ansiolíticas, relaxantes musculares e anticonvulsantes rapidamente destronou o clorodiazepóxido. Sternbach *et. al.*[17] verificaram que compostos com a estrutura geral representada em anexo (5–fenil–1,4–benzodiazepina-2-ona), drogas que actuam a nível do sistema nervoso central (SNC) e que fazem parte dos chamados agentes ansiolíticos, devem a sua actividade biológica à presença do anel de sete lados e à presença de substituintes nas posições 1, 2, 3 e 7 e que a existência de substituintes electronegativos nas posições 2 e 7 aumentavam fortemente esta actividade.



5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona

Considera-se actualmente que o mecanismo molecular de acção das benzodiazepinas faz aumentar a frequência de abertura dos canais de ião cloreto (mas não o seu tempo de abertura) que respondem ao GABA: a sua resposta ao GABA na presença de benzodiazepinas é idêntica à resposta obtida na presença de uma maior concentração de GABA na ausência de

benzodiazepinas. Verificou-se, utilizando marcação isotópica, que as benzodiazepinas actuavam no SNC nas sinápses GABAérgicas e que o GABA modula a sua interacção com receptores.[5] Posteriormente, verificou-se que a presença das benzodiazepinas faz aumentar a interacção GABA/receptor e por sua vez a presença de GABA faz aumentar as interacções benzodiazepina–receptor o que parece indicar uma relação directa entre o funcionamento dos receptores do GABA e dos receptores das benzodiazepinas. A acção das benzodiazepinas parece estar associada à abertura dos canais de anião cloreto, isto é, as benzodiazepinas parecem interactuar com os receptores do sistema GABAérgico fazendo aumentar o fluxo de iões cloreto. No entanto, há também alguns estudos que sugerem que alguns dos receptores GABA e locais de coordenação de benzodiazepinas regulam, também, canais de catiões existentes nas membranas celulares e que a presença de determinados catiões metálicos faz aumentar a interacção benzodiazepina/receptor.[18,19,20]

3 Metais e sua actividade biológica no SNC

O PAPEL DE COMPLEXOS DE IÕES METÁLICOS EM PROCESSOS BIOLÓGICOS É ACTUALmente bem conhecido e embora ainda não sejam compreendidos todos os mecanismos através dos quais eles exercem a sua acção biológica é possível já esquematizar algumas características gerais que lhe estão associadas (Tabela 1.3).[21] Os catiões metálicos mais leves, K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, têm uma bioquímica relacionada com a formação de ligações iónicas, interacções electrostáticas e desempenham funções relacionadas com, balanços de cargas interfacial, com o controlo de tipo hormonal ou de impulso eléctrico, e com aspectos estruturais a nível molecular (formação de pontes intramoleculares entre grupos carboxílicos em proteínas) e a nível macroscópico (formação da estrutura óssea). Os restantes catiões actuam

Tabela 1.3 **Algumas características gerais de complexos de iões metálicos presentes nos sistemas biológicos (adaptada ref. 21)**

	Metal			
Características	**Na, K**	**Ca, Mg**	**Zn, Ni**	**Fe, Cu, Co, Mo, Mn**
Estado oxidação predominante	+1	+2	+2	mais de um estado de oxidação
Estabilidade termodinâmica dos complexos	baixa	baixa/ intermédia	elevada	elevada
Atomos dadores preferenciais	oxigénio	oxigénio	azoto (Zn e Ni) enxofre (Ni)	azoto, enxofre e oxigénio
Mobilidade no meio biológico	elevada	intermédia	nula/ intermédia	nula/ intermédia

sobretudo através da coordenação a ligandos biológicos, e um dos seus papéis mais importante é desempenhado nos centros activos das enzimas na catálise de reacções orgânicas.

Além dos catiões metálicos mais leves, alguns catiões metálicos de Cu, Zn, Fe, Mn e Co parecem ser necessários para um bom funcionamento do SNC. A sua actividade neuroquímica está muitas vezes associada a proteínas que catalizam reacções enzimáticas e a uma dependência dos neurotransmissores destas enzimas. Contudo, muito pouco se sabe sobre o mecanismo através do qual estes elementos atingem o cérebro e sobre o seu posterior funcionamento. A reduzida permeabilidade da barreira hemato-encefálica a estes metais pressupõe a existência de transportado-

res específicos para a sua penetração no cérebro, o que faz prever que uma variabilidade nas suas concentrações origine respostas dinâmicas completamente diferentes das conhecidas para os catiões mais leves que podem atravessar mais livremente essa barreira.

Neste trabalho foram utilizados os catiões metálicos níquel(II), cobre(II) e zinco(II), devido à sua possível influência no mecanismo de acção das benzodiazepinas,[21,22] e ao crescente interesse da sua acção a nível do sistema nervoso central.[3] As interacções do catião cádmio(II) foram também, estudadas pois o seu carácter tóxico pode provir, muitas vezes da sua interacção com locais coordenadores do catião zinco(II) o que alterará, no geral as respostas biológicas associadas à acção deste último catião metálico.

NÍQUEL

O papel deste catião metálico nos sistemas biológicos ainda não é totalmente conhecido, no entanto, sabe-se que a sua presença é fundamental no desenvolvimento de cobaias e que a sua supressão provoca uma deficiência de ferro e reduz os níveis de hemoglobina. A sua actividade a nível humano parece estar apenas associada a uma única enzima, a urease.[23,24] A nível do SNC não lhe são conhecidas propriedades específicas, contudo estudos *in vitro* mostram que a sua concentração altera a interacção benzodiazepinas–GABA–receptor.[21,22] A ocorrência desde catião metálico em sistemas biológicos parece estar associada à sua coordenação a tiolatos.[22]

COBRE

O cobre ocorre em solução na forma de Cu(II) e de Cu(I), sendo este último facilmente oxidável desde que se encontre livre. Assim, como é de esperarar, o seu principal papel está associado a sistemas biológicos de transferência electrónica. Há várias enzimas de cobre que estão envolvidas

em vários processos biológicos como o transporte de electrões efectuado pelas proteínas azuis de cobre e algumas das reacções em que estão envolvidas utilizam potenciais de oxidação/ redução elevados o que requer que o seu local de acção e a sua geometria sejam tais que permitam reacções rápidas e de elevado potencial oxido/redutor.[23,24] A nível do SNC sabe-se que o cobre, a) intervem no metabolismo do oxigénio facilitando a transferência de electrões e regularizando os seus níveis, b) parece estar associado ao mecanismo de síntese da norepinefrina e c) a sua deficiência provoca alterações a nível da coordenação motora e do comportamento.[3] Estudos *in vitro* mostram que a sua concentração, tal como no caso do níquel, altera a interacção benzodiazepinas–GABA–receptor.[21,22]

Zinco

A principal função deste metal em sistemas biológicos está associada ao controlo do mecanismo de regulação de pH[3]. Existem, também, várias metaloenzimas de zinco e várias enzimas que são por ele activadas.[25] A nível do SNC estão-lhe associadas duas funções: uma relativa ao metabolismo de oxidação cerebral, não de uma maneira directa mas através da síntese de lípidos; a outra a um mecanismo ainda desconhecido mas relacionado com a perturbação que induz nas respostas neurológicas de vários neurotransmissores.[3,26-29] Tal como para os outros dois catiões metálicos, estudos *in vitro* mostram que a sua concentração, altera a interacção benzodiazepinas–GABA–receptor.[21,22]

Cádmio

Sendo considerado um catião macio, apresenta grande tendência para se ligar a átomos de enxofre e secundariamente a átomos de azoto, originando preferencialmente complexos octraédricos. Este catião é prejudicial para o bom funcionamento celular, sobretudo devido ao facto de poder substituir o catião zinco(II) em várias enzimas ou noutras biomoléculas com alteração significativa do processo biológico normal a elas associado.[3]

Verifica-se, por exemplo, que este catião pode coordenar à carboxipeptidase de um modo análogo ao do zinco(II), mas como não preserva uma geometria de coordenação tetraédrica torna-a inactiva. Do mesmo modo, este catião compete favoravelmente com o catião zinco(II) na coordenação à metionina desregulando o metabolismo deste último aminoácido.[30] Alguns estudos recentes mostram que a temperatura do corpo é alterada pela administração de metais pesados e que esta alteração advém da acção destes metais a nível do SNC. Estudos efectuados com o catião cádmio mostram que a sua administração em doses controladas permite a diminuição da temperatura do corpo e que esta é provocada pela concentração deste catião no SNC. Supõe-se ainda, que esta afecta a libertação de neurotransmissores.

INTERACÇÕES METAL/LIGANDO

A extrema selectividade das biomoléculas ao catião metálico que utilizam num determinado processo biológico pode ser considerada, numa primeira aproximação, devidas às propriedades de equilíbrio químico das interacções metal/ligando em solução. A sua acção será função das constantes de formação metal/ligando que poderão ocorrer num determinado meio biológico. Estas interacções vão depender da estrutura e das propriedades dadoras do ligando, da sua maior ou menor afinidade para determinado ião metálico de acordo com teoria de ácido/base de Pearson, da geometria de coordenação do catião metálico e do seu estado de spin. Assim sendo, a compreensão do mecanismo de funcionamento de catiões metálicos em sistemas biológicos dependerá, numa primeira fase, dos conhecimento que se possa ter, ou obter, sobre a sua interacção em solução com ligandos biológicos.[23]

Há vários estudos efectuados sobre a interacção em solução de catiões metálicos com aminoácidos e nucleotídeos e/ou nucleosídeos e até

mesmo entre algumas substâncias com acção terapêutica, como antibióticos[32] e anti-histamínicos.[33] Dado ser possível que a acção terapêutica das benzodiazepinas esteja associada à presença de catiões metálicos,[21,22] será importante obter alguma informação sobre o seu comportamento como ligandos e embora tenham aparecido ultimamente algumas publicações científicas sobre a preparação e caracterização de compostos metal/benzodiazepina,[34,35-41] são escassos os estudos efectuados sobre as propriedade coordenadoras destes ligandos em solução.[42,43]

Assim sendo, neste trabalho tentou-se caracterizar as possíveis interacções em solução de três 1,4-benzodiazepinas, cuja principal diferença reside nos substituintes do carbono C–2, diazepam, medazepam e clorodiazepóxido, com os catiões metálicos já mencionados e também com o GABA, o neurotransmissor que parece estar associado ao seu mecanismo de acção.

Capítulo

2 Equilíbrio em Solução: Aspectos Termodinâmicos

NESTE CAPÍTULO É APRESENTADA A DEFINIÇÃO DE CONSTANTE DE EQUILÍBRIO TERmodinâmica para soluções reais e são esboçadas as considerações extratermodinâmicas necessárias para avaliar o significado do valor associado a uma constante de equilíbrio obtida experimentalmente em condições bem definidas, não só em solução aquosa como também em soluções mistas água/solvente orgânico.

1 Sistemas químicos em solução

A CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS QUÍMICOS EM SOLUÇÃO REQUER O CONHECIMENTO da natureza das espécies presentes em solução e das suas concentrações e, também, das características dinâmicas do equilíbrio em solução para o sistema em estudo.

O estado de equilíbrio de um sistema mantido a pressão e temperatura constantes corresponde a um mínimo da função de Gibbs. Qualquer alteração na composição de um sistema em equilíbrio ou para sistemas que não estejam em equilíbrio ocorrem reacções que levam o sis-

tema a atingir o mínimo da função de Gibbs. Assim, o sentido em que as reacções químicas vão ocorrer é determinado pela contribuição para a função de Gibbs de cada uma das espécies que compõem o sistema.

EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO

Os símbolos e a terminologia usados neste trabalho são os recomendados pela IUPAC na sua publicação International Union of Pure and Applied Chemistry; Physical Chemistry Division. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*., 2ª ed.,Blackwell Scientific: Oxónia, 1993.

Para a reacção química representada pela equação generalizada

$$\sum \nu_i M_i = 0 \tag{2.1}$$

em que υ_i é o coeficiente estequiométrico e M_i o símbolo químico da espécie i, pode demonstrar-se que a condição de equilíbrio é[44,45]

$$\sum \nu_i \mu_i = 0 \tag{2.2}$$

sendo μ_i o potencial químico da espécie i.

Para soluções ideais o potencial químico (função de Gibbs parcial molar) da espécie i é definido por

$$\mu_i = \mu^o_{x,i} + RT \ln x_i \tag{2.3}$$

em que x_i é a fracção molar da espécie i, R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta e $\mu^o_{x,i}$ o potencial químico padrão definido como o potencial químico para o componente puro ($x_i = 1$).

Para soluções reais a prática comum consiste em definir um parâmetro que quando multiplicado pela fracção molar do componente i da solução permita utilizar uma expressão formalmente semelhante à equação 2.3. Define-se assim o coeficiente de actividade da espécie i, $\gamma_{x,i}$, por forma a que a expressão

$$\mu_i = \mu^o_{x,i} + RT \ln \gamma_{x,i} x_i \tag{2.4}$$

seja aplicável, qualquer que seja o afastamento de comportamento ideal. Nesta equação $\mu^o_{x,i}$ é apenas função da pressão e da temperatura, enquanto que $\gamma_{x,i}$ é função não só destas variáveis, mas também da fracção molar de todas as outras espécies em solução.

A equação 2.4 não permite definir completamente $\gamma_{x,i}$, já que $\mu^o_{x,i}$ também não é conhecido: ambas as grandezas ficam definidas quando são especificadas as condições em que γ_i é igual à unidade.[46]

O produto do coeficiente de actividade $\gamma_{x,i}$ pela fracção molar x_i é usualmente designado por actividade da espécie i em solução, $a_{x,i}$

$$a_{x,i} = \gamma_{x,i}\, x_i \tag{2.5}$$

Obviamente, que os valores dos coeficientes de actividade e as próprias actividades terão valores diferentes nas três escalas apresentadas.
Da mesma forma, os valores dos potenciais químicos padrão também terão valores diferentes nas diferentes escalas de concentração.

e é usual definir expressões semelhantes para outras escalas de concentração, podendo escrever-se

$$a_{m,i} = \gamma_{m,i}\, m_i \tag{2.6}$$

para concentrações expressas em molalidade, enquanto que para a escala de molaridade (actualmente designado por escala de concentração) se terá

$$a_{c,i} = \gamma_{c,i}\, c_i \tag{2.7}$$

A partir destas definições é possível definir *estado padrão* da espécie i como o estado do sistema para o qual a actividade de i é unitária. É importante referir que equações formalmente semelhantes à equação 2.4 podem ser obtidas para as escalas de concentração atrás referidas recorrendo às equações 2.6 ou 2.7, assim para a escala de molalidade virá

$$\mu_i = \mu^o_{m,i} + RT \ln \gamma_{m,i}\, m_i \tag{2.8}$$

enquanto que para a escala de molaridade se terá

$$\mu_i = \mu^o_{c,i} + RT \ln \gamma_{c,i}\, c_i \tag{2.9}$$

Esta última expressão (o mesmo é aplicável a 2.4 e a 2.8) pode ser escrita separando os termos do argumento da função logaritmíca, obtendo-se

$$\mu_i = \mu^o_{c,i} + RT \ln \gamma_{c,i} + RT \ln c_i \tag{2.10}$$

ESTADO DE REFERÊNCIA

O *estado de referência* da espécie i numa solução é definido como o estado do sistema em que o coeficiente de actividade da espécie i é unitário. É evidente da definição e da equação 2.10 que a diferença de energia $(\mu_i - \mu^o_{c,i})$ é determinada quando se define o estado de referência. A determinação do potencial químico padrão requer o conhecimento de γ_i e de c_i, isto é, do estado padrão.[46]

Embora toda a informação termodinâmica sobre um sistema em equilíbrio químico esteja contida na equação 2.2, é usual, para tornar mais conveniente essa informação, caracterizar o equilíbrio através da definição de constantes de equilíbrio. Assim, da equação 2.2 e 2.9 obtem-se

$$\sum_i \nu_i \mu^o_{c,i} + RT \sum_i \nu_i \ln \gamma_{c,i} c_i = 0 \qquad (2.11)$$

que após rearranjo dá

$$-RT \ln \prod_i \left(\gamma_{c,i} c_i\right)^{\nu_i} = \sum_i \nu_i \mu^o_{c,i} \qquad (2.12)$$

ou $$-RT \ln K = \Delta G^o_T \qquad (2.13)$$

em que $$K = \prod_i \left(\gamma_{c,i} c_i\right)^{\nu_i} \qquad (2.14)$$

e $$\Delta G^o_T = \sum_i \nu_i \mu^o_{c,i} \qquad (2.15)$$

A equação 2.14 define assim a constante de equilíbrio termodinâmica associada à reacção descrita pela equação generalizada 2.1. A constante de equilíbrio pode ser expressa pela equação

$$K = \prod_i \left(\gamma_{c,i}\right)^{\nu_i} \cdot \prod_i \left(c_i\right)^{\nu_i} \qquad (2.16)$$

ou, se $$K_\gamma = \prod_i \left(\gamma_{c,i}\right)^{\nu_i} \qquad (2.17)$$

e $$K_c = \prod_i \left(c_i\right)^{\nu_i} \qquad (2.18)$$

virá $$K = K_\gamma K_c \qquad (2.19)$$

O coeficiente de actividade é um parâmetro definido empiricamente através da equação 2.4 e que fornece uma medida da não idealidade das soluções resultante de interacções entre as partículas em solução. Os coeficientes de actividade podem ser interpretados como uma contribuição para a função de Gibbs (equação 2.10) e, neste sentido, tem um significado idêntico ao de uma concentração. (J. E. Gordon, *The Organic Chemistry of Electrolyte Solutions, Wiley, New York, 1975, Ch.1)*

Nesta última equação K_c designa-se por constante de equilíbrio estequiométrica ou quociente de concentrações; obviamente que quando todas as espécies *i* estão no estado de referência, vem $K=K_c$.

O objectivo do estudo experimental de constantes de equilíbrio é o de obter, para pressão e temperatura bem definidas, uma verdadeira constante. A constante de equilíbrio termodinâmica, *K*, obedece a esta imposição, pois as actividades foram definidas de modo a que *K* seja sempre constante.[46,47] No entanto, a maioria das técnicas analíticas utilizadas na obtenção de constantes de equilíbrio mede concentrações o que permite apenas determinar a constante estequeométrica, K_c; o problema reside, pois, na obtenção de K_g, ou por outras palavras, na definição do estado de referência, que se assume o mesmo para todos os solutos. De entre as várias definições possíveis, irão ser a seguir descritas três das mais vulgarmente utilizadas.

Escolha do estado de referência

Define-se como estado de referência uma solução infinitamente diluída, dado que neste caso as interacções entre solutos em solução, e consequentemente os desvios da idealidade são nulos. Na prática, considera-se que para concentrações de solutos inferiores a 10^{-4} *M* os desvios da idealidade não são significativos. Existem diversas maneiras operacionais para a determinação de constantes de equilíbrio. Para soluções em que ocorram equilíbrios entre espécies iónicas, o valor de *K* pode ser calculado a partir de valores de K_c determinados experimentalmente em função da força iónica para várias soluções diluídas, e utilizando a equação de Debye-Hückel (se as forças iónicas forem suficientemente baixas), ou suas extensões empíricas para calcular os valores de K_γ.

Uma outra forma para determinar valores de *K* consiste na extrapolação para o estado de referência (soluções infinitamente diluídas) de valores de K_c obtidos experimentalmente para várias composições da

solução. Não existe, contudo, nenhuma base teórica para esta extrapolação o que a torna pouco fiável. É frequente, no entanto, vê-la utilizada para determinações efectuadas a forças iónicas baixas, usando-se como variável nessa extrapolação a raiz quadrada da força iónica.[46,48]

Uma outra possibilidade consiste em definir como o estado de referência o próprio meio solvente e então **por definição** $K_\gamma = 1$, donde $K = K_c$. Neste caso é preciso ter presente que os coeficientes de actividade em soluções infinitamente diluídas podem ser bastante diferentes da unidade, quando referidos ao estado de referência assim definido. No entanto, as soluções utilizadas para obter K_c podem ter a composição alterada (por exemplo, numa titulação); o melhor que se pode esperar é que K_γ se mantenha praticamente constante e não muito diferente da unidade para as composições estudadas. Para soluções aquosas (ou soluções mistas, mas ricas em água) e para equilíbrios em que participem espécies iónicas, será de toda a conveniência manter a força iónica constante e a um valor bastante superior aos dos solutos envolvidos directamente no equilíbrio em estudo, por forma a minimizar alterações na composição do "estado de referência".

Este último estado de referência é muitas vezes utilizado na determinação experimental de constantes de equilíbrio, mas tem que se ter presente que é necessário definir pormenorizadamente o estado de referência, isto é, fornecer uma descrição completa da composição do meio solvente e da zona de concentrações utilizada para as substâncias em estudo. A comparação de resultados de diferentes proveniências só pode ser efectuada para estados de referência iguais e é de prever que o valor de K_c varie em diferentes condições experimentais.

A definição de uma solução não ideal como estado de referência é bastante aceitável, mas o seu significado físico é diferente do correspon-

dente ao caso em que se consideram soluções de diluição infinita como estado de referência. Os desvios da idealidade do comportamento das soluções deve-se a interacções interiónicas e intermoleculares entre as particulas de soluto, e estas só são nulas para soluções infinitamente diluídas, que é a base física para a sua utilização como estado de referência. A utilização de soluções não ideais como estado de referência não permite afirmar a não existência de interacções entre as várias partículas do solvente.

Estados padrão

O facto da constante de equilíbrio termodinâmica ser definida em função de actividades obriga a que, para além do estado de referência se estabeleça um estado padrão para a actividade[49]. Em soluções muito diluídas (relativamente ao solvente) os coeficientes de actividade são próximos da unidade e as constantes de equilíbrio podem ser calculadas em função de concentração. Então para soluções diluídas a selecção de um estado padrão é equivalente à selecção de uma escala de concentrações. Para soluções não ideais, embora se escolha o estado padrão quando se selecciona uma dada escala de concentração, a sua interpretação é diferente; μ° é o valor de μ para a = 1 e não a concentração unitária. O estado padrão é então definido como um estado hipotético de concentração unitária, mas com algumas das propriedades das soluções infinitamente diluídas e para as três escalas de concentração mais comuns, fracção molar, molaridade e molalidade tem-se que

$$\mu = \mu_x^\circ + RT \ln \gamma_x x \qquad (2.20)$$

$$\mu = \mu_c^\circ + RT \ln \gamma_c c \qquad (2.21)$$

$$\mu = \mu_m^\circ + RT \ln \gamma_m m \qquad (2.22)$$

O potencial químico, μ, é independente da escala de concentrações utilizadas ou do estado padrão, mas os potenciais químicos padrão e

os coeficientes de actividade têm valores numéricos diferentes nas três equações e o valor numérico da constante de equilíbrio pode ser diferente consoante o estado padrão. A interconversão entre estas três escalas de concentração é morosa e pelo facto de ser necessário conhecer a densidade da solução, dados que muitas vezes não existem, torna-se na maioria dos casos impossível.[50]

2 Sistemas químicos em soluções mistas ou não aquosas

AS CONSIDERAÇÕES ANTERIORMENTE EFECTUADAS SÃO VÁLIDAS PARA QUALQUER solução e, logo, independentes do solvente. No entanto, como a água é o solvente mais utilizado em estudos de equilíbrio químico em solução, é normal que quando se efectuem estudos em solventes mistos ou não aquosos se pretenda comparar os resultados aí obtidos com os de solução aquosa.

Como já foi referido os valores numéricos dos coeficientes de actividade são calculados utilizando, normalmente, como estado de referência o valor unitário a diluição infinita para o soluto num determinado solvente. No entanto, se o coeficiente de actividade de uma espécie *i* existente numa solução não aquosa ou mista for referido ao estado aquoso (valor unitário para diluição infinita numa solução aquosa), o seu valor a diluição infinita nesse solvente será diferente da unidade.[51]

EFEITO DO MEIO

O potencial químico de uma espécie *i* num solvente misto ou não aquoso, *s*, pode ser definido para vários estado padrão, embora obtendo valores diferentes para as actividades e para os coeficientes de actividade. Em solventes mistos há duas escalas de actividade que devem ser consideradas: uma referida ao estado padrão em solução aquosa e outra ao estado padrão no solvente orgânico ou misto, normalmente num valor unitário para o coeficiente de actividade a diluição infinita. Assim, o potencial químico da es-

pécie i num solvente misto pode ser expresso sob duas formas distintas, dependendo do estado de referência escolhido:

$$\mu_i = {}^{s}_{ag}\mu_i^{o} + RT \ln {}^{s}_{ag}a_i = {}^{s}_{ag}\mu_i^{o} + RT \ln c_i \, {}^{s}_{ag}\gamma_i \qquad (2.23)$$

em que o estado de referência é o da solução aquosa,ou

$$\mu_i = {}^{s}_{s}\mu_i^{o} + RT \ln {}^{s}_{s}a_i = {}^{s}_{s}\mu_i^{o} + RT \ln c_i \, {}^{s}_{s}\gamma_i \qquad (2.24)$$

em que o estado de referência é o definido para soluções orgânicas ou mistas. Igualando estas duas equações, já que o potencial químico tem de ser o mesmo, qualquer que seja o estado de referência escolhido, obtem-se

$${}^{s}_{s}\mu_i^{o} - {}^{s}_{ag}\mu_i^{o} = RT \ln {}^{s}_{ag}\gamma_i / {}^{s}_{s}\gamma_i \qquad (2.25)$$

equação que mostra que o valor numérico do coeficiente de actividade num solvente misto, relativamente ao definido para solução aquosa só depende dos valores da função de Gibbs padrão da espécie i associadas a cada um dos dois estados de referência.

A partir da equação 2.25 define-se a função de Gibbs de transferência, $\Delta G^{o}_{t_i}$, e o coeficiente de actividade de transferência primário ou efeito do meio, ${}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta}$, pela relações

$$\Delta G^{o}_{t_i} \equiv {}^{s}_{s}\mu_i^{o} - {}^{s}_{ag}\mu_i^{o} \qquad (2.26)$$

$${}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta} \equiv {}^{s}_{ag}\gamma_i / {}^{s}_{s}\gamma_i \qquad (2.27)$$

donde se obtém a seguinte relação entre $\Delta G^{o}_{t_i}$ e ${}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta}$

$$\Delta G^{o}_{t_i} = RT \ln {}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta} \qquad (2.28)$$

A função de Gibbs de transferência é a variação da função de Gibbs para o processo

soluto i (*estado padrão em solução aquosa*)

$\rightarrow$ **soluto i (*estado padrão no solvente orgânico*)** (2.29)

e o efeito do meio, por seu lado, pode ser interpretado como uma medida do trabalho necessário para transferir uma mole da espécie *i* no estado padrão da solução aquosa para o solvente *s*, com a espécie *i* no estado padrão definido para esse solvente. O efeito do meio é definido pela equação 2.27 para espécies neutras ou para combinações de iões que sejam neutras. Para electrólitos é possível considerar, pelo menos formalmente, que a sua energia de transferência é a soma das energias de transferência dos catiões e dos aniões; assim pode-se definir um efeito médio do meio para um electrólito como

$$\Delta G_{t_\pm}^{o} = \nu RT \ln {}^{s}_{ag}\gamma_{\pm}^{\theta} \qquad (2.30)$$

em que ν representa o número de moles de iões formados por dissociação de uma mole de electrólito; por extensão desta definição será possível obter o efeito do meio para *uma espécie iónica individual i* através de uma relação formalmente idêntica à equação 2.28

$$\ln {}^{s}_{ag}\gamma_{i}^{\theta} = (1/RT)\,\Delta G_{t_i}^{o} \qquad (2.31)$$

que não é passível de ser deduzida com base em conceitos puramente termodinâmicos.

FUNÇÃO DE GIBBS DE TRANSFERÂNCIA

Segundo Popovych[52] a equação 2.28 (e, logo, 2.30) não pode traduzir de forma correcta a variação de energia que ocorre para uma espécie iónica individual *i* no processo de transferência, pois para espécies iónicas a variação de energia associada a esse processo deverá incluir não só o termo correspondente ao efeito do meio, que traduz as diferenças nas energias de solvatação nos dois meios, mas também uma contribuição para a energia de transferência que corresponda à transferência de carga. No entanto, é correcto interpretar o efeito do meio para uma espécie iónica individual como uma medida da diferença observada nas energias de solvatação nos dois estados *ag* e *s* da equação 2.30.

É possível, fazendo uso de considerações extra–termodinâmicas, determinar experimentalmente valores para as energias de transferência de espécies iónicas individuais. Embora, estas determinações saiam fora do âmbito deste trabalho, deve-se referir que para reacções de ácido/base é frequente utilizar o modelo de Born para tentar quantificar o efeito do solvente e, assim, justificar as diferenças observadas nos valores de pK_a em diferentes meios. Como neste trabalho é efectuada a determinação de constantes de acidez para alguns ligandos em diferentes meios hidrometanólicos, será feita a seguir uma breve descrição do processo que foi utilizado para estimar $\Delta G_{t_i}^o$ para uma espécie iónica individual.

O valor da função de Gibbs de transferência para uma espécie iónica individual é estimado coma a diferença entre a energia electrostática ao introduzir uma mole de iões no solvente s e em água, ΔG_{t_i}(el). Se se assumir como válido o modelo de Born[51,53] para traduzir esta diferença de energia em meios com constantes dieléctricas ε_s e ε_{ag}, vem, para uma espécie iónica individual

$$\Delta G_{t_i(el)} = \frac{N(z_i e)^2}{8\pi\varepsilon_0} \frac{\left[(\varepsilon_s)^{-1} - (\varepsilon_{ag})^{-1}\right]}{r_i} \qquad (2.32)$$

em que N é o número de Avogadro, e a carga do electão, ε_0 a permitividade do vazio, z_i a carga do ião i e r_i o raio iónico, que se assume igual nos dois solventes. Esta equação traduz um modelo teórico simplista e como tal não reproduz os resultados obtidos experimentalmente; de facto, a utilização quer de raios cristalográfico e não do raio dos iões solvatados, quer de constantes dieléctricas macroscópicas, que podem não traduzir o modo como estas constantes efectivas variam com a distância ao ião, evidencia a existência de severas limitações no modelo e sugere várias considerações

estruturais que deveriam ser incluídas no modelo para se obter uma melhor concordância entre os resultados teóricos e os experimentais. Apesar destas limitações, este modelo tem sido utilizado para prever a variação de constantes de acidez em diferentes meios, pois permite obter uma concordância razoável entre os resultados experimentais e os teóricos (vide Capítulo 9).

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO

Verifica-se, assim, que num determinado solvente orgânico ou misto o coeficiente de actividade, referido ao estado aquoso, é dado pelo produto

$$ {}^{s}_{ag}\gamma_i = {}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta} \cdot {}^{s}_{s}\gamma_i \qquad (2.33) $$

em que ${}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta}$ é o coeficiente de actividade de transferência primário (efeito do meio) e ${}^{s}_{s}\gamma_i$ é o o coeficiente de actividade de transferência secundário (efeito da concentração). O efeito do meio, ${}^{s}_{ag}\gamma_i^{\theta}$, como já foi referido, é uma medida da variação da função de Gibbs padrão quando se transfere uma mole da espécie i no estado padrão em água para o estado padrão no solvente em estudo e reflete as diferenças entre as interacções químicas e electrostáticas da espécie *i* com as moléculas dos dois solventes (interacções soluto/solvente). O efeito da concentração, ${}^{s}_{s}\gamma_i$, é unitário a diluição infinita no solvente em estudo e caracteriza essencialmente as interacções soluto/soluto nesse solvente e outros efeitos que dependam da concentração de soluto nesse mesmo meio.[51]

3 O conceito de constante de equilíbrio

O ESTUDO QUANTITATIVO DE SISTEMAS EM EQUILÍBRIO BASEIA-SE NO CONHECIMENTO das quantidades das espécies presentes em solução no equilíbrio que é, normalmente, caracterizado pela razão entre as actividades dos produtos e dos reagentes do sistema em equilíbrio – a constante de equilíbrio termodinâmica, *K*.

Contudo, a obtenção de constantes de equilíbrio termodinâmicas não é experimentalmente fácil de realizar e mesmo a sua utilidade no estudo de equilíbrios em soluções reais não é imediata. De facto, por um lado a maioria das técnicas analíticas mede concentrações e não actividades e, por outro, a determinação/cálculo de coeficientes de actividade é, em geral, difícil, pois o meio em que a maioria das reacções, com interesse prático, ocorre contém não só as espécies reagentes e produtos em estudo, mas também várias outras substâncias iónicas. Assim, é usual obter constantes de equilíbrio estequiométricas, K_c, em condições tais que permitam garantir a constância de K_γ (ver equação 2.19). Este termo pode ser considerado praticamente constante em soluções que contenham um meio iónico inerte (electrólito inerte/electrólito de suporte) que permita considerar que a composição da solução é constante. Na prática utiliza-se uma concentração de electrólito inerte pelo menos cem vezes superior às das espécies em estudo, de modo a que os coeficientes de actividade das espécies possam ser considerados constantes ao longo de toda a determinação experimental.[47,48]

A escolha do estado padrão num meio iónico constante pode ser efectuada de duas maneiras distintas: (a) considera-se $\gamma_i = 1$ quando $c_i \rightarrow 0$ e define-se o estado padrão da espécie i como uma solução hipotética de concentração unitária em i num determinado meio iónico, considerando que as particulas i interactuam com o meio exactamente do mesmo modo que a diluição infinita; ou (b) define-se o estado padrão de i como uma solução hipotética de concentração unitária mas num solvente puro, em que as partículas i interactuam apenas com as moléculas do solvente como na situação de diluição infinita. À medida que o valor da concentração de i tende para zero no meio iónico, o valor de γ_i torna-se novamente constante, mas não é igual a um, pois ele refletirá a diferença entre o comportamento

de uma solução infinitamente diluída de i no solvente puro e de uma solução infinitamente diluída de *i* no meio iónico.

Uma abordagem alternativa consiste em definir apenas um *estado de referência*, isto é assumir que os valores de γ_i são constantes durante toda a determinação, abordagem que foi seguida em todo este trabalho. Foi efectuado o estudo em solução, de possíveis interacções entre ligandos com relevância biológica e das suas possíveis interacções com catiões metálicos num meio iónico constante que mimetiza o meio biológico isotónico. A formação dos complexos moleculares estudados é espontânea (e rápida) sendo as constantes de equilíbrio obtidas, constantes estequiométricas a uma força iónica constante.

Em termos termodinâmicos considerou-se que a presença de um electrólito inerte em concentração bastante superior ao das espécies intervenientes no equilíbrio permitia ter um valor constante K_γ, isto é, escolheu-se para estado de referência o solvente com todas as espécies nele existentes, cuja composição pode ser considerada constante. Para as constantes de equílibrio obtidas terem significado termodinâmico é necessário admitir também que o valor de K_γ era não só constante como unitário. Obviamente que as constantes assim determinadas só podem ser aplicadas a soluções com o mesmo estado de referência e, obviamente, os valores dos coeficientes de actividade para qualquer um dos dois estados padrão referidos acima serão bastante diferentes da unidade a diluição infinita.

Capítulo

3

Equilíbrio em Solução: Métodos Matemáticos

Quando o valor duma propriedade duma solução com dois ou mais solutos não é igual à soma dos valores obtidos nas soluções individuais de cada soluto, a uma mesma concentração, é possível afirmar que deve ocorrer interacção entre os solutos. Esta diferença pode ser interpretada sob um ponto de vista físico ou sob um ponto de vista químico.[54] No primeiro caso, é atribuída a um comportamento não ideal e será descrita quantitativamente em termos dos coeficientes de actividade e funções termodinâmicas. No segundo caso, é atribuída à ocorrência de uma reacção química, com a formação de uma ou mais espécies novas, a que se dará o nome genérico de complexos moleculares.

Para qualquer complexo de forma geral S_mL_n pode-se definir uma constante de equilíbrio global definida em termos das concentrações (β_{mn}) associada à reacção de formação:

$$mS + nL = S_mL_n \qquad (3.1)$$

com $$\beta_{mn} = |S_mL_n| \,/\, |S|^m\,|L|^n \qquad (3.2)$$

e em que β_{mn} está relacionado com os valores das constantes de equilíbrio

Constantes de equilíbrio globais definidas em função das constantes parciais

$$\beta_{mn} = \prod_{i=1}^{n} K_{mi} \text{ ou } \beta_{mn} = \prod_{i=1}^{m} K_{in}$$

parciais K_{mn} (ver anexo); a verificação experimental da existência destes complexos passa pela obtenção de constantes de equilíbrio superiores a zero.

Estas constantes de equilíbrio globais contêm as constantes de equilíbrio parciais, K_{ij}, $i \leq m$; $j \leq n$. É usual atribuir nomes específicos às constantes de equilíbrio de acordo com o fenómeno a que estão associadas: constantes de formação ou de estabilidade, quando S é um catião metálico e L um ligando; constantes de associação, em que tanto S como L são ligandos que interactuam por acção de forças intermoleculares; constantes de acidez para reacções de ácido/base, em que S será o catião hidrogénio, ou qualquer outro ácido e L a base que lhe está associada, ou vice-versa.

DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE EQUILÍBRIO

As constantes de equilíbrio são obtidas a partir de propriedades mensuráveis que possam ser relacionadas com as concentrações em solução de algumas das espécies do sistema em estudo e para obter o seu valor é necessário impor um modelo que descreva o comportamento das espécies em solução. Assim, a 'determinação experimental' de constantes de equilíbrio não é mais do que utilizar resultados obtidos experimentalmente para calcular as constantes de equilíbrio que melhor se julga descrever o comportamento do sistema em estudo.

A utilização desta designação é evitada no presente trabalho e nos poucos casos em que surje deve ser encarada com as reservas postas atrás.

As constantes de equilíbrio não são quantidades que possam ser medidas directamente e, por isso, têm que ser calculadas a partir de uma propriedade do sistema em estudo que seja proporcional à concentração (ou actividade) de uma ou mais das espécies existentes no sistema, no estado de equilíbrio. Generalizando, quando se tem uma solução contendo os solutos S e L e se mede uma propriedade Y dessa solução que seja função da concentração total de L, o sistema poderá ser descrito pelas equações

$$Y_i = f(|L|_i, \eta_i) \tag{3.3}$$

$$L_{it} = g(|L|_i, \lambda_k) \tag{3.4}$$

onde Y_i será o valor da propriedade da solução medida experimentalmente em função concentração total ligando total (Y_i é uma variável dependente; por exemplo em potenciometria a *fem* medida como função de pH); L_{it} é a concentração total de ligando (quantidade conhecida); $|L|_i$ é a concentração livre do ligando L; e η_i e λ_k são parâmetros constantes, que incluem as constantes de equilíbrio. Estes parâmetros podem ser determinados numericamente resolvendo o sistema de equações 3.3 e 3.4 utilizando quer

métodos gráficos, quer métodos de regressão de mínimos quadrados (linear e/ou não linear). A forma matemática destas funções e os parâmetros vão depender do modelo estequiométrico assumido para o sistema químico em estudo e do método experimental utilizado para a determinação das concentrações em equilíbrio. A equação 3.3 é denominada isotérmica de ligação,[55] e não é mais do que a expressão matemática generalizada que permitirá efectuar o ajuste matemático dos resultados experimentais obtidos a um modelo químico, previamente escolhido e que descreva o mais adequadamente possível todos os equilíbrios em solução relevantes para o sistema em estudo.

Para se definir uma determinada isotérmica de ligação é, pois, necessário: (a) definir a propriedade da solução em estudo, Y_i, específica para o método experimental usado; (b) definir um modelo químico plausível para o sistema em estudo; e (c) escrever uma relação matemática que permita definir a relação de proporcionalidade existente entre a propriedade da solução, Y_i, e a concentração de uma (ou mais) espécies do sistema em estudo. Para sistemas em que ocorra um número reduzido de equilíbrios é muitas vezes possível encontrar uma relação linear entre uma propriedade da solução e as constantes de equilíbrio do sistema em estudo que se adapte ao modelo proposto. Os valores das constantes de equilíbrio podem ser obtidos, quer pela representação gráfica desta relação, quer pela sua resolução matemática.[56, 57] No entanto, para a maioria dos sistemas as relações matemáticas que traduzem a dependência entre a propriedade do sistema e as suas constantes de equilíbrio não são lineares, pelo que só recorrendo a métodos matemáticos não lineares é possível calcular valores para as constantes de equilíbrio.

Neste capítulo aborda-se de uma maneira sucinta alguns dos métodos matemáticos utilizados para a determinação de constantes de equilíbrio. São introduzidos alguns dos métodos gráficos (lineares) utilizados

para resolver as isotérmicas de ligação e descreve-se a aplicação da análise numérica à resolução dessas equações, sublinhando a importância dos métodos numéricos não lineares para a resolução de sistemas mais complexos. É, também, referida a estrutura de alguns dos programas computacionais actualmente mais utilizados para a obtenção de constantes de equilíbrio. A nomenclatura utilizada pressupõe sempre que as constantes de equilíbrio são constantes estequiométricas determinadas na presença de um electrólito inerte.

1 Métodos lineares: análise gráfica e numérica

AS DIFICULDADES MATEMÁTICAS COM QUE SE DEPARA AO TENTAR CALCULAR CONSTANTES de equilíbrio levou a que se tentasse linearizar a relação existente entre as constantes de equilíbrio e as concentrações de equilíbrio, de modo a poderem ser facilmente calculadas por métodos gráficos ou analíticos.

VARIÁVEIS SECUNDÁRIAS

Esta relação linear é muitas vezes obtida através das variáveis de concentração secundárias,[58] que são funções que relacionam as constantes de equilíbrio com as concentrações das espécies determinadas experimentalmente e que devem o seu aparecimento ao facto de facilitarem a determinação matemática de constantes de equilíbrio, permitindo em alguns sistemas mais simples a determinação gráfica destas constantes, pois linearizam a relação existente entre as concentrações das espécies em solução e as constantes de equilíbrio.

FUNÇÃO DE FORMAÇÃO

Uma das variáveis secundárias mais importantes é a função de formação, $\overline{n}$ ou $\overline{i}$, também chamada número médio de ligandos ou função de formação de Bjerrum,[58, 59, 60] definida como

$$\bar{n} = \frac{\sum_i (L_i \text{ coordenado a } S)}{S_t} = \frac{L_t - |L|}{S_t} \tag{3.5}$$

em que L_t e S_t são as concentrações totais de L e S e $|L|$ a concentração de L livre. Particularizando para o caso do sistema químico simples, mas ainda grande generalidade, em que m = 1, SL_n, tem-se

$$\bar{n} = \sum_{i=1}^{n} \frac{i\,|SL_i|}{S_t} \tag{3.6}$$

o que poderá ser relacionada com as constantes de equilíbrio globais por:

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^{n} i\beta_{1i}|L|^i}{1 + \sum_{i=1}^{n} \beta_{1i}|L|^i} \tag{3.7}$$

A escolha da variável secundária a utilizar depende do modelo em estudo e das grandezas experimentais medidas e embora a função de concentração de Bjerrum, $\bar{n}$, seja a mais utilizada há numerosos exemplos do emprego de outras variáveis secundárias e na secção seguinte faz-se referência ao grau de formação.

Grau de formação

O grau de formação do complexo, ϕ, é outra variável de concentração secundária e que é bastante utilizada na análise de formação de complexos metálicos. Para sistemas SL_n esta função define-se pela relação

$$\phi = \frac{|S|_t}{|S|} = 1 + \sum_{i=1}^{n} \beta_{1i}|L|^i \tag{3.8}$$

Esta variável é utilizada no cálculo de constantes de formação pelo método de Leden[61] em que se define uma função, F(L) como

$$F(L) = \frac{\phi - 1}{|L|} = \frac{(|S|_t - |S|)}{|S||L|} \qquad (3.9)$$

e no método de Froneaus,[58] em que é utilizada directamente no grau de formação do complexo, $X(L) = \phi$.

As expressões definidas para $\bar{n}$, F(L) e X(L) não são mais do que isotérmicas de ligação. Com base nos resultados experimentais obtidos para um determinado sistema é pois possível através da resolução de qualquer uma destas equações determinar constantes de equilíbrio.

Seja qual for a complexidade do sistema, o que se pretende é obter a isotérmica de ligação que melhor se ajuste aos resultados experimentais. Para sistemas simples é possível utilizar métodos gráficos para determinar estes parâmetros, no entanto, é importante referir que a precisão dos parâmetros obtidos da isotérmica de ligação é maior quando estes são determinados computacionalmente,[57] seja qual for a complexidade do sistema em estudo e, evidentemente, as vantagens desta determinação aumentam com a complexidade do sistema.

Para sistemas com n=2 , SL_2, é possível obter a seguinte relação linear

$\bar{n} = (1-\bar{n})\,|L|\,K_1 + (2-\bar{n})\,|L|^2 K_1 K_2$

Os métodos gráficos são muitas vezes utilizados apenas para a obtenção de uma estimativa do valor da constante de equilíbrio para o sistema em estudo. Por outro lado, é vantajoso representar graficamente estas isotérmicas admitindo um modelo simples para o sistema em estudo, pois a visualização gráfica das isotérmica de ligação obtidas pode permitir inferir sob a validade do modelo proposto. Por exemplo a não obtenção de uma relação linear entre a função de formação $\bar{n}$ e as constantes de equilíbrio para um sistema com n=2 permite concluir a existência de um modelo químico mais complicado para a descrição do sistema em estudo.

ANÁLISE GRÁFICA

A isotérmica de ligação para o sistema mais simples, formação de complexos 1:1, é de enorme importância, não só porque é aplicável a muitos siste-

mas reais, mas também porque muitos outros sistemas podem ser visualizados como extensão, ou desvio deste modelo simples. Como é usual[62] testar este modelo antes de se adoptar outro mais complexo, vai-se particularizar o tipo de métodos gráficos mais utilizados para análise deste tipo de sistema.

Modelo mais simples: formação apenas da espécie SL:

$$f_{11} = \frac{|SL|}{S_t} \text{ com } K_{11} = \frac{|SL|}{|S||L|}$$

o que dá origem à isotérmica de ligação representada pela equação 3.10

Na sua forma mais simples a isotérmica de ligação para sistemas 1:1 é representada pela equação genérica

$$F_{11} = \frac{K_{11}|L|}{1+K_{11}|L|} \tag{3.10}$$

A forma que esta equação vai assumir está relacionada com o método experimental utilizado na determinação das concentrações em equilíbrio e com as próprias constantes de equilíbrio a determinar e por exemplo para a obtenção da constante de equilíbrio K_{11} por espectrofotometria ela terá a forma

$$\frac{\Delta A}{b} = \frac{K_{11} S_t \Delta\varepsilon |L|}{1+ K_{11} |L|} \tag{3.11}$$

em que $\Delta A/b$ é a variação de absorvância por centímetro quando a concentração total de ligando varia de zero até à sua concentração total e $\Delta\varepsilon$ é a diferença nas abortividades molares de S na sua forma complexada e na sua forma livre.

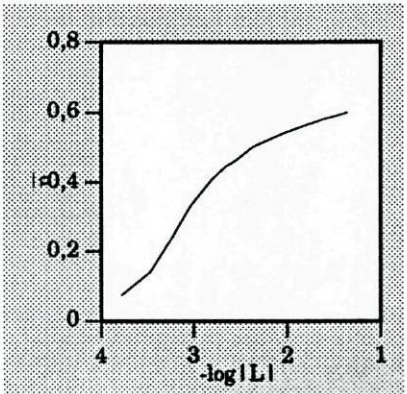
Segundo Connor[62] a isotérmica de ligação pode ser expressa de uma maneira generalizada pela equação

$$y = \frac{dx}{f+ex} \tag{3.12}$$

em que y é a variável dependente, x a variável independente e d, e e f constantes e/ou parâmetros a determinar. A representação gráfica da isotérmica de ligação assim definida pode fornecer informações qualitati-

vas e quantitativas importantes sobre o sistema em estudo e têm sido desenvolvidos diferentes representações gráficas que permitiram extrair diferentes informações sobre o sistema em estudo.

FUNÇÕES LOGARÍTMICAS



Exemplo de um gráfico semilogarítmico, cujo ponto de inflexão permite estimar K_{11}

Função de formação de Bjerrum[62]

Esta função é muito utilizada em equilíbrios de ácido/base e normalmente representa-se pela expressão:

$$y = f(\log x)$$

pois a utilização de uma escala semilogarítmica permite representar dados para uma grande extensão de x, o seu nome advém de se utilizar muitas vezes a representação $\overline{n}$, em função da concentração de ligando livre para a obtenção da constante de equilíbrio.

Gráfico de Hill[63]

A equação 3.12 pode ser reescrita como

$$x = \frac{y}{(d/f) - (e/f)y}$$

e se $d/f = e/f$ como no caso da sua aplicação à equação 3.10 obtém-se

$$\log \frac{f_{11}}{1-f_{11}} = \log|L| - \log K \qquad (3.13)$$

e a representação gráfica de $\log f_{11}/1\text{-}f_{11}$=f $\log|L|$ deverá dar uma recta com declive =1. O valor do declive para $\log f_{11}/1\text{-}f_{11}$= 0 é denominado o coeficiente de Hill e claro que para este exemplo é igual a 1. No entanto, para modelos mais complicadoaparecem desvios a este comportamento. Este tipo de gráfico tem sido bastante utilizados no estudo de inibição enzimática e de ligação cooperativa;[64]

Brenesi-Hildbrand[65]

$$\frac{1}{y} = \frac{f}{d} * \frac{1}{x} - \frac{e}{d} \tag{3.14}$$

em que 1/y = f(1/x) fornece uma recta conhecido pelo gráfico do recíproco duplo e bastante utilizado em estudos espectrofotométricos de complexos moleculares, com o nome de gráficos de Benesi / Hildebrand [2.9]. A sua aplicação baseia-se por exemplo na linearização da função definida na equação 3.11 dando a equação

$$\frac{b}{\Delta A} = \frac{1}{S_t K_{11} \Delta\varepsilon |L|} + \frac{1}{S_t \Delta\varepsilon} \tag{3.15}$$

donde se obtem o valor da constante de equilíbrio K_{11} e de $\Delta\varepsilon$.

Representação de Scott[62]

$$\frac{x}{y} = \frac{e}{d}x - \frac{f}{d} \tag{3.16}$$

conhecida pelo gráfico recíproco de y é também utilizada e a sua aplicação à a equação 3.11 dá

$$\frac{b|L|}{\Delta A} = \frac{|L|}{S_t \Delta\varepsilon} + \frac{1}{S_t K_{11} \Delta\varepsilon} \tag{3.17}$$

obtendo-se o valor da constante de equilíbrio K_{11} e de $\Delta\varepsilon$

Representação de Scatchard[65, 62, 67]

$$\frac{y}{x} = -\frac{e}{f}y + \frac{d}{f} \tag{3.18}$$

denominado pelo gráfico recíproco de x é muito utilizado em estudos de ligação de proteínas. A sua aplicação à equação 3.11 dá origem a

$$\frac{\Delta A}{b|L|} = \frac{K_{11}\Delta A}{b} + S_t K_{11} \Delta\varepsilon \tag{3.19}$$

Estas três últimas representações gráficas não são experimentalmente equivalentes e há uma grande controvérsia sobre as suas vantagens e desvantagens[62] dada a interdependência das variáveis dependente e independentes. No entanto, para verificar a validade do modelo simples introduzido será apenas necessário utilizar uma destas representações e verificar a sua linearidade, mas é necessário que o estudo seja efectuado para uma vasta gama de concentrações de modo a garantir que a linearidade não advêm de se estar a estudar uma zona em que a formação de outras espécies é mínima.

Estes modelos gráficos foram e são utilizados numa tentativa de testar o modelo químico admitido e de fornecerem valores para os parâmetros que caracterizam o sistema, que são as constantes de equilíbrio e quantidades características da técnica experimental utilizada, no entanto a sua utilidade está reduzida a sistema simples, número de equilíbrios inferior a 3, com diminuição da precisão dos resultados à medida que estes vão de 1 a 3. A determinação deste parâmetros pode ser feita gráficamente mas, actualmente, é usual determiná-los por análise numérica aplicando o método de mínimos quadrados linear .[56, 57]

ANÁLISE NUMÉRICA

O método dos mínimos quadrados linear aplicado às várias isotérmicas de ligação obtidas para sistemas simples através das concentrações secundárias, calcula o valor dos parâmetros por forma a minimizar a soma do quadrado dos seus resíduos e permitindo também determinar os erros inerentes aos parâmetros calculados e estimar a precisão do ajuste (*goodness of fit*) do modelo assumido. Na Figura 3.1 apresenta-se um esquema que elucida os cálculos necessários para utilização deste método.

Para se obter a melhor correlação linear através deste método é necessário que a precisão da variável independente seja muito superior à

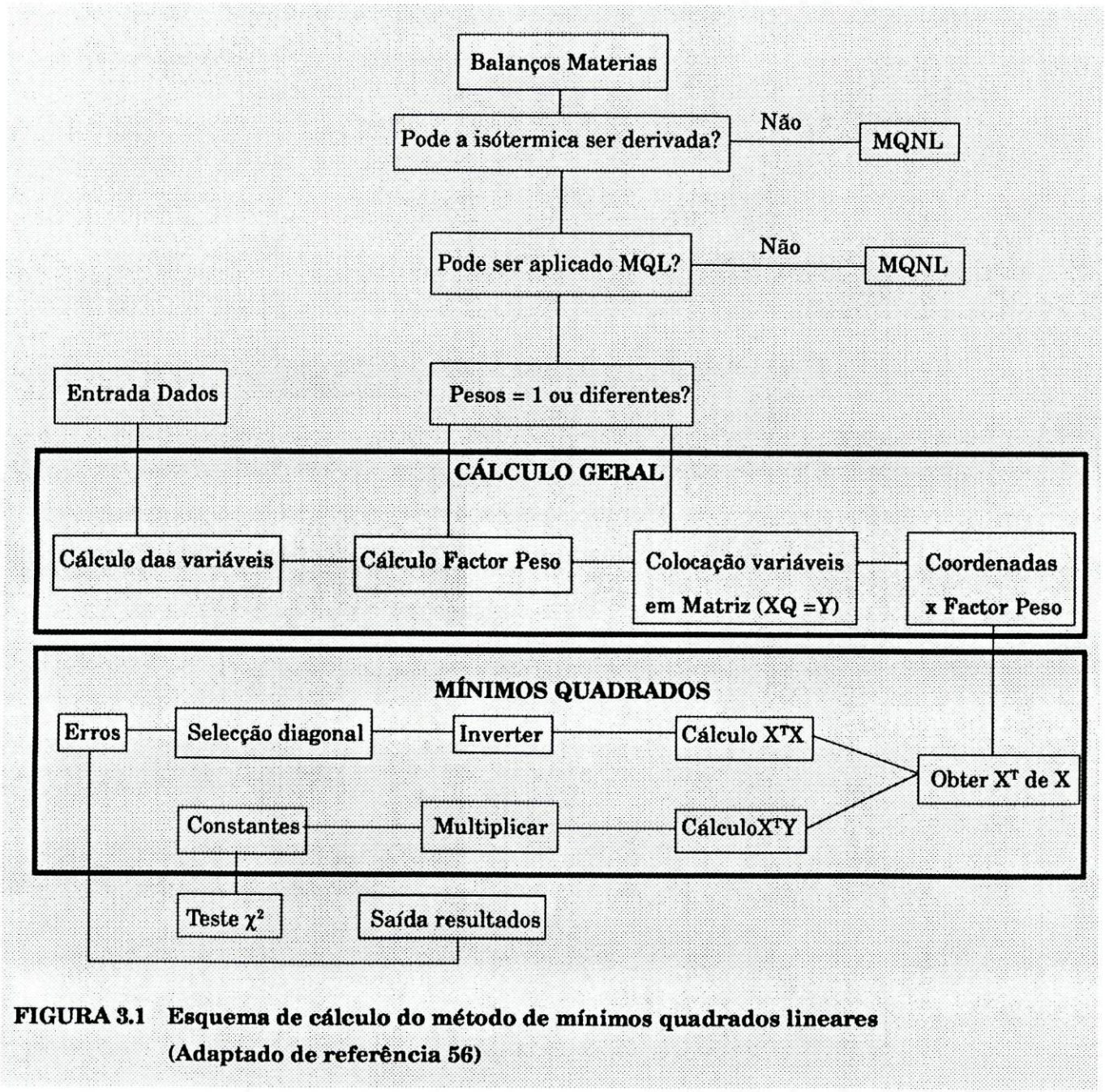


FIGURA 3.1 Esquema de cálculo do método de mínimos quadrados lineares (Adaptado de referência 56)

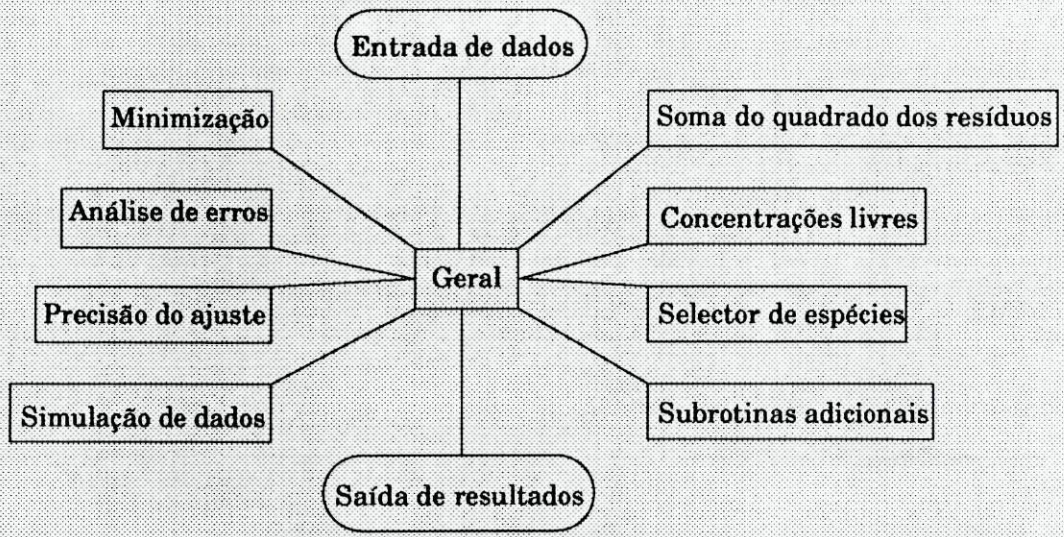


Figura 3.2 Esquema da estrutura geral dos programas utilizados na determinação de constantes de equilíbrio

da variável dependente e que seja possível encontrar para cada valor da variável independente um bom valor para a variável dependente de modo a determinar um conjunto de resíduos (em que o resíduo é a diferença entre o valor determinado experimentalmente e o valor cáculado para a variável independente), em que a soma do quadrado desses resíduos é minimizada. Como os erros dos parâmetros da isotérmica de ligação estão associados aos erros da variável dependente pode-se então determinar o desvio padrão associado a estes parâmetros e obter assim uma estimativa da sua precisão.[56, 57]

A aplicação deste método às isotérmicas de ligação obtidas através das concentrações secundárias deve ser efectuada com cuidado, pois as

variáveis independentes estão também sujeitas a um erro; e como quer estas quer as variáveis dependentes são muitas vezes obtidas de uma mesma função (por exemplo $\bar{n}$) os seus erros estão correlacionados. Além disso é provável que os erros aliados a estas variáveis não sejam constantes ao longo de todos os resultados experimentais obtidos (variância dos resíduos são diferentes) e neste caso utiliza-se muitas vezes um factor peso associado à soma do quadrado dos resíduos[68] o que permite aplicar o teste de χ^2 aos resultados.[69] No entanto, para sistemas mais complicados o único tratamento satisfatório para os resultados experimentais obriga à utilização de métodos iterativos não lineares, efectuados de preferência sobre um grande número de resultados experimentais.

2 Métodos não lineares

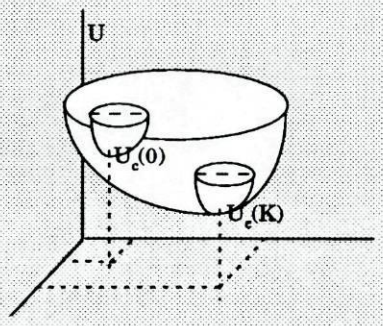
Quando os sistemas em estudo são mais complexos é necessário utilizar, como já foi mencionado, métodos iterativos não lineares para a determinação dos parâmetros que façam parte de uma isotérmica de ligação. Os programas existentes para a determinação de constantes de equilíbrio têm uma estrutura básica comum[70], esquematizada na Figura 3.2.

- Entrada de dados. Introduzem-se não só os resultados experimentais obtidos, como as estimativas iniciais dos parâmetros a serem refinados; os métodos gráficos descritos atrás são, em geral, utilizados para obtenção destas estimativas.
- Minimização da soma do quadrado dos resíduos (U). Esta função é definida como

$$U = \Sigma w_i (y_{exp} - y_{calc})_i^2 = \Sigma w_i r_i^2 \qquad (3.19)$$

em que w_i é o peso associado a cada ponto experimental e y a variável dependente que é função dos parâmetros a determinar. As variá-

veis experimentais dependente e independente estão ambas sujeitas a erros experimentais, no entanto na maioria dos programas é considerado que os valores da variável independente não estão afectados de erro e que toda a incerteza experimental está associada à variável dependente. Como exemplo, em determinações potenciométricas do tipo $E = f(V_t)$ admite-se que apenas as leituras de potencial estão afectadas de um erro experimental e que os volumes de titulante não; em determinações espectrofotométricas, $A = f(pH)$, apenas as absorvâncias estarão afectadas de erro experimental.



Procura do mínimo num espaço com dimensão m+1

- Algoritmo de minimização. Teoricamente a minimização da função U (equação 3.19) só pode ser efectuada se o modelo em estudo for correcto, se não existirem erros sistemáticos, se o erro aleatório associado à variável dependente tiver uma distribuição Gaussiana e se o peso atribuído a cada ponto experimental for uma medida da exactidão de y_i. O processo de minimização pode ser efectuado quer de um modo sistemático (algoritmo), quer de um modo heurístico. O primeiro faz uma minimização automática encontrando o mínimo global a partir de vários mínimos locais; o segundo depende mais do utilizador que decidirá se basta encontrar um mínimo local ou se será necessário a determinação do mínimo absoluto. Os vários algoritmos de minimização[70] podem ser divididos em dois grupos, métodos derivativos livres ou métodos derivativos, nestes últimos é necessário o cálculo das derivadas parciais da função U. Em anexo encontram-se sumariados alguns dos métodos de minimização mais comuns, dos quais os mais utilizados actualmente no cálculo de constantes de equilíbrio são os de Gauss - Newton e Gauss -Newton - -Raphson[68, 71] e o de Marquardt.[68, 70,72, 73] No primeiro, a isotérmica de ligação é expandida numa série de Taylor truncada no termo de

Algoritmos de minimização

MÉTODOS DERIVATIVOS LIVRES
i) Procura livre
ii) Simplex
iii) Pit - mapping

MÉTODOS DERIVATIVOS
i) Gauss-Newton (Raphson)
ii) Declive máximo
iii) Fletcher - Powell
iv) Marquardt

primeira ou de segunda ordem e no segundo alia-se este método ao método denominado método da direcção com declive máximo,[77,78] em que os parâmetros são ajustados de acordo com o valor das derivadas calculadas num determinado ponto e com o ajuste efectuado no sentido de os valores das derivadas serem mínimos. Uma descrição mais pormenorizada dos métodos de minimização pode ser obtida nas referências 70 e 72.

- A análise de erros. Esta é efectuada através do cálculo do intervalo de confiança dos parâmetros e dos seus desvios padrão, de modo a ser possível detectar qualquer erro nos valores que definem uma determinada isotérmica de ligação.

- Fiabilidade (*goodness of fit*) do modelo ou modelos propostos. É efectuada pela análise estatística dos resíduos, por exemplo, pela média aritmética dos resíduos r_m

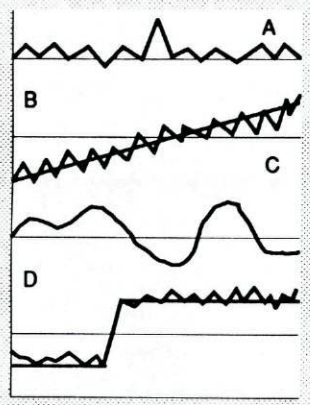
$$r_m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} r_i \qquad (3.20)$$

e/ou pela variância dos mesmos

$$Var_{res} = \frac{\sum_i r_i^2}{n} - \left(\frac{\sum_i r_i}{n} \right)^2 \qquad (3.21)$$

ou ainda por aplicação do teste estatístico de χ^2 aos resíduos.[70, 72]

- Cálculo das concentrações livres de cada componente. A partir da concentração analítica total e das constantes de equilíbrio calculadas, vão ser calculadas as concentrações livres pela resolução de sistemas de equações não lineares baseados nas equações dos balanços



Análise gráfica de resíduos:
A-Detecção de um ponto extremo; B-Detecção de uma variação sistemática; C-Detecção de uma variação de sinal; D-Detecção de desvio abrupto na experiência

materiais das espécies em solução.

- Saída de resultados. Engloba a apresentação dos valores numéricos obtidos para as constantes de equilíbrio, dos erros a elas associado e, muitas vezes, de diagramas de distribuição.

A determinação de parâmetros por métodos iterativos de regressão não linear é complexa e como tal é difícil de se saber qual o método de minimização a escolher, contudo actualmente, dada a vasta utilização deste tipo de programas na última década, considera-se que os o método de Marquardt é o que origina melhores resultados principalmente no que diz respeito às suas propriedades de convergência. A comparação dos resultados obtidos por diferentes programas para as constantes de equilíbrio de um mesmo sistema e utilizando resultados experimentais obtidos por uma mesma técnica experimental, mostra que os resultados obtidos são concordantes até à terceira casa decimal.[74, 75] Há, no entanto, que referir que este tipo de análise comparativa tem sido efectuada apenas para sistemas simples, e que a sua validade para sistemas complexos está longe de ser provada.

3 Comentário final

A OBTENÇÃO DE CONSTANTES DE EQUILÍBRIO EM SOLUÇÃO É UMA ÁREA DA QUÍMICA que tem sido largamente estudada dado o seu interesse não só sob um ponto de vista meramente químico, isto é, do conhecimento da possível interacção de substâncias em solução e do seu comportamento como ácidos, bases, ou complexos moleculares (o que engloba a associação não só de ligandos a catiões metálicos, mas também de ligandos entre si), mas também pelo interesse que estas constantes podem ter na resolução de problemas de outras áreas da ciência, como por exemplo na biologia, na biotecnologia, na bromatologia, na farmacologia, etc....

A qualidade de bastantes trabalhos publicados nesta área tem vindo a ser posta em causa e o seu aparecimento (que se deve talvez ao facto de mesmo uma baixa disponibilidade financeira permitir a aquisição da instrumentação necessária à realização deste tipo de experiências) sem qualquer objectivo aparente de melhorar ou promover conceitos fundamentais de química de solução ou mesmo de fornecer informação relevante para outras áreas fez com que a determinação de constantes de equilíbrio fosse considerada como apenas trabalho de rotina.[76] Contudo, o aparecimento de requisitos específicos[77] para publicação de estudos neste domínio e a actual interligação com as áreas da Ciência referidas acima fez com que a qualidade e o interesse na obtenção de constantes de equilíbrio voltasse a ser aceite como um campo de investigação relevante.

As considerações efectuadas neste capítulo permitem concluir que, a fiabilidade das constantes de equilíbrio depende das condições experimentais escolhidas para a obtenção dos resultados experimentais, da isotérmica de ligação definida (modelo escolhido) para o sistema em estudo e do método de cálculo que vai permitir relacionar os resultados experimentais com a isotérmica de ligação.

As condições experimentais adequadas aos vários métodos analíticos que permitem a determinação de constantes de equilíbrio serão apresentadas no capítulo seguinte. Os vários tratamentos matemáticos descritos neste capítulo e que permitem a determinação de valores para as constantes de equilíbrio, mostram que a utilização de métodos gráficos só deve ser efectuada para estudos preliminares em que são assumidos modelos bastante simples pois permitem visualizar mais facilmente a adequabilidade desse modelo. Os valores das constantes de equilíbrio obtidas por métodos gráficos devem ser considerados apenas como estimativas (em alguns casos simples, estimativas bastante boas) a utilizar em métodos

numéricos. A utilização do método dos mínimos quadrados linear para a determinação do valor das constantes de equilíbrio é um método bastante bom para sistemas simples desde que se tenha presente as limitações já mencionadas (ver página 50: ANÁLISE NUMÉRICA). A utilização do método de mínimos quadrados não lineares é fundamental para a determinação de constantes de equilíbrio de sistemas complexos e, hoje em dia, a sua utilização está, mais ou menos generalizada a todo o tipo de sistemas dada não só a diversidade de programas comerciais e de domínio público existentes adaptados ou de possível adaptação a microcomputadores compatíveis com IBM, (frequentes na maioria dos laboratórios), mas também à sua rapidez de cálculo, mesmo no tratamento simultâneo de numerosos resultados.

Dada a facilidade de utilização destes programas, é muitas vezes esquecido que a obtenção de constantes de equilíbrio não se limita à resolução de um problema matemático, sendo sobretudo a tentativa de resolução um problema químico, devendo os valores obtidos ser analisados segundo este prisma. Há que evitar a tentação de escolher como melhor modelo aquele que fornece melhores parâmetros estatísticos, pois não se deve esquecer que a introdução de mais equilíbrios pode levar a uma melhor convergência e a menores resíduos, mas que esses equilíbrios podem carecer de significado químico. O modelo químico que melhor descreve um sistema em estudo não tem de ser aquele que, em termos matemáticos, fornece a melhor precisão dos parâmetros a determinar e os melhores parâmetros estatísticos, mas sim aquele que por análise das propriedades químicas das várias substâncias que dele fazem parte permite concluir que os equilíbrios encontrados e os seus valores são os que melhor o descrevem.

Capítulo

4

Equilíbrio em Solução: Métodos Experimentais

QUALQUER PROPRIEDADE QUE VARIE COM A EXTENSÃO DE FORMAÇÃO DE UM COMplexo molecular pode, em principio, ser utilizada, para o cálculo (*determinação*; vide Capítulo 3) de constantes de formação desse complexo. Como já foi mencionado, a obtenção experimental de constantes de equilíbrio só pode ser efectuada a partir de uma determinada propriedade mensurável que possa ser relacionada com as concentrações em solução de alguma ou de algumas das espécies do sistema em estudo.

Os métodos experimentais utilizados para obter constantes de equilíbrio podem ser divididos em dois grandes grupos : i) métodos em que a propriedade medida é proporcional à concentração de uma determinada espécie (todos os métodos espectroscópicos); e ii) métodos em que a propriedade medida é proporcional à actividade das moléculas de uma dada espécie (maioria dos métodos electroquímicos e de distribuição). No entanto, se as determinações experimentais forem efectuadas mantendo a composição do meio constante (na prática, mantendo a força iónica constante com o recurso à utilização de um electrólito inerte; (ver Capítulo 2) esta divisão deixa de ter significado e as constantes de equilíbrio passam a ser sempre

constantes estequiométricas, embora neste caso seja necessário definir de forma explícita as condições experimentais utilizadas.

É usual dividir os métodos experimentais que permitem medir uma propriedade que varie com o grau de formação de um complexo molecular de acordo com essas propriedades; assim é usual falar em métodos electroquímicos, espectroscópicos, calorimétricos e de distribuição (estes englobando equilíbrios heterogéneos). Há que referir, no entanto, que de entre estes métodos, a potenciometria e a espectrofotometria electrónica são sem dúvida os mais utilizados na obtenção de constantes de equilíbrio, e de facto no presente trabalho a sua presença é ubíqua.

Neste capítulo e para as técnicas experimentais utilizadas neste trabalho pretende-se: (a) realçar os aspectos experimentais fundamentais na obtenção de constantes de equilíbrio por forma a obedecerem às recomendações da IUPAC; (b) descrever algumas das funções matemáticas (formas das isotérmicas de ligação) mais usadas na descrição dos modelos utilizados para representar o sistema em estudo; (c) fornecer uma ideia geral dos métodos lineares (e das suas contrapartes gráficas) actualmente mais utilizados na obtenção de valores das constantes de equilíbrio (muitas vezes apenas utilizados para fornecer estimativas dessas constantes, ver Capítulo 3); e (d) fornecer uma breve descrição de alguns dos programas de regressão não linear mais frequentemente referidos na literatura científica para o cálculo de constantes de formação.

1 Técnicas potenciométricas

Os métodos potenciométricos são sem dúvida os mais utilizados na obtenção de valores experimentais (*fem*) para a *determinação* de constantes de equilíbrio,[78,79] e de entre estes, os que utilizam o eléctrodo sensível ao catião hidrogénio têm sido, sem dúvida, os mais utilizados. Deve, no entanto, ser reconhecido, que se tem vindo a assistir ao aparecimento de um número crescente de determinações potenciométricas em que se utilizam eléctrodos sensíveis a outras espécies em solução. No entanto, a utilização deste último tipo de eléctrodos encontra severas limitações na dificuldade em obter eléctrodos que possam ser utilizados nos sistemas em estudo, quer por não ser possível obter eléctrodos que respondam às espécies envolvidas na reacções de equilíbrio, quer por não apresentarem um comportamento nernstiano na zona de concentrações necessária para obter constante de equilíbrio, quer ainda por não responderem no meio em estudo apenas a uma espécie (falta de selectividade).

Variável dependente

O potencial E de um eléctrodo de membrana (eléctrodos baseados no desenvolvimento de um potencial de membrana que advém da existência de um gradiente de concentração de iões através desta) está relacionado com a actividade de uma espécie i em solução através da equação de Nernst,

$$E = E_i^o + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i \qquad (4.1)$$

em que E_i^o é o potencial normal à temperatura T quando a actividade a_i é igual à unidade, F é a constante de Faraday, R a constante dos gases e z_i a carga formal do ião i. A actividade está relacionada com a concentração através dos coeficientes de actividade e se estes forem mantidos constantes, pela utilização de um meio cuja composição iónica possa ser considerada constante, a equação (4.1) assumirá a forma

$$E = k + \frac{RT}{z_i F} \ln c_i \qquad (4.2)$$

em que $k = E_i^o + (RT / z_i F) \ln \gamma_i$.[78-80] As equações 4.1 ou 4.2 mostram que o potencial de qualquer eléctrodo depende da temperatura a que são efectuadas as determinações o que obriga a que as realizações experimentais sejam efectuadas com um rigoroso controlo de temperatura, não só pelo facto de as próprias constantes serem dependentes da temperatura, mas também pela dependência referida de E com a temperatura.

A determinação experimental de potenciais (*fem*) é pois efectuada com uma célula electroquímica termostatizada que contém não só um eléctrodo indicador, mas também um eléctrodo de referência. O modo como é feita a calibração (determinação do valor experimental de k e de RT/z_iF) do sistema potenciométrico é fundamental para a fiabilidade dos valores que irão ser obtidos para as constantes de equilíbrio; este assunto é tratado de uma maneira pormenorizada no Capítulo 7.

AQUISIÇÃO DE DADOS

Para obter as constantes de equilíbrio para reacção genérica

$$m\,S + n\,L \rightleftharpoons S_m L_n$$

é necessário medir a *fem* da célula electroquímica para várias soluções com diferentes razões S/L.

Se no estudo de um sistema em equilíbrio existir uma espécie iónica cuja concentração (ou actividade) seja afectada pela formação de complexos moleculares (Capítulo 3) e se existir um eléctrodo sensível a esta espécie com comportamento nernstiano na zona de concentrações a estudar, é possível utilizar os valores de potencial da célula para soluções com diferentes composições por forma a obter as constantes de equilíbrio do sistema.

Experimentalmente existem duas formas de variar a composição das soluções a analisar. Numa, potenciometria directa, os estudos potenciométricos são efectuados preparando várias soluções independentes com razões S/L conhecidas. Na outra, é titulada uma solução de uma ou mais espécies intervenientes na reacção à qual é adicionada uma outra espécie que perturbe o equilíbrio (titulante); após cada adição a *fem* da célula é medida. O titulante pode ser qualquer uma das espécies S ou L em estudo

ou, se as espécies complexantes tiverem carácter ácido/base, um ácido ou uma base forte. A titulação potenciométrica tem, geralmente, a vantagem de ser mais rápida, menos laboriosa e de permitir uma eventual automatização do processo, pelo que a sua utilização é bastante mais frequente do que a potenciometria directa.

Os resultados potenciométricos obtidos experimentalmente podem ser função da concentração de S ou de L, se existirem eléctrodos sensíveis a estas espécies, ou função da concentração de catião hidrogénio se for utilizado um eléctrodo sensível a este catião. Este último método é sem dúvida o mais utilizado dada a diversidade de sistemas a que pode ser aplicado. Quando se utiliza um eléctrodo sensível ao catião hidrogénio e se as espécies em estudo tiverem carácter ácido/básico fraco ou intermédio, é usual seguir a variação de concentração de catião hidrogénio em função da quantidade de um ácido ou de uma base adicionada a uma solução com concentrações totais de S e L conhecidas.[81] Se as espécies tiverem um carácter ácido/base forte é possível medir directamente a variação de concentração de catião hidrogénio em função da concentração de S adicionada a uma solução de L ou vice-versa.[78]

As determinações com eléctrodos de vidro sensíveis a catião hidrogénio estão normalmente limitadas ao intervalo de pH 2,5 – 11,5.

Ao longo deste trabalho as determinações potenciométricas foram quase sempre efectuadas com eléctrodos indicadores sensíveis ao catião hidrogénio e por adição de ácido forte a soluções amostra com concentrações de S e L conhecidas, dado que as espécies em estudo têm propriedades ácido/base fracas ou intermédias. Este método tem contudo algumas limitações, de que se deve salientar a sua ineficiência em zonas extremas de concentração de catião hidrogénio, isto é, para altas concentrações deste catião a protonação das espécies é praticamente completa o que torna impossível a determinação das concentrações livres de L ou S, enquanto que para baixas concentrações de catião hidrogénio a concentração de S ou L

Tabela 4.1 Programas mais utilizados em potenciometria

Programa	Função a minimizar	Método iterativo	Ref.
LETAGROP	$\overline{n}$, $\lvert H^+ \rvert$, *fem*	Pitmapping	82
GAUSS	Concentração de H^+	Gauss-Newton	83
SCOGS	Volume titulante	Gauss-Newton (G/N)	84
ACBA	Volume titulante	Derivada Analítica	85
TITFIT	Conc. analíticas	G/N-Marquardt	86
BEST	Concentração de H^+	Newton-Raphson	87
MINIQUAD	Conc. analíticas	Gauss-Newton	88
SUPERQUAD	*fem*	G/N-Marquardt	89

livre é insensível a variações deste catião. No Capítulo 7 é feita uma descrição mais pormenorizada dos cuidados experimentais a ter na obtenção de constantes de equilíbrio com o eléctrodo sensível ao catião hidrogénio.

TRATAMENTO MATEMÁTICO

Após a obtenção dos resultados experimentais estes são sujeitos a um tratamento matemático (Capítulo 3) de modo a ser possível obter os valores das constantes de equilíbrio.

O cálculo de constantes de equilíbrio a partir de resultados determinados por potenciometria é normalmente efectuado com programas computacionais de regressão não linear, mesmo quando apenas se estudam sistemas simples. A utilização, praticamente generalizada, deste tipo de programas advém da sua actual facilidade de utilização e versatilidade. Na Tabela 4.1 estão referidos alguns dos programas actualmente mais utilizados; as suas diferenças residem fundamentalmente nas funções que vão ser minimizadas e nos métodos numéricos que utilizam. Estes programas devem pois ser utilizados tendo presente as limitações

que podem estar associadas a cada um destes parâmetros (Capítulo 3), nomeadamente os erros inerentes às variáveis experimentais que vão ser minimizadas, à rapidez de convergência do método de minimização e aos valores de constantes de equilíbrio utilizados como primeira estimativa no método iterativo. De referir que a maioria destes programas de regressão não linear estão normalmente desenhados para poderem ser utilizados em qualquer estudo potenciométrico, e como tal permitem o tratamento de dados obtidos com eléctrodos sensíveis a diferentes espécies.

Estudos comparativos sobre a eficácia de diferentes programas computacionais utilizados na obtenção de constantes de equílibrio por potenciometria são escassos e efectuados apenas para sistemas simples.[74,75,90] Assim, apenas é possível afirmar que desde que seja assegurada a convergência os valores finais obtidos *para sistemas simples* apenas diferem na terceira casa decimal. Actualmente um dos programas mais utilizados na obtenção de constantes a partir de resultados potenciométricos é o SUPERQUAD e a sua enorme utilização advém principalmente de se assumir que o seu algoritmo de minimização garante a convergência do processo iterativo (o que tem sido confirmado na prática, mesmo quando as estimativas iniciais das constantes de equilíbrio a determinar não são as mais correctas) e de poder ser utilizado em qualquer microcomputador compatível com IBM.

Embora a utilização dos programas mencionados esteja bastante generalizada, é de salientar que a função de formação, $\bar{n}$, ou função de formação de Bjerrum,

$$\bar{n} = \frac{L_t - L_f}{S_t} \qquad (4.3)$$

é ainda muito utilizada na obtenção potenciométrica de constantes de acidez e de constantes de formação entre catiões metálicos e ligandos com ca-

O número médio de protões $\bar{j}$ é definido por $\bar{j} = \frac{\sum_0^j j|H_jL|}{\sum_0^j |H_jL|}$

em que $\sum_0^j |H_jL|$ é

$L_t = |L| + |HL| + |H_2L| + \ldots |H_jL|$

rácter ácido/base, principalmente para sistemas em que é utilizado o eléctrodo sensível ao catião hidrogénio, pois a sua utilização simplifica o tratamento matemático necessário ao cálculo destas constantes de formação. Para estes sistemas a equação 4.3, deduzida a partir das equações de balanço material do catião metálico (S) do ligando (L) e do catião hidrogénio (H) toma a forma geral

$$\bar{n} = \frac{L_t - \bar{j}^{-1}\left(H_t - |H^+|K_{ag}|H^+|^{-1}\right)}{S_t} \qquad (4.4)$$

em que L_t, S_t e H_t são as concentrações totais de ligando, metal e catião hidrogénio, $|H^+|$ a concentração livre deste último, e $\bar{j}$ o número médio de protões coordenado a cada molécula de ligando.

EXEMPLO

Exemplificando para o caso em que L é um ligando diprótico em que apenas coordena a forma completamente desprotonada, como para a maioria dos aminoácidos, o balanço material de protão é

$$|H_t| = |H^+| + |HL| + 2|H_2L| \qquad (4.5)$$

Equações 4.8 e 4.9 expressas em função das protólises do ligando L diprótico

$$\bar{j} = \frac{2|H^+| + K_{a1}|H^+|^2}{|H^+|^2 + K_{a1}|H^+|^2 + K_{a1}K_{a2}}$$

$$\alpha = \frac{K_{a1}K_{a2}}{|H^+|^2 + K_{a1}|H^+|^2 + K_{a1}K_{a2}}$$

Designando por H_l a concentração de protão coordenado ao ligando

$$H_l = |H_t| - |H^+| \qquad (4.6)$$

e por L_f a concentração total de ligando não complexado ao catião metálico

$$L_f = |L| + |HL| + |H_2L| \qquad (4.7)$$

o número médio de protões por molécula de ligando, $\bar{j}$, será

$$\bar{j} = \frac{H_l}{L_f} \qquad (4.8)$$

e a quantidade de ligando livre desprotonado, α, será

$$\alpha = \frac{|L|}{L_t} \tag{4.9}$$

o que permite obter, exprimindo as equações 4.8 e 4.9 em função das constantes de protólise do ligando, a concentração de ligando livre

$$|L| = \alpha \frac{H_1}{\bar{j}} = \alpha (L_t - \bar{n} S_t) \tag{4.10}$$

e a partir deste valor e dos valores da concentração de catião hidrogénio, obter as constante de formação.

2 Espectrofotometria de ultravioleta/visível

PARA A OBTENÇÃO DE CONSTANTES DE EQUILÍBRIO A PARTIR DE RESULTADOS espectrofotométricos usa-se a expressão

$$A_\lambda = l\left(\Sigma \varepsilon_{\lambda_i}\right) c \tag{4.16}$$

que não é mais do que a lei de Beer - Lambert generalizada, em que l é o passo óptico, ε_{λ_i} a absortividade molar da espécie *i* ao comprimento de onda λ e A_λ a absorvância ao comprimento de onda λ.[91]

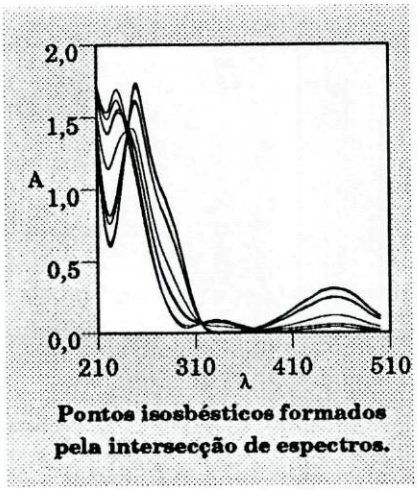
VARIÁVEL DEPENDENTE

Na prática mede-se a absorvância de uma série de soluções a vários comprimentos de onda, contra uma solução de referência (branco). A qualidade dos dados espectrofotométricos obtidos está directamente relacionada com o cuidado com que se fazem as determinações experimentais e é importante ter sempre presente as características fundamentais do espectrofotómetro utilizado e garantir que as medições de absorvância devem ser sempre efectuadas na zona de máxima precisão do instrumento. Um parâmetro a ter em consideração é a resolução do monocromador, que

teoricamente deve ser 1/8 da largura de banda intrínseca do composto em estudo para garantir a observação da intensidade real da banda,[ALC] e que normalmente, para estudos em solução é de 2 nm na zona do visível e de 1nm na do ultravioleta.[92]

AQUISIÇÃO DE DADOS

A obtenção de resultados experimentais para cálculo de constantes de equilíbrio deve ser efectuada numa vasta gama de comprimentos de onda, no entanto se os comprimentos de onda utilizados cobrem uma zona em que existe uma grande sobreposição de espécies absorventes, ou onde as absortividades molares de duas ou mais espécies são linearmente dependentes, a informação obtida é reduzida pois os parâmetros a obter vão estar correlacionados. Para uma determinação precisa de constantes de equilíbrio deve ser escolhida uma zona de comprimentos de onda onde a absortividade molar das várias em solução espécies seja bastante diferente ou, se isto não for possível, usar vários comprimentos de onda espaçados de intervalos iguais.[91]



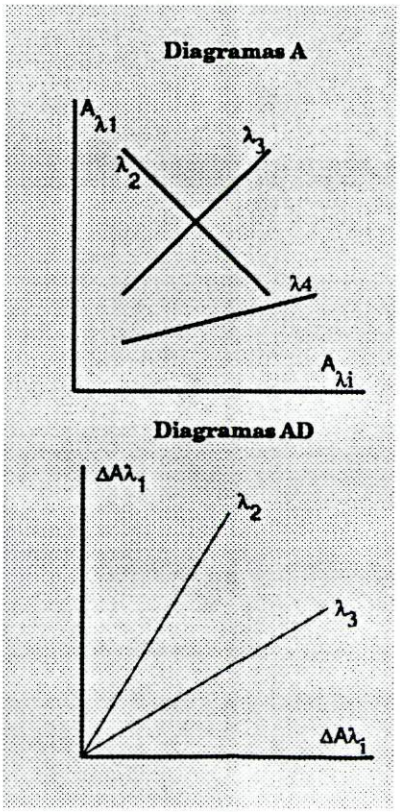
Pontos isosbésticos formados pela intersecção de espectros.

Embora possa ser apenas necessário utilizar determinadas zonas de comprimentos de onda para a obtenção de constantes de equilíbrio de um determinado sistema em estudo, a obtenção do seu espectro total pode muitas vezes permitir obter informação sobre o número de componentes deste mesmo sistema. A existência de pontos isosbésticos foi uma das propriedades espectrais utilizada,[91-94] contudo ela não permite tirar nenhuma conclusão definitiva pois mesmo para um sistema em que apenas existem duas espécies, podem ou não existir pontos isosbésticos. No entanto, se na obtenção de vários espectros para um mesmo sistema for verificada a intersecção de alguns destes é possível afirmar que existe mais do que um complexo molecular em solução.[95]

A análise de outras propriedades espectrais pode permitir tirar mais conclusões sobre o sistema em estudo e a matriz ***A***, em que cada Aij é

Tabela 4.2 Funções gráficas que permitem inferir a estéquiometria de espécies em estudo

Nº espécies	Absorvâncias		Resultados
		eixo y	eixo x
1	A_{mj}	A_{ij}	Para todos os valores i = m obtem-se um conjunto de linhas rectas que passam pela origem
2	$A_{ij}-A_{ij'}$	$A_{i'j}-A_{i'j'}$	Para i=i' e j = j' um conjunto de linhas rectas que passam pela origem (AD).
3	$A_{bj}-A_{bj'}/A_{ij}-A_{ij'}$	$A_{cj}-A_{cj'}/A_{ij}-A_{ij'}$	Para i = b = c e j = j' obtem-se um conjunto de linhas rectas (ADQ).



a absorvância da solução j ao comprimento de onda i, obtida dos espectros experimentais, permite, em certas condições, tirar conclusões sobre o número de espécies que fazem parte do sistema em estudo (Tabela 4.2). É possível aplicar métodos gráficos a sistemas em que o número de espécies absorventes seja igual ou inferior a três sendo os diagramas de absorvâncias mais utilizados os, diagramas de absorvância (A); diagrama de diferenças de absorvância (AD); e diagramas do quociente das diferenças de absorvâncias (ADQ) (exemplos em anexo).[91,93]

A análise das curvas de titulação espectrofotométricas pode também permitir tirar conclusões sobre o número de componentes de um determinado sistema, através dos pontos de inflexão observados. Para sistemas que envolvam mais de três espécies absorventes apenas métodos computacionais podem permitir a determinação do número de componentes de um dado sistema.

TRATAMENTO MATEMÁTICO

Após a definição do modelo que poderá descrever o sistema em estudo, os resultados experimentais serão tratados de modo a permitirem a obtenção das constantes de equilíbrio. Quando se estudam sistemas simples ou sistemas em que é possível pressupor certas simplificações é possível aplicar transformações lineares da isotérmica de ligação e obter as constantes de equilíbrio por regressão linear – o método de Benesi-Hildbrand constitui um exemplo deste tipo de aplicação.[65] Estas são muitas vezes utilizadas na obtenção de constantes de acidez de ácidos monopróticos e na obtenção de constantes de formação cujos dados espectrais foram obtidos em soluções com excesso de ligando ou de ião metálico (algumas destas transformações encontram-se sumariadas na Tabela 4.3).[96-99]

Estes métodos matemáticos simplificados são frequentemente usados na obtenção de constantes de equilíbrio por espectrofotometria de UV/VIS. No entanto, dada a existência de alguns programas de regressão não linear para o cálculo de constantes de equilíbrio por espectrofotometria de UV/VIS, estes resultados experimentais são por vezes apenas utilizados para obtenção de estimativas das constantes de equilíbrio e informação sobre o número de componentes do sistema. Na Tabela 4.4 encontram-se indicados alguns dos programas de regressão não linear citados correntemente na literatura científica.

A obtenção de valores de constantes de equilíbrio utilizando resultados espectrofotométricos depende do conhecimento das absortividades molares das espécies do sistema em estudo e se não for possível a sua determinação experimental, vão ser mais um parâmetro a determinar conjuntamente com as constantes de equilíbrio, o que pode fornecer valores menos fiáveis para ambos os parâmetros dada a intercorrelação entre eles.[100,101] No entanto, a possibilidade de os obter permite considerar a espectrofotometria como um método que fornece mais informação sobre a plausibilidade do modelo proposto para o sistema em estudo.[93,102,103]

Tabela 4.3 **Transformacões lineares utilizadas na determinação de constantes de acidez e de formação por espectrofotometria de UV/VIS**

CONSTANTES DE ACIDEZ

Variável dependente	Variável independente	Declive	Ordenada	Ref.
$\log c_{H^+}$	$\log (A_L - A)/(A - A_{SL})$	1	$-\log K_a$	96
$c_{H^+}(A - A_L)$	A	A_L	$1/(-K_a)$	97
$c_{H^+}(A_L - A)$	$c_{H^+} A (A_L - A)$	K_a	A_{SL}	98
$c_{H^+}(A_L - A)$	c_{H^+}	$-K_a$	$(A_L - A_{SL})$	99

CONSTANTES DE FORMAÇÃO

Equação e espéciesque absorvem	Transformação
Soluções com excesso de metal (S)	
$S + LH_x = SLH_{(x-q)} + qH$ $A = \varepsilon \lvert SLH_{(x-q)} \rvert$	$\log \dfrac{A}{(\varepsilon L - A)} = q\left(-\log c_{H^+}\right) + \log S + \log \beta$
$mS + n\,LH_x = S_m L_n H_{(nx-q)} + qH$ $A = \varepsilon \lvert S_m L_n H_x \rvert + \varepsilon_{LHx} \lvert LH_x \rvert +$ $+\varepsilon_{LHx-1} \lvert LH_{x-1} \rvert + \varepsilon_S S$	$\log \dfrac{\left(Z\left(A - \varepsilon_S S - \varepsilon_L L\right)\left(Z\varepsilon - n\varepsilon_L L\right)^{n-1}\right)}{\left(\varepsilon L - n\left(A - \varepsilon_S S\right)^n\right)} = q\left(-\log c_{H^+}\right) + m \log S + \log \beta$
Soluções com excesso de ligando (L)	
$S + n\,LH_x = SL_n H_{(nx-q)} + qH$ $A = \varepsilon_M M + \varepsilon \lvert SL_n H_{(nx-q)} \rvert$	$\log \dfrac{A - \varepsilon_s S}{\varepsilon S - A} = n \log L + qp\left(-\log c_{H^+}\right) + \log \beta$

Notas: $\varepsilon_L = \varepsilon_{LHx} + \varepsilon_{LHx-1}\, K_a/h$; $Z = 1 + K_a/h$; em que h é a concentrção de catião hidrogénioa

Tabela 4.4 Programas computacionais mais utilizados em espectrofotometria de UV/VIS

Programa	Função a minimizar	Método iterativo	Ref.
DALSFEK	Absorvância	Marquardt	104
PSEQUAD	Absorvância	Gauss-Newton	105
SQUAD 75 -78	Absorvância	Gauss-Newton	106
SQUAD 80 -84	Absorvância	Gauss-Newton	107

Estas últimas considerações permitem concluir que o estudo de equilíbrio químico em solução deve ser efectuado, sempre que possível, pela aplicação de mais do que uma técnica experimental o que poderá permitir verificar não só a fiabilidade das técnicas utilizadas, como também fornecer maior informação sobre os sistemas em estudo. Como exemplo, se for possível estudar um determinado sistema aplicando conjuntamente métodos potenciométricos e espectrofotométricos alia-se a precisão dos valores das constantes obtidas potenciometricamente com a exactidão do modelo determinado espectrofotometricamente.

3 Ressonância magnética nuclear

A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA, RMN, TEM SIDO MAIS UTILIZADA na obtenção de informação estrutural sobre complexos em solução do que propriamente para a obtenção de constantes de equilíbrio. No entanto, os desvios químicos e por vezes as constantes de acoplamento têm sido utilizados para este efeito.[108] Dada a baixa frequência da radiação utilizada (radiofrequência) a obtenção de constantes de equilíbrio vai depender da

velocidade de interconversão do sistema em estudo. Se a velocidade de interconversão complexo molecular/espécies livres for lenta na escala de tempo de RMN, obtêm-se bandas independentes para cada um dos estados e por determinação da área das bandas, que é proporcional à concentração das espécies que lhe deram origem, é possível o cálculo de constantes de equilíbrio. Se esta velocidade de interconversão for rápida apenas se obtem valores médios para os desvios químicos e para as constantes de acoplamento. Neste último caso, o mais frequente na obtenção de constantes de equilíbrio em solução aquosa, é possível para a reacção traduzida pela equação

$$mS + nL \rightleftharpoons S_mL_n$$

a seguinte relação entre o desvio químico observado e as concentrações no equilíbrio das complexos existentes

$$\delta_{obs} = \Sigma_{m=1}\Sigma_{n=0} (\delta_{mn}\, m|S_mL_n| / |S|_t) \qquad (4.17)$$

Esta equação está relacionada com as constantes de equilíbrio e a sua resolução desta equação será efectuada, em função dos parâmetros desconhecidos, através de métodos matemáticos lineares e/ou não lineares de modo idêntico à efectuada para a espectrofotometria UV/VIS. De notar, que tal como observado para métodos espectrofotométricos, estas equacões requerem o conhecimento dos desvios químicos dos complexos formados, δ_{mn}, quantidades que normalmente não são conhecidas.

A obtenção de constantes de equilíbrio por RMN tem sido efectuada principalmente para sistemas simples ou em condições experimentais que permitem simplificações, de modo a serem utilizados métodos lineares. Apenas muito recentemente foi desenvolvido[109] um programa de domínio público que utiliza a regressão não linear no cálculo de constantes de equilíbrio por RMN, embora tenham sido publicados resultados determinados computacionalmente, utilizando programas desenvolvidos nos laboratórios que as publicaram.[110,111]

A Ressonância magnética nuclear pode ser uma técnica bastante útil na obtenção de constantes de equilíbrio, principalmente para sistemas que não possam ser estudados por potenciometria ou espectrofotometria UV/VIS, contudo a sua utilização deve ser efectuada com cuidado dado o número de variáveis que podem influenciar os desvios químicos observados. Pelo facto de necessitar de concentrações relativamente elevadas (cada vez menores, dadas as evoluções instrumentais desta técnica) a obtenção experimental de constantes de equilíbrio deve ser efectuada na presença de electrólitos inertes para permitir comparar os resultados com os fornecidos por outros métodos. No entanto, dada a sensibilidade desta técnica os valores das constantes obtidas podem ser muito afectados pela presença de iões em solução, pelo que antes de utilizar um electrólito inerte é necessário efectuar estudos preliminares, para cada sistema em estudo, de modo a garantir a não interferência dos seus iões nos resultados finais obtidos. O composto utilizado como referência interna de desvios químicos pode também influenciar os valores das constantes de equilíbrio, e convem sempre verificar se a variação dos desvios químicos, de um determinado sistema em estudo, é independente da referência utilizada.

A comparação de valores obtidos por RMN e por outras técnicas deve ser efectuada tendo sempre presente as condições experimentais utilizadas em cada um dos casos, principalmente no que diz respeito à ordem de grandeza das concentrações utilizadas, pois a estequiometria e a concentração das espécies formadas podem ser afectadas por estas.

Pelas "limitações" apontadas no parágrafo anterior, é evidente que a RMN não constitui uma das técnicas de escolha para a obtenção de valores numéricos das constantes de equilíbrio já que estes podem ser pouco precisos/exactos, contudo a vantagens de obter informação estrutural sobre os compostos formados pode fornecer indicações importantes para o

suporte do modelo químico utilizado ou sugerir alterações nesse mesmo modelo. Assim, a sua utilização no estudo de sistemas de equilíbrio em solução deve ser incentivado, de preferência conjuntamente com uma outra técnica experimental que forneça valores precisos de constantes de equilíbrio (por exemplo potenciometria), de modo a ser possível obter informação cada vez mais precisa e exacta sobre estes sistemas, incluindo suporte para o modelo proposto para descrever esse sistema.

4 A escolha de métodos experimentais

Apenas as técnicas utilizadas neste trabalho na obtenção de constantes de equilíbrio foram aqui referidas. Cada técnica tem as suas vantagens e as suas limitações sendo sem dúvida a potenciometria e a espectrofotometria de UV/VIS as técnicas mais utilizadas neste tipo de trabalhos, pois a instrumentação utilizada é corrente na maioria dos laboratórios, mas também por fornecerem valores que geralmente são bastante precisos. Os métodos experimentais a utilizar na obtenção de constantes de equilíbrio em solução devem ser escolhidos tendo em conta o sistema que se vai estudar e as propriedades químicas das substâncias que o constituem. A precisão com que se obtêm os valores das constantes de equilíbrio é um dado importante, mas mais importante é a escolha correcta do modelo químico em estudo e este só pode ser obtido através da análise das propriedades químicas das substâncias em solução. Só a utilização simultânea de vários métodos experimentais permitirá tirar conclusões sobre a fiabilidade do modelo químico proposto e embora alguns métodos forneçam valores menos precisos para as constantes de equilíbrio a informação química que poderão fornecer permitirá caracterizar cada vez melhor o equilíbrio químico em solução.

Capítulo

5 Complexos Ternários

A IMPORTÂNCIA DECISIVA DOS CATIÕES METÁLICOS NA REACTIVIDADE, ESTABILIDADE e estrutura de vários sistemas biológicos faz com que o estudo das interacções catião metálico/ligandos biológicos seja essencial para a compreensão dos mecanismos de funcionamento destes sistemas. Sob condições biológicas é de prever a existência de equilíbrios simultâneos entre os vários catiões metálicos e ligandos existentes num determinado fluído biológico, sendo inúmeras as interacções possíveis entre estes dois tipos de espécies. As espécies mais simples que se podem formar em sistemas biológicos, face à enorme variedade de moléculas coordenantes neles existentes, são complexos ternários que contêm além do solvente, um catião metálico e dois ligandos diferentes.[112] Tem-se verificado que este modelo simples permite interpretar muitos processos biológicos específicos como, por exemplo, o complexo enzima/catião metálico/substracto no decurso de uma reacção enzimática,[113] interacções intermoleculares entre ligandos promovidas por catiões metálicos (por exemplo empilhamento de nucleotídeos e/ou nucleosídeos com aminoácidos,[114] transporte, absorção e armazenamento de catiões metálicos e/ou de substâncias activas através

de membranas e interacções fármaco (medicamento)/receptor.[115, 116, 117]

A importância destes sistemas ternários promoveu o estudo em solução de complexos de catiões metálicos com diferentes ligandos de relevância biológica e permitiu identificar parâmetros que favorecem a formação destes complexos. Neste capítulo faz-se uma descrição dos dois métodos utilizados na quantificação da estabilidade de complexos ternários (mistos) relativamente à dos complexos binários que lhes podem dar origem, são discutidas as vantagens e desvantagens de cada um deles e descrevem-se os vários factores que influenciam a formação desses complexos.

1 Caracterização da estabilidade de complexos ternários

A PARTIR DO CONHECIMENTO DA CONSTANTE DE FORMAÇÃO GLOBAL, β_{pqrs}, DE UM complexo ternário $M_pH_qA_rB_s$ é possível relacionar a estabilidade desta espécie com a dos compostos binários correspondentes, $M_tH_uA_v$ e $M_xH_yB_z$, e assim detectar a existência de interacções que favoreçam a formação da espécie ternária.[112, 118, 119] São dois os métodos correntemente utilizados para quantificar a formação preferencial deste tipo de complexos, sendo a escolha do método mais adequado determinada com base nas características do sistema em estudo.

DEFINIÇÃO DE $\Delta\log K$

Um dos métodos compara a diferença de estabilidade para as reacções através das constantes de formação que lhe estão associadas

$$M + B \rightleftharpoons MB \qquad K^{M}_{MB} = |MB| / |M|\,|B| \qquad (5.1a)$$

$$MA + B \rightleftharpoons MAB \qquad K^{MA}_{MAB} = |MAB| / |MA|\,|B| \qquad (5.2a)$$

ou

$$M + A \rightleftharpoons MA \qquad K^{M}_{MA} = |MA| / |M|\,|A| \qquad (5.1b)$$

$$MB + A \rightleftharpoons MBA \qquad K^{MA}_{MBA} = |MBA| / |MB|\,|A| \qquad (5.2b)$$

através da grandeza $\Delta\log K$ definida pela equação:

$$\Delta\log K = \log K^{MA}_{MAB} - \log K^{M}_{MB} = \log K^{MB}_{MBA} - \log K^{M}_{MA} \qquad (5.3)$$

em que se assume que, para espécies lábeis em solução, a estrutura do complexo MAB é idêntica à de MBA .

A grandeza $\Delta\log K$ é, por seu lado, a constante de equilíbrio associada à reacção

$$MA + MB \rightleftharpoons MAB + M \qquad (5.4)$$

e pode ser calculada através do sistema cíclico

$$\begin{array}{ccc} & \overset{K^{M}_{MA}}{} & \\ M + A + B & \rightleftharpoons & MA + B \\ K^{M}_{MB} \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow K^{MA}_{MAB} \\ MB + A & \rightleftharpoons & MAB \\ & \underset{K^{MB}_{MBA}}{} & \end{array}$$

se se atender a que

$$\log K^{MB}_{MBA} = \log K^{MA}_{MAB} + \log K^{M}_{MA} - \log K^{M}_{MB} \qquad (5.5)$$

É de notar que uma análise do sistema cíclico mostra que a contribuição de ambos os ligandos é a mesma para a formação do complexo ternário, independentemente da ordem por que são adicionados ao catião metálico.[112, 120]

Definição de $\log X$

Num segundo método, a preferência para a formação de complexos ternários é quantificada pela grandeza, $\log X$

$$X = \frac{|MAB|^2}{|MA_2||MB_2|} \qquad (5.6)$$

que se pode supor ser a constante de equilíbrio associada à seguinte reacção hipotética

$$MA_2 + MB_2 \rightleftharpoons 2\,MAB \qquad (5.6a)$$

que depende das constantes de formação das espécies binárias MA_2 e MB_2.

A partir dos equilíbrios

$$M + 2A \rightleftharpoons MA_2 \qquad \beta^{M}_{MA_2} = |MA_2| \,/\, |M|\,|A|^2 \qquad (5.7)$$

$$M + 2B \rightleftharpoons MB_2 \qquad \beta^{M}_{MB_2} = |MB_2| \,/\, |M|\,|B|^2 \qquad (5.8)$$

$$M + A + B \rightleftharpoons MAB \qquad \beta^{M}_{MAB} = |MAB| \,/\, |M|\,|A|\,|B| \qquad (5.9)$$

obtém-se a seguinte expressão para X

$$\log X = 2 \log \beta^{M}_{MAB} - (\log \beta^{M}_{MA_2} + \log \beta^{M}_{MB_2}) \qquad (5.10)$$

Para qualquer uma das grandezas definidas ($\Delta\log K$ e $\log X$) é possível calcular, com base em considerações puramente estatísticas, o valor teórico que lhes está associado na ausência de interacções que favoreçam a formação de complexos ternários. Estes valores fornecem a base de comparação para os valores calculados a partir de resultados experimentais para casos concretos, comparação que possibilita aferir a formação preferencial de complexos ternários.

Finalmente, convém referir que as duas grandezas, $\Delta\log K$ e $\log X$, podem ser relacionadas entre si pelas equações de definição 5.3 e 5.10 que fornecem, por eliminação de $\log K^{MA}_{MAB}$, a expressão

$$\log X + 2(\Delta\log K) = -\log K^{M}_{MA} - \log K^{M}_{MB} + \log K^{MA}_{MA_2} + \log K^{MB}_{MB_2} \qquad (5.11)$$

Tabela 5.1 **Exemplo de valores estatísticos de $\Delta\log K$ para diferentes geometrias**

Geometria	$Ligando_1$	$Ligando_2$	$\Delta\log K_{est}$
Octaédrica	bidentado	bidentado	-0,40
	bidentado	monodentado	-0,48
	monodentado	monodentado	-0,08
Quadrada	bidentado	bidentado	-0,60
(plana)	bidentado	monodentado	-0,30
	monodentado	monodentado	-0,12
Tetaédrica	bidentado	bidentado	-0,78
	bidentado	monodentado	-0,48
	monodentado	monodentado	-0,12

que permite obter a relação

$$\log X + 2\,(\Delta\log K) = \Delta\log K(MA_2) - \Delta\log K(MB_2) \qquad (5.12)$$

em que $\Delta\log K(MX_2) = \log K^{MX}_{MX_2} - \log K^{M}_{MX}$.

Valor estatístico de $\Delta\log K$

Para complexos octaédricos, o valor de $\Delta\log K$ para ligandos bidentados é

$$\log\left(\frac{5}{12}\right) \cong -0,4$$

O valor estatístico esperado para $\Delta\log K$ é determinado pela denticidade dos ligandos e pelo número de coordenação do ião metálico, pelo que é função do sistema em estudo. Por exemplo, no caso de A e B serem ligandos bidentados e assumindo um número de coordenação seis para o catião metálico, há num octaédro regular doze possibilidades de coordenação para o primeiro ligando, mas apenas cinco para o segundo, pelo que $\Delta\log K_{oct}$ = -0,4. Na Tabela 5.1 encontram-se sumariados os valores estatísticos de $\Delta\log K$ para várias geometrias.[112]

VALOR ESTATÍSTICO DE LOG X

O valor estatístico de log X não depende directamente nem da geometria do complexo nem da denticidade do ligando e depende apenas de considerações probabilísticas. Numa solução com um catião metálico e com n ligandos monodentados diferentes em concentrações equimoleculares o número de complexos $ML^1_{a_1}L^2_{a_2}...L^n_{a_n}$ (em que os índices superiores representam ligandos diferentes e os índices inferiores representam o número de ligandos de cada tipo existentes no complexo e podem ser positivos ou nulos) que se podem formar é dado por

$$S = \frac{n!}{\prod_{i=1}^{n} a_i!} \qquad (5.13)$$

em que n é o número total de ligandos e a_i corresponde ao número de ligandos idênticos que existem no complexo. Assim, para complexos octaédricos aquele que tem todos os ligandos iguais só pode ser formado de uma maneira (6!/6!), enquanto que um complexo com os seis ligandos diferentes pode ser formado de 720 maneiras diferentes (6!) . A equação 5.13 permite, então, calcular o factor estatístico para qualquer espécie mista. Sendo

$$\log \beta^M_{MA_xB_yC_z} = (x/X) \log \beta^M_{MA_x} + (y/Y) \log \beta^M_{MB_y} + ... + \log S \qquad (5.14)$$

em que x, y e z são o número de ligandos A, B e C, respectivamente, no complexo misto, X,Y e Z são o número de ligandos nos complexos binários correspondentes e S é o factor numérico definido atrás e que traduz o facto da formação do complexo misto ser mais favorável do que a dos binários correspondentes. A comparação desta equação, para um complexo MAB, com a equação (5.10) mostra que $\log X = 2 \log S$, o que permite o cálculo do valor estatístico de X.[121]

Para complexos ternários MAB, n=2 pelo que S=2; assim a partir de

$$\log X = 2 \log S$$

obtém-se $X = S^2 = 4$, donde o valor de log X para complexos ternários será 0,6.

LIMITAÇÕES DESTES MÉTODOS

A obtenção de valores experimentais para as constantes de formação definidas anteriormente permite o cálculo de valores experimentais para estas duas grandezas e, a comparação destes valores com os esperados estatisti-

camente permite tentar detectar qualquer estabilidade adicional na formação de complexos ternários. Em muitos sistema verifica-se que os valores experimentais são superiores aos determinados teoricamente o que é indicativo da existência de factores, para além da contribuição meramente estatística, que influenciam a estabilidade desses complexos.

A utilização do método de log X requer o conhecimento das constantes de formação de MA_2 e MB_2 que são muitas vezes desconhecidas, principalmente no caso de ligandos com elevados requisitos estereoquímicos[112, 122] o que o torna este método impraticável na caracterização de qualquer factor estabilizante. Mesmo quando as constantes de formação destas espécies com ligandos volumosos são conhecidas, o impedimento estereoquímico que pode advir da introdução de um segundo ligando igual pode fornecer valores para log X que são irrelevantes na análise da formação do complexo misto.

Um outro factor a ter em conta é a contribuição electrostática, neutralização de carga, que vai influenciar de maneira diferente as duas grandezas. Não há contribuição para $\Delta\log K$ quando os dois ligandos são neutros, enquanto que para log X os factores electrostáticos anulam-se quando a carga dos dois ligandos é igual.[112, 118]

Recordar que $\Delta\log K$ é definido em função de complexos binários 1:1, enquanto log X é definido em termos de complexos binários 1:2

Qualquer uma das grandezas, $\Delta\log K$ e log X pode ser utilizada na quantificação da estabilidade de complexos ternários, sendo a primeira mais utilizada para sistemas em que a razão metal/ligando é superior a 1 e a segunda para sistemas em que esta mesma razão é inferior a 1, como advém das suas próprias definições

As considerações efectuadas permitem concluir que nenhum dos métodos é ideal e que a sua utilização deve sempre ser efectuada ponderando todos os parâmetros que podem influenciar os valores obtidos. No entanto, $\Delta\log K$ tem a vantagem de apenas necessitar dos valores das

constantes de formação dos complexos binários 1:1, ccontudo, o seu valor estatístico depende da denticidade dos ligandos e do número de coordenação do catião metálico, factores que muitas vezes apenas podem ser inferidos.

2 Factores que influenciam a formação de complexos ternários

Influência da neutralização de carga

$Cu(en)_2^{2+} + Cu(ox)_2^{2-} \rightleftharpoons 2Cu(en)(ox)$
$\log X = 0{,}94$

$Cu(en)^{2+} + Cu(ox)^{-} \rightleftharpoons Cu(en)(ox) + Cu^{2+}$
$\Delta\log K = -0{,}79$

$\log X >$ valor estatístico
$\Delta\log K =$ valor estatístico

Influência estereoquímica

$Cu(en)_2^{2+} + Cu(et_2en)_2^{2+} \rightleftharpoons 2Cu(en)(et_2en)^{2+}$
$\log X = 1{,}83$

$Cu(en)^{2+} + Cu(et_2en)^{2+} \rightleftharpoons Cu(en)(et_2en)^{2+} + Cu^{2+}$
$\Delta\log K = -1{,}40$

$\log X >$ valor estatístico
$\Delta\log K <$ valor estatístico

A EXISTÊNCIA DE COMPLEXOS TERNÁRIOS DEPENDE, COMO É ÓBVIO, DAS CARACTERÍSTICAS do sistema, no entanto, a sua formação parece não ocorrer quando existe impedimento estereoquímico, quando a geometria dos complexos simples MA e MB é diferente (por exemplo MA é quadrada plana e MB octaédrica), quando existe estabilização adicional para um dos complexos binários ML_2 (L=A ou B) ou quando os complexos binários têm estados de spin diferentes. Quando a constante de formação destes complexos é superior, em muitos dos casos, à esperada com base em considerações puramente estatísticas devem existir contribuições não estatísticas que influenciam a sua formação. De entre estas as que parecem influenciar mais marcadamente a formação de complexos ternários são a neutralização de carga, os efeitos estereoquímicos, a formação de ligações π e a ocorrência de interacções entre ligandos. No entanto, o aumento de estabilidade provocado pelos dois primeiros factores pode produzir resultados diferentes para cada um dos métodos utilizados na caracterização da estabilidade dos complexos ternários (ver anexo).

NEUTRALIZAÇÃO DE CARGA

A neutralização de carga na formação de complexos ternários, relativamente à dos complexos binários que lhes dão origem, provoca um aumento da estabilidade dos primeiros pois a neutralização afecta favoravelmente a variação da entalpia (atracção colombiana metal/ligando) e da entropia (libertação de moléculas do solvente) que acompanha a formação do complexo ternário (exemplo em anexo).[123, 124, 125]

Tabela 5.2 **Dependência de Δlog K e log X de complexos ternários quadrados de Cu^{2+} com o número de lados dos anéis quelantos formados com ligandos bidentados**

Ligando	Δlog *K*	log *X*	Ligando	Δlog *K*	log *X*
		Sistema en/Cu2+/Ligando			
		(en = 1,2-diaminoetano; anel quelante de cinco lados)			
Ligandos com anéis quelantes de cinco lados			Ligandos com anéis quelantes de seis lados		
ox	-0,79	0,94	mal	-0,76	2,31
gly	-0,80	1,03	b-al	-0,93	0,88
1,2-prop	-1,26	0,31	1,3-prop	-1,49	1,00
		Sistema 1,3-prop/Cu2+/Ligando			
		(1,3-prop = 1,3-diaminopropano; anel quelante de seis lados)			
Ligandos com anéis quelantes de cinco lados			Ligandos com anéis quelantes de seis lados		
ox	-0,35	3,14	mal	-1,30	2,55
gly	-0,79	2,37	β-al	-1,18	1,70
1,2-prop	-1,46	1,13			

Repulsão estereoquímica

Os efeitos estereoquímicos estão relacionados com o tipo de ligandos de duas maneiras distintas; tamanho do ligando (ver exemplo em anexo) e denticidade dos anéis quelantes que eventualmente possam existir. Vários resultados experimentais obtidos para de sistemas ternários com ligandos quelantes mostram que, salvo raras excepções, os complexos ternários quadrados com dois anéis quelantes, um de cinco lados e outro de seis, são mais estáveis que os que contêm dois ligandos quelantes com o mesmo número de lados (cinco-cinco ou seis-seis) e que de entre estes últimos os que contêm ligandos quelantes de seis lados são mais estáveis (Tabela 5.2).[126, 127]

RETRODOAÇÃO π

Para sistemas que contenham ligandos aromáticos os valores experimentais de $\Delta\log K$ e de $\log X$ são normalmente muito superiores quer aos esperados estatisticamente quer, também, aos observados com ligandos alifáticos e se um dos ligandos (seja o segundo ligando) coordenar por um átomo de oxigénio, este aumento de estabilidade é ainda superior. Este comportamento é atribuído à possibilidade de retrodoação π entre as orbitais dπ do metal e as orbitais pπ dos ligandos aromáticos, com a correspondente diminuição da densidade electrónica do catião metálico o que favorece a sua coordenação a átomos mais electronegativos. Este efeito pode também ser explicado com base na definição de Pearson de ácidos e de bases macios e duros; neste caso a retrodoação torna o catião metálico mais duro o que lhe confere uma maior preferência por ligandos que se coordenem com átomos duros, favorecendo a coordenação dos complexos binários metal/ligando aromático a ligandos com átomos duros, obtendo-se a seguinte ordem de preferência relativa aos átomos coordenadores de ligandos bidentados: N,N < N,O < O,O[114, 128-136]. Paralelamente, verifica-se que a densidade electrónica do ligando que se coordena por átomos de oxigénio também tem influência na estabilidade do complexo ternário, ligandos com sistemas deslocalizados π parecem também aumentar a estabilidade do complexo ternário havendo o que se pode denominar de efeito cooperativo entre os sistemas π dos ligandos coordenados. Estes dois efeitos podem ser observados claramente nos valores de $\Delta\log K$ e de $\log X$ da Tabela 5.3.

INTERACÇÕES ENTRE LIGANDOS

Influência da interacção entre ligandos para Cu/bipy/ligando$_3$

Ligando$_3$	$\Delta\log K$
Etionina	- 0,26
Fenilalanina	0,20
Triptofano	0,96

O aspecto que parece contribuir de uma maneira mais relevante para a estabilidade de complexos ternários está associado com as várias interacções possíveis entre os dois ligandos coordenados a um mesmo catião metálico. As interacções hidrofóbicas entre dois ligandos alifáticos ou entre um ligando alifático e um aromático, e as interacções de empilhamento entre dois ligandos aromáticos (estas muitas vezes englobadas nas

Tabela 5.3 **Dependência dos valores de Δlog K e log X de complexos ternários quadrados de Cu^{2+} com a natureza dos átomos coordenadores[128]**

Ligando$_1$ (N–N)	Ligando$_2$	átomos coordenados	Δlog *K*	log *X*
en	pyr	O - O	-0,76	2,65
	ser	N - O	-0,87	0,79
	mal	O - O	-0,76	2,31
ha	pyr	O - O	-0,48	4,36
	ser	N - O	-0,58	2,95
bipy	pyr	O - O	0,43	6,15
	gly	N - O	-0,35	3,0
	mal	O - O	0,27	5,49
	6,7-dns	O - O	0,69	6,60
o-phen	pyr	O - O	0,35	6,09
	6,7-dns	O - O	0,82	6,96

Transferência de carga entre ligandos

Sistema	logK_{el}	Δlog*K*
Bipy+Ade	1,36	—
Bipy+AMP	1,41	—
Bipy+ATP	0,91	—
Cu+Bipy+Ade	1,52	—
Cu+Bipy+AMP	3,78	0,50
Cu+Bipy+ATP	6,96	0,53

anteriores), são as mais observadas em complexos ternários[112,113,114] que contêm ligandos biológicos. Este tipo de interacções além de estabilizar a formação destes complexos promove, também, o estabelecimento de estruturas bem determinadas que permitem mimetizar reacções específicas e selectivas que ocorrem nos sistemas biológicos.[137-146] Estas interacções entre ligandos podem englobar ligações por ponte de hidrogénio, interacções polares e mesmo interacções de transferência de carga, todas promovidas pela presença de uma estrutura tornada possível pela coordenação ao catião metálico.[112, 147]

As características gerais destes sistemas mostram que existe um efeito cooperativo entre os ligandos intervenientes e o catião metálico, isto é, a ligação metal/ligando favorece a formação de interacção entre os ligandos e esta favorece a ligação metal/ligando, o que se traduz num aumento de estabilidade do complexo ternário.

EQUILÍBRIO FECHADO/ABERTO

O estudo de interacções entre ligandos coordenados ao mesmo catião metálico sugeriu[148-150] a existência de um equilíbrio molecular entre duas espécies que ocorrem em solução, uma em que não existe interacção entre os ligandos e outra em que esta está presente:



É possível definir uma constante para este equilíbrio, que pode ser esquematizado pela equação seguinte

$$|MAB|_{ab} \rightleftharpoons |MAB|_{fe} \qquad K' = |MAB|_{fe} / |MAB|_{ab} \qquad (5.15)$$

em que o índice *ab* representa a forma em que não existe interacção entre os ligandos e o índice *fe* a outra forma. Os valores de K' podem ser determinados considerando que se a espécie ternária formada no equilíbrio definido na equação 5.4 existe em duas formas isoméricas, então os valores experimentais de $\Delta\log K_{M/exp}$ serão definidos por

$$10^{\Delta\log K_{M/exp}} = \frac{\left(|MAB|_{ab} + |MAB|_{fe}\right)|M|}{|MA|\,|MB|} \qquad (5.16)$$

mas se não existirem interacções intramoleculares entre os ligandos da espécie ternária então

$$10^{\Delta \log K_{M/ab}} = \frac{\left(|MAB|_{ab}\right)|M|}{|MA|\,|MB|} \qquad (5.17)$$

Combinando estas três últimas equações, 5.15—5.17, obtém-se

$$K' = \frac{10^{\Delta \log K_{M/exp}}}{10^{\Delta \log K_{M/ab}}} - 1 \qquad (5.18)$$

o que permite a determinação de K' se tanto $\Delta \log K_{M/exp}$ como $\Delta \log K_{M/ab}$ forem conhecidos. $\Delta \log K_{M/exp}$ são os valores experimentais da grandeza $\Delta \log K$ para os sistemas em estudo (MAB, MAC, MAD,etc) e $\Delta \log K_{M/ab}$ é na mesma o valor experimental de $\Delta \log K$ mas para um sistema onde não existe uma interacção molecular entre os ligandos (por exemplo MAD). Por exemplo na determinação de constantes de equilíbrio para sistemas que contêm aminoácidos é usual considerar que os complexos ternários formados com o aminoácido alanina não apresenta "isómero" fechado e o valor experimental de $\Delta \log K_{MA(ala)}$ é usado como o valor de $\Delta \log K_{M/ab}$ para uma determinada família de complexos ternários (exemplo no anexo).

Exemplo de determinação de K'

Sistemas	$\Delta \log K_{M/exp}$	$\Delta \log K_{M/ab}$
Cu(phen)(leu)	-0,35	
Zn(phen)(leu)	+0,11	
Cu(phen)(ala)		-0,41
Zn(phen)(ala)		-0,02

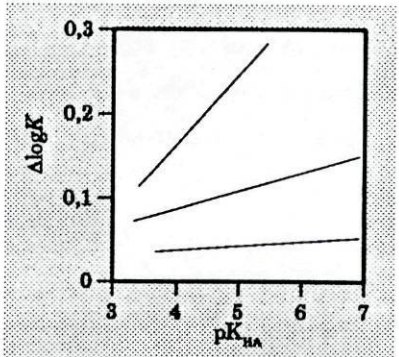
então pela equação 5.18

	K'	
%(MAB)$_{fe}$		
Cu(phen)(leu)	0,15	13
Zn(phen)(leu)	0,35	26

Os valores de $\Delta \log K_{M/exp}$ e $\Delta \log K_{M/ab}$ são determinados pela equação 5.3 com base nos valores experimentais das constantes de formação dos sistemas.

Basicidade e estabilidade

A quantificação da estabilidade de complexos ternários através das duas grandezas referidas em 5.1 é independente da basicidade dos ligandos mas verifica-se que, tal como para os complexos binários em que ocorre uma relação linear entre a constante de formação do complexo e a constante de acidez do ligando, para os complexos ternários também se observa uma relação linear entre qualquer das grandezas, $\Delta \log K$ e $\log X$, e as constantes de acidez de ligandos.[112, 118, 151] Esta dependência é mais pronunciada se um dos ligandos for uma amina aromática o que mostra que a basicidade dos ligandos é sensível à distribuição electrónica π, embora o catião hidrogénio só esteja ligado por uma ligação σ.[118] Estes gráficos têm a vantagem, de permitir estimar a estabilidade de complexos ternários, que ainda não tenham sido estudados experimentalmente.



Relação entre $\Delta \log K$ e pK_{HA} para os sistemas ternários Cu(bipy) (carboxilato)

3 Considerações gerais

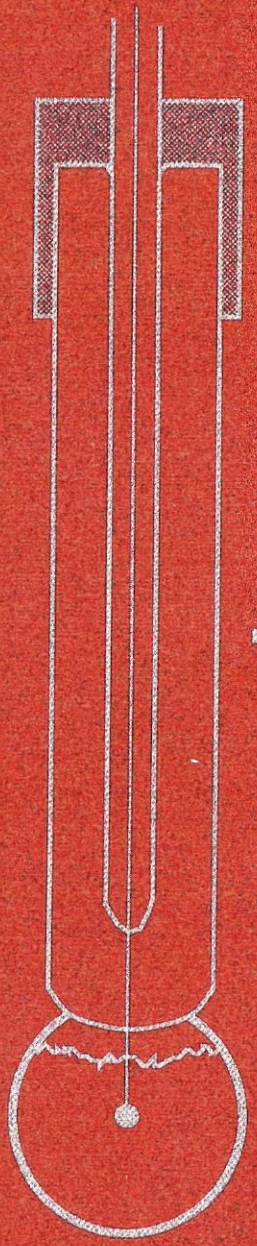
NESTE CAPÍTULO FOI FEITA UMA DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS NA quantificação da formação de complexos ternários e dos factores que predominantemente influenciam a formação destes complexos. As indicações aqui mencionadas foram obtidas através da análise de inúmeros resultados experimentais de sistemas de complexos ternários, principalmente com ligandos de relevância biológica devendo-se a sua sistematização a Helmut Sigel que iniciou estes estudos na década de 70. Os anos 70 e 80 foram frutíferos em publicações que permitiram mostrar a existência de factores que influenciam a estabilidade de complexos ternários e verifica-se, actualmente, que esta estabilidade é especialmente favorecida pela existência de retrodoação π e pela existência de interacções que possam ocorrer entre os ligandos. Outros factores contribuintes, como o efeito estereoquímico, o efeito de quelatação e mesmo uma mudança no número de coordenação do catião metálico[152] também têm sido evocados para explicar a relação $K_n<K_{n+1}$ por vezes encontrada para as constantes de formação dos complexos binários.

Os factores que influenciam a estabilidade de complexos ternários foram aqui apresentados com exemplos alusivos apenas à existência individual de cada um deles, contudo, a contribuição simultânea de vários destes factores para a formação de complexos ternários, promoverá a sua formação e pode estar na base da formação de várias espécies mistas existentes em sistemas biológicos.

Os resultados já obtidos acerca da estabilidade de complexos ternários, principalmente com ligandos de relevância biológica, evidenciam a importância deste tipo de estudos na caracterização da estabilidade e selectividade de reacções biológicas e, embora não permitam explicar completamente a selectividade de um dado metal para um dado complexo bio-

lógico (p/ex: enzima /metal/substracto ou fármaco/metal/receptor), permite sugerir que a competição protão/catião metálico e o comportamento ácido/ base do catião metálico e dos ligandos desempenham um papel importante nesta selecção.

A maioria dos estudos de complexação são efectuados em solução aquosa, mas as reacções em sistema biológicos e principalmente as reacções que permitiram explicar o transporte de substâncias através de membranas ocorrem em fluídos biológicos que podem ter propriedades bastante diferentes das das soluções aquosas. No entanto, o efeito do solvente devido à complexidade da contribuição dos vários factores em jogo, momentos dipolares, propriedades dadoras das moléculas de solvente e possibilidade de formação de ligações de hidrogénio, não pode ser sistematizado. São raros os estudos efectuados em sistemas não aquosos mas será licito afirmar que a influência do solvente deve ser particularmente significativa quando a formação de complexos é acompanhada por variação de carga. No entanto, é necessário promover o estudo de equilíbrio químico em solventes não aquosos, aplicando o mesmo tipo de tratamento efectuado para sistemas aquosos, o que poderá fornecer informações valiosas para a compreensão do transporte de substâncias através de membranas.



Parte Segunda

$$pH(S) - (E_X - E_S)$$

A Metodologia

Capítulo

6 Metodologia Geral

Neste capítulo são descritas as condições experimentais globais utilizadas na execução deste trabalho, bem como a instrumentação, os reagentes e a preparação das soluções. As condições experimentais específicas usadas para cada sistema estudado serão descritas nos capítulos a eles respeitantes. É apresentada também a nomenclatura geral utilizada na descrição das constantes de formação globais e por fim descreve-se de uma maneira sucinta os programas computacionais que permitiram o cálculo das constantes de equilíbrio obtidas pelos diferentes métodos experimentais.

1 Reagentes e soluções

Reagentes

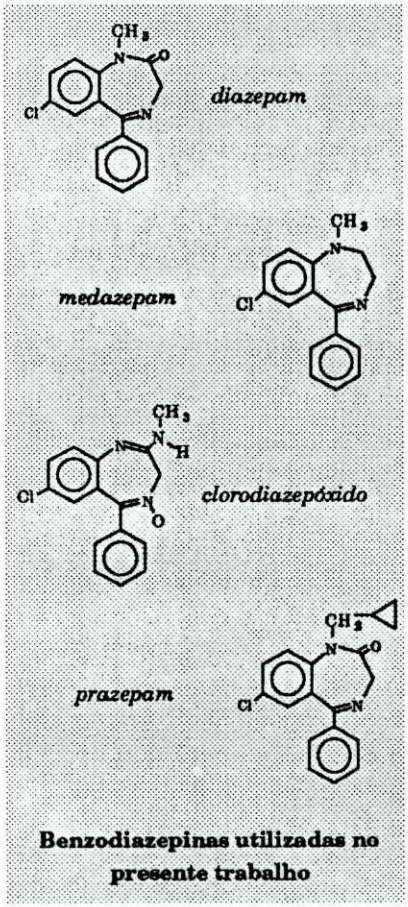
Soluções padrão	(Titrisol)
ácido nítrico	9964
ácido clorídrico	9973
EDTA	9992

A glicilglicina, os nitratos e os cloretos de potássio, de zinco, de cádmio, de sódio, de níquel, o perclorato de sódio, o nitrato de cálcio e o hidróxido de sódio foram de qualidade *pro analysi* e obtidos da Merck; as soluções padrão usadas foram também Merck (Titrisol; ver tabela anexa). A citidina foi obtida da Sigma ou da Aldrich e o ácido γ-aminobutírico da Sigma. As soluções padrão de nitrato de cobre (II) 0,1 *M* foram Radiometer S8756.

O metanol foi sempre Merck *pro analysi*. As benzodiazepinas utilizadas foram fornecidas por vários laboratórios da indústria farmacêutica (*diazepam*, Laboratórios Bial, *medazepam* e *clorodiazepóxido*, Hoffman La Roche; e *prazepam*, Warner Lambert Portuguesa / Parke Davis) e foram todas utilizadas sem qualquer purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas com água duplamente desionizada (condutividade inferior a 0,1 mS cm^{-1}).

SOLUÇÕES

As soluções de glicilglicina e de citidina utilizadas, em cada realização experimental, foram obtidas por diluição rigorosa de soluções mais concentradas preparadas, diariamente, por pesagem, numa balança Mettler AE163. A concentração da glicilglicina foi controlada potenciometricamente. As soluções das benzodiazepinas foram todas preparadas por pesagem e sempre que possível mantidas ao abrigo da luz para minimizar a sua decomposição.



Benzodiazepinas utilizadas no presente trabalho

As soluções de catião cobre(II) foram obtidas por diluição da solução padrão 0,1 *M*. As soluções de catião zinco(II), cádmio(II) e níquel(II) foram obtidas por diluição rigorosa de soluções mais concentradas, preparadas por pesagem e diluição dos respectivos sais e tituladas volumetricamente com EDTA padrão.[153]

As soluções de hidróxido de sódio foram sempre preparadas, sob atmosfera de azoto, a partir de uma solução de hidróxido de sódio a 50% e utilizando água bidesionizada previamente fervida. O título das soluções diluídas foi determinado por titulação com ácido nítrico ou clorídrico padrão, imediatamente antes de serem utilizadas.

Aa soluções de água /metanol foram sempre preparadas em percentagem volúmica de metanol e apenas até 50% (v/v) do álcool, isto é, sempre numa região rica em água.

2 Instrumentação utilizada

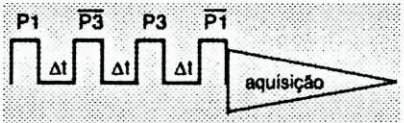
Potenciometria

Eléctrodo de vidro	Referência
Ingold	102023003
Ingold	102653055
Metrohm	60102.100
Philips	GAH 110
Russel	SWL 39523
Russel	SWL 34927
Unicam	9436-095-83003
WPA	SW 711

Todas as titulações foram efectuadas sob atmosfera de azoto numa célula termostatizada de paredes duplas e em que a temperatura foi mantida constante a 25,0 ± 0,1 °C por recirculação de água com um circulador GFL 5002. Os eléctrodos de referência utilizados durante todo este trabalho foram de prata/cloreto de prata com dupla junção, normalmente Metrohm 6.0726.100 e por vezes da Orion 900029; os eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio utilizados estão indicados no quadro anexo.

A descrição pormenorizada do sistema de titulações potenciométricas utilizado e do tipo de calibrações usadas é feita no capítulo seguinte dada a sua importância nos valores determinados para as constantes de equilíbrio e para a sua validação.

Espectroscopia

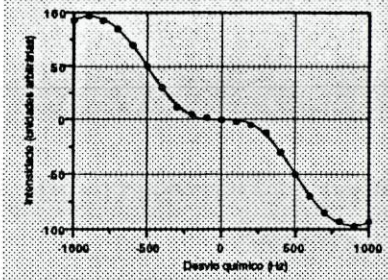


Sequência de impulsos 1–3–3–1 para remoção do sinal do solvente; a duração de P1 e $\overline{P1}$ é de 120 μs e a de P3 e $\overline{P3}$ é de 360 μs (a barra superior indica um desvio de fase de 180°); Δt = 0,2 μs.

Todas as determinações espectrofotométricas de ultravioleta/visível foram efectuadas a 25,0±0,1 °C usando um espectrofotómetro Shimadzu UV-265 equipado com um acessório de controlo de temperatura por circulação de água termostatizada. Foram também efectuadas algumas determinações num espectrofotómetro Shimadzu UV-3101 PC, também com controlo de temperatura. A largura de fenda utilizada foi de 1 mm e usaram-se cubas de quartzo com um passo óptico de 1 cm.

O ajuste de - log c_{H^+} foi sempre efectuado por adição de quantidades vestigiais de ácido ou base forte a 20,00 cm^3 das soluções amostra de modo que a quantidade de volume adicionada fosse desprezável. As medições de - log c_{H^+} e a calibração do sistema foram sempre efectuadas como se descreve no Capítulo 7.

As determinações por RMN foram efectuadas, à temperatura ambiente, num espectrómetro Bruker AC 200 operando a 200 MHz para ^1H.



Curva de excitação da sequência de impulsos representada na figura lateral da página anterior

A regulação de campo-frequência foi baseada na frequência de ressonância do deutério, fornecida por D_2O contido num tubo capilar de vidro selado imerso nas amostras das soluções aquosas. Os espectros (em água) foram obtidos por excitação selectiva do intervalo de frequências a observar, por meio de uma sequência de impulsos do tipo 1-3-3-1, com o objectivo de eliminar o sinal da água.[154]

O ajuste de - log c_{H^+} foi sempre efectuado de uma maneira análoga à efectuada para a espectrofotometria de UV/VIS e a sua medição foi também efectuada como se descreve no Capítulo 7. Os espectros de RMN das benzodiazepinas foram obtidos utilizando pelo menos 200 acumulações, devido às baixas concentrações utilizadas, e usou-se como referência interna *terc*-butanol.

3 Métodos de cálculo utilizados

TODAS AS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO GLOBAIS, β_{pqrs}, CALCULADAS NESTE TRABALHO são definidas para a reacção genérica traduzida pela equação

$$_pM + _qL + _rA + _sH \rightleftharpoons M_pL_qA_rH_s \qquad (6.1)$$

por

$$\beta_{pqrs} = \frac{|M_pL_qA_rH_s|}{|M|^p|L|^q|A|^r|H|^s} \qquad (6.2)$$

em que p, q, r e s são os coeficientes estequiométricos, respectivamente, do catião metálico, do primeiro ligando, do segundo ligando (quando se estudam complexos mistos) e do catião hidrogénio; quando há libertação de um protão o coeficiente estequiométrico é negativo. As constantes assim definidas estão baseadas nas espécies químicas individuais de que se parte; nesta definição as cargas foram omitidas para simplificação, tal como ao longo de todo o trabalho, salvo quando for pertinente a sua utilização.

Coordenação de OH^-

Um aspecto interessante associado à nomenclatura esboçada ao lado relaciona-se com a coordenação de anião hidróxido ao catião metálico, já que para esta situação considera-se que o coeficiente estequiométrico é -1 por anião hidróxido coordenado.

Os resultados obtidos, por potenciometria, para o cálculo das constantes de equilíbrio foram tratados com o programa SUPERQUAD[89] e/ ou programa BEST[87] e os resultados obtidos para a determinação de constantes de equilíbrio por espectrofotometria de UV/VIS com o programa SQUAD.[106] Estes programas necessitam de arquivos (ficheiros) de entrada específicos que contêm os dados experimentais adquiridos e informações sobre o modelo químico em estudo. Seguidamente são descritos, sucintamente, os programas utilizados.

PROGRAMA SUPERQUAD

O programa SUPERQUAD,[89] escrito em linguagem Fortran e que pode ser utilizado em qualquer microcomputador compatível com IBM, minimiza a função $\Sigma\, \omega_i(E_{calc} - E_{exp})^2$, em que E_{calc} e E_{exp} são a força electromotriz calculada e experimental, e ω_i é o peso associado a cada um dos pontos experimentais. A minimização é feita utilizando o método não linear de mínimos quadrados de Gauss-Newton e o parâmetro de Marquart, vector que orienta as variações das constantes a refinar na direcção do mínimo.[69] O programa permite também determinar a variância aliada a cada um dos pontos experimentais através da formula

$$\sigma^2 = \sigma_E^2 + (dE/dV)^2 \sigma_V^2 \qquad (6.3)$$

em que σ^2 é a variância da medição, σ_E^2 e σ_V^2 são as variâncias estimadas das leituras de potencial e de volume e a variável (dE /dV) representa o declive da curva de titulação, que permite atribuir um peso diferente a cada ponto experimental, peso este inversamente proporcional à variância nesse ponto, o que poderá diminuir os erros inerentes a medições efectuadas próximo de pontos de equivalência.

Os valores das constantes de equilíbrio obtidas com este programa são sempre acompanhadas de dois parâmetros estatísticos: χ^2 (com o significado habitual) baseado nos resíduos calculados e σ (desvio padrão do ensaio), que dependem do número de pontos experimentais utilizados e do

Breve história do desenvolvimento do programa SUPERQUAD

1975 - Programa MINIQUAD
Calcula constantes de equilíbrio potenciométricas. Efectua a minimização pelo método de mínimos quadrados não linear de Gauss/ Newton e introduz, pela primeira vez a optimização linear dos desvios para garantir a convergência e o cálculo dos coeficientes diferenciais através de funções analíticas em vez de númericas. Analisa também os resíduos, após convergência, de modo a verificar se seguem uma distribuição Gaussiana normal.

1976 - Programa MINIQUAD75
A optimização linear dos desvios para obtenção de convergência não se mostrou muito eficaz, tendo sido substituída pela utilização do parâmetro de Marquardt, que roda o vector desvio no sentido descendente. É introduzida a possibilidade de analisar simultaneamente mais do que um modelo químico.

1985 - Programa SUPERQUAD
As principais diferenças, relativamente aos MINIQUAD, residem na função resíduo que é obtida directamente da variável dependente (minimização da força electromotriz) e que engloba pesos relativos a cada ponto experimental; além disso permite refinar não só os valores das constantes de equilíbrio mas também as concentrações totais das espécies em solução, a concentração da base e os parâmetros de calibração dos eléctrodos.

número de parâmetros a refinar. O valor de χ^2 é largamente dependente do número de pontos do ensaio enquanto que s é muito dependente do erro aliado aos volumes adicionados em cada ponto experimental e do erro experimental associado à medição da fem.

Na Figura 6.1 apresenta-se um esquema geral do ficheiro de entrada do programa SUPERQUAD, fazendo uso da nomenclatura do próprio programa; seguidamente irão ser descritos alguns dos parâmetros mais importantes utilizados no programa e cuja significado não seja óbvio da leitura desta figura.

- Item 2: contém parâmetros de índole geral. **MAXIT** é o número máximo de iterações; **IPRIN** controla o formato do ficheiro de saída; **NMBEO** é o número de reagentes do sistema; e **MODE** condiciona o esquema de pesos relativos que se pretende atribuir a cada ponto experimental. Este último parâmetro pode influenciar de uma maneira significativa os valores das constantes de equilíbrio obtidas.
- Item 5: introduzem-se os valores conhecidos e estimativas iniciais dos valores a calcular para as constantes de equilíbrio globais (β_i) do modelo em estudo; os coeficientes estequiométricos ($\mathbf{p_i}$, $\mathbf{q_i}$, $\mathbf{r_i}$, $\mathbf{s_i}$) associados a cada um dos reagentes; e um parâmetro (**Key log** β_i) que permite indicar quais as constantes de equilíbrio que são para refinar (1), quais as que se mantêm constantes (0) e se um determinado equilíbrio deve ser ignorado (-1).
- Item 7: para cada reagente (k) é indicado a quantidade de substância expressa em milimoles existentes, quer no titulado (**Totmm**$_k$), quer no titulante (**Addc**$_k$); os parâmetros (**Key** $\mathbf{T_k}$ e $\mathbf{A_k}$) indicam se essas quantidades são fixas (0) ou irão ser refinadas (1).

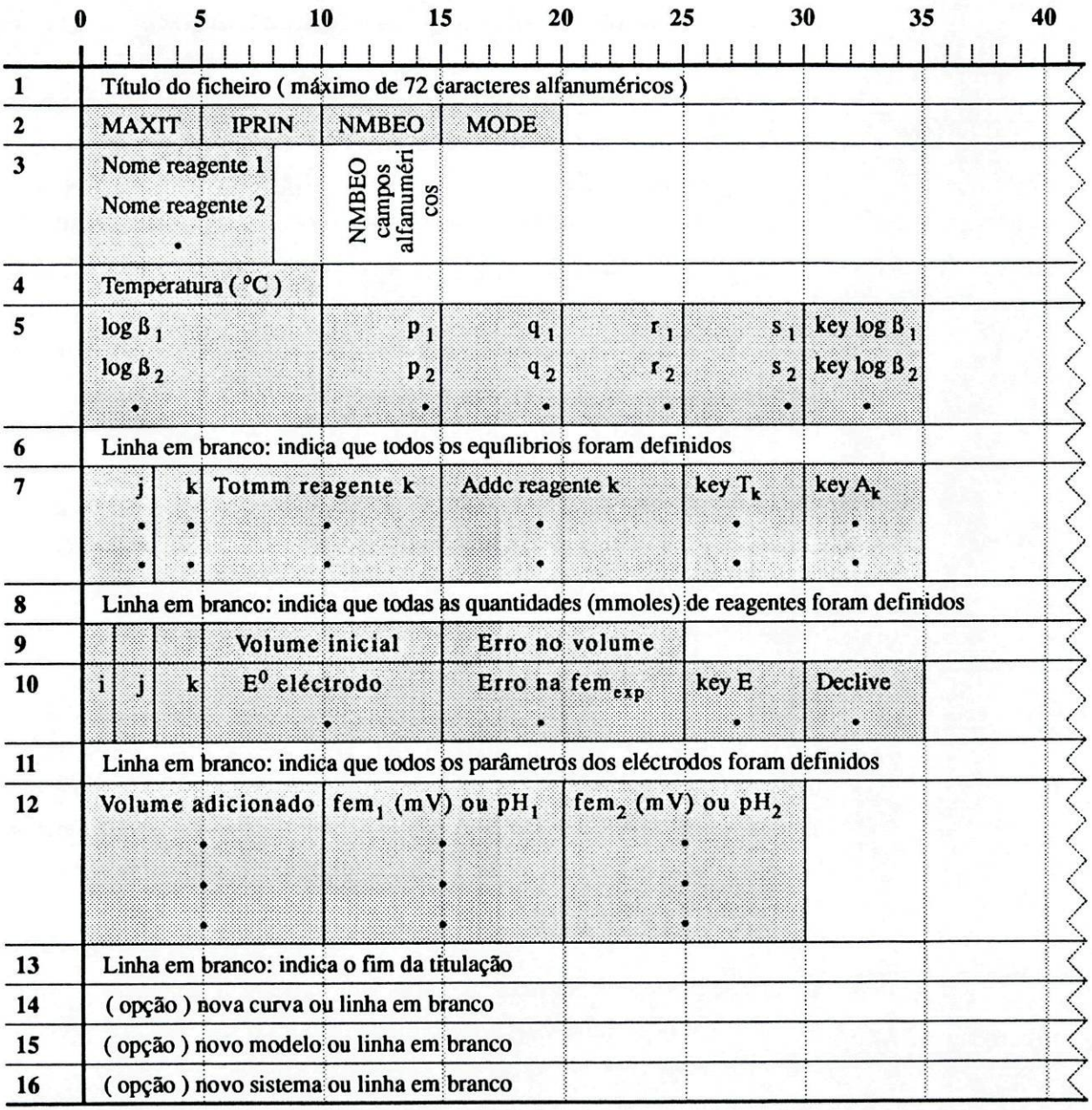


Figura 6.1. Exemplo do arquivo de entrada do programa SUPERQUAD

- Item 10: **i** indica se as leituras foram efectuadas em *fem* ou em pH;[ref] **j** representa o número de electrões transferidos no eléctrodo utilizado; **k** o reagente a que o eléctrodo responde (parâmetro definido no item 3); os parâmetros de calibração do referido eléctrodo (E^0 e declive); e **Key E^0** que indica se o valor do potencial normal do eléctrodo irá ser (1) ou não refinado (0).

São também definidos os erros inerentes ao sistema de titulação (erro fem_{exp} e erro no volume adicionado), valores estes muito importantes para a fiabilidade dos valores estatísticos apresentados por este programa. Os parâmetros **Key T_k**, **Key A_k** e **Key E^0** foram raramente utilizados, pois em geral, a inexactidão das grandezas experimentais a que estão associados advirá de erros experimentais que devem ser detectados numa fase anterior à determinação das constantes de equilíbrio de um sistema em estudo e não devem ser matematicamente optimizados; no entanto podem ser utilizados com vantagem na detecção de erros sistemáticos associados à determinação de uma destas quantidades.

PROGRAMA BEST

O programa BEST,[87] escrito em linguagem Fortran de modo a ser utilizado em microcomputadores compatíveis com IBM, assume a existência de NC componentes (reagentes) e de NS espécies formadas a partir destes componentes, e utiliza o método não linear de mínimos quadrados de Newton-Raphson para minimizar a função $U = \Sigma(pH_{calc} - pH_{exp})^2$. São sempre atribuídos pesos diferente aos pontos experimentais, de modo a diminuir a contribuição dos valores próximos de zonas de inflexão; o peso utilizado para cada ponto *i* da curva de titulação é o reciproco do quadrado do declive nesse ponto calculado pela expressão $\omega_i = 1 / (pH_{i+1} - pH_{i-1})^2$. Aos resultados finais está associado um parâmetro estatístico $\sigma_{fit} = (U / \Sigma\omega_i)^{1/2}$ que é interpretado como o desvio padrão do ajuste efectuado entre os valores de pH calculados e determinados experimentalmente.

PROGRAM BEST VERS. 05 / 17 / 88
SISTEMA GABA

INITIAL VOLUME	20.0000
NORMALITY	.0188
MILIMOLES OF ACID	.0000
NUMBER OF DATA POINTS	*54*
PH CORR. INCLUDED	.000

COMPONENTS:

1 GA	0.05340	MILIMOLES
2 H	0.04000	MILIMOLES

SPECIES:

	LOG BETA		
1	0.0000	1 GA	0 H
2	+4.0601	1 GA	1 H
3	-10.4321	1 GA	-1 H
4	0.0000	0 GA	1 H
5	-13.8000	0 GA	-1 H

SIGMA PH FIT = 0.0551

PROGRAM BEST VERS. 05 / 17 / 88
SISTEMA GABA

INITIAL VOLUME	20.0000
NORMALITY	.0188
MILIMOLES OF ACID	.0000
NUMBER OF DATA POINTS	*35*
PH CORR. INCLUDED	.000

COMPONENTS:

1 GA	0.05340	MILIMOLES
2 H	0.04000	MILIMOLES

SPECIES:

	LOG BETA		
1	0.0000	1 GA	0 H
2	+4.0466	1 GA	1 H
3	-10.4012	1 GA	-1 H
4	0.0000	0 GA	1 H
5	-13.8000	0 GA	-1 H

SIGMA PH FIT = 0.0053

Exemplo dos resultados obtidos com o programa Best: (a) com inclusão de valores junto de pontos de inflexão; e (b) com exclusão de alguns destes pontos.

A descrição dos ficheiros necessários à utilização deste programa é apresentada no livro de Martell e Motekaitis[155] de forma bastante detalhada. Este programa foi elaborado para sistemas de titulação que fornecem directamente valores de pH, o que obrigou neste trabalho à conversão dos valores dos potenciais lidos experimentalmente em concentrações de H^+, antes da elaboração do ficheiro de entrada, e em que para valores de pH foram utilizados valores de -log c_{H^+}. Os valores de σ_{fit} são muito afectados pelo número de pontos experimentais próximos de zonas de inflexão; no entanto, para titulações efectuadas na ausência de catiões metálicos embora se verifique que a não inclusão de valores experimentais perto de zonas de inflexão fornece um valor de σ_{fit} muito menor do que quando são utilizados todos os pontos da curva de titulação (ver exemplo ao lado), os valores calculados para as constantes de equilíbrio são idênticos.

A utilização destes dois programas no cálculo das constantes de equilíbrio obtidas neste trabalho, permitiu comparar os modelos propostos, em termos de diferentes parâmetros estatísticos e tirar algumas conclusões sobre estes mesmos parâmetros. Permitiu também analisar qual a influência da utilização ou não de pesos aliados aos diferentes pontos experimentais. Estes resultados serão analisados ao longo do trabalho e relativamente a alguns dos casos estudados. No entanto, pode-se desde já afirmar que o programa BEST revela alguns problemas quando se pretende calcular valores de constantes de equilíbrio químico utilizando a curva de titulação global obtida desde que esta inclua pontos de inflexão, o que parece demonstrar que os pesos admitidos para estas zonas não traduzem correctamente o que ocorre experimentalmente. Esta observação está de acordo com a afirmação de Alcock *et al.*[78] de que as somas dos quadrados dos resíduos devem ser calculadas directamente a partir da variável experimental (força electromotriz, em potenciometria) e não de variáveis que são elas próprias função da variável experimental observada.

PROGRAMA SQUAD

Alguns dos resultados obtidos por espectrofotometria ultravioleta/visível foram tratados com o programa SQUAD.[106] Este programa, escrito em Fortran, foi adaptado neste trabalho por forma a poder ser utilizado em microcomputadores compatíveis com IBM; este programa calcula simultaneamente um conjunto de absortividades molares e de constantes de equilíbrio das espécies em solução, utilizando o método não linear de mínimos quadrados de Gauss-Newton para minimizar a função U

$$U = \sum_{i=1}^{NS}\sum_{k=1}^{NW}(A_{ik} - \sum_{j=1}^{NC}C_{ij}\varepsilon_{jk}b_i)^2 \qquad (6.4)$$

em que NS é o número de soluções em que é medida a absorvância A_{ik}, NW é o numero de comprimentos de onda seleccionados, NC é o número de espécies que contribuem para a absorção de radiação, ε_{jk} é a absortividade molar da espécie j para o comprimento de onda k, b_i (cm) é o passo óptico e C_{ij} é a concentração da espécie j na solução i. O esquema geral do programa (Figura 6.2) mostra os vários algoritmos utilizados e a sua interrelação; seguidamente será descrito, sucintamente, o *modus operandi* do programa. Uma descrição mais pormenorizada é fornecida por Leggett *et al.*.[156]

As subrotinas PREPRO e INOUT lêem os dados fornecidos no ficheiro de entrada, que consistem nas absorvâncias, A_{ik}, para cada espectro, as concentrações totais das espécies reagentes, C_{M_i}, C_{L_i}, C_{H_i}, as absortividades molares conhecidas ou previamente determinadas, ε_{ij}, os coeficientes estequiométricos e as constantes de equilíbrio, β_j para as j espécies com a indicação das constantes que são para refinar. A subrotina REFINE controla a minimização da função U em três passos.

- Num primeiro passo chama a subrotina DIFF que constrói as equações não lineares com base na resolução da função U efectuada na subrotina RESID. Para tal é necessário: i) a resolução das equações dos balanços materiais, com base nos valores

introduzidos para $C_{M,i}$, $C_{L,i}$, $C_{H,i}$, e b_j, fornecendo a concentração das espécies ij, e que é feita pelas subrotinas CCSCC e COGSNR usando o algoritmo de Newton-Raphson; e ii) conhecido $[espécies]_{i,j}$ a resolução do conjunto de equações lineares $A_{ik} = [espécies]_{i,j}\ e_{ij}\ b_i$, provenientes da lei de Beer-Lambert, que é resolvido nas subrotinas ECOEF, SOLVE, e/ou NNLS. Na subrotina SOLVE podem-se seleccionar dois tipos de algoritmo: regressão múltipla (MR) ou regressão múltipla não negativa (NNLS); esta última impõe que todos os valores de ε_{ij} têm de ser iguais ou superiores a zero, um requisito não trivial pois será natural que durante a minimização e ao utilizar valores de resultados experimentais, logo afectados de um erro experimental, alguns elementos da matriz ε_{ij} possam ser negativos.[156] Evidência experimental mostra que a regressão múltipla normalmente só falha quando a contribuição de uma ou mais espécies é próxima de zero e só nestes casos é que se deve utilizar o método de regressão não linear pois verificou-se também que com este há uma diminuição na precisão dos resultados finais obtidos por não serem aceites como solução da equação 6.4 elementos negativos.

- Num segundo passo, após se ter obtido os valores de U para um dado conjunto de constantes de equilíbrio, efectua a resolução das equações de mínimos quadrados pela subrotina SEARCH que fornece o conjunto de valores de que as constantes de equilíbrio a determinar devem ser variadas, $\Delta\beta$, de modo a que o valor de U seja minimizado.
- Finalmente, num terceiro passo verifica se o novo conjunto de constantes de equilíbrio obtidas permite ou não uma melhor descrição dos dados experimentais, efectuando o mesmo percurso referido no primeiro passo para a subrotina RESID.

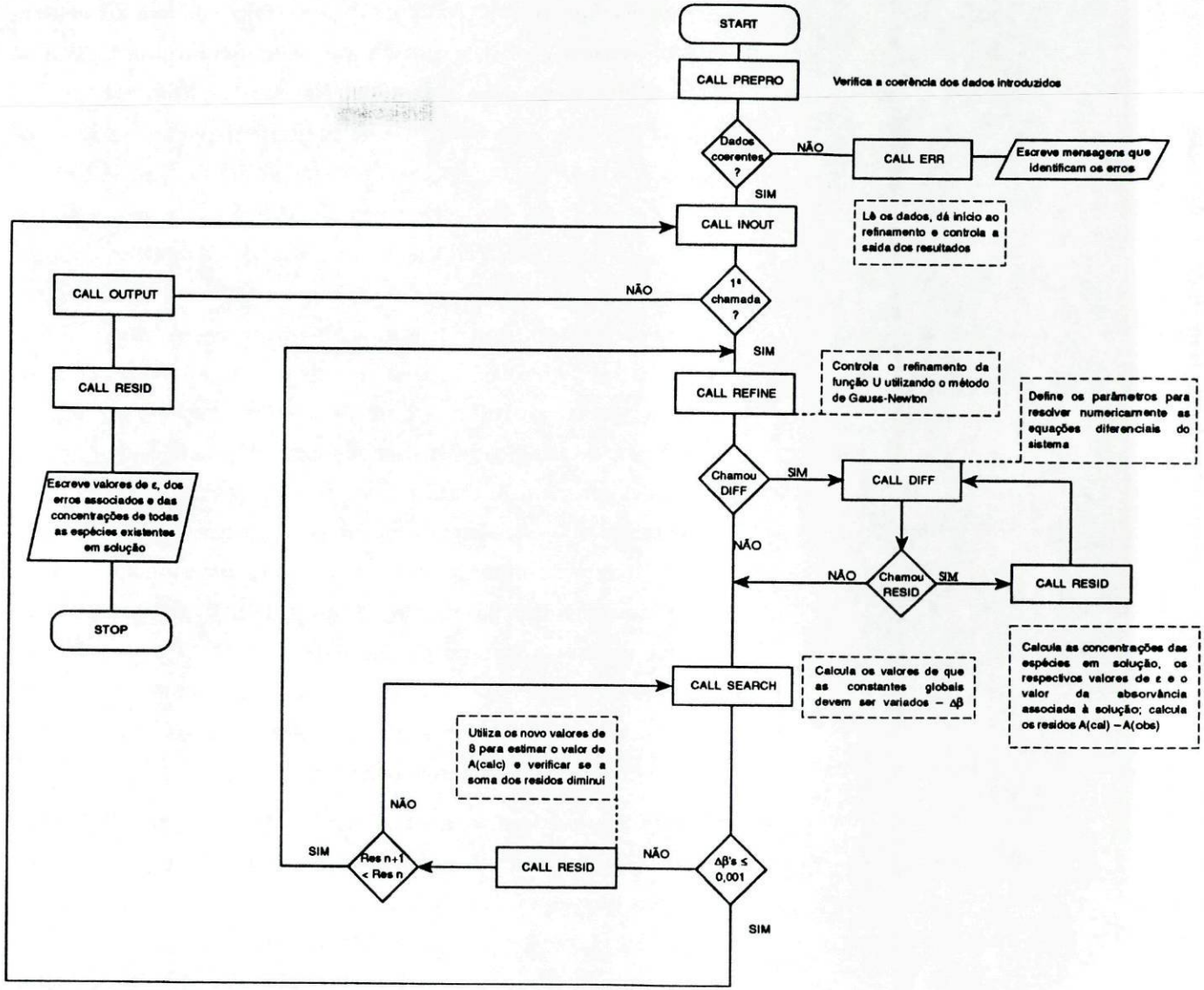


Figura 6.2. Fluxograma simplificado do programa SQUAD

Quando as variações no conjunto de constantes de equilíbrio a refinar, $\Delta\beta$, forem inferiores a 0,001 finaliza o processo de minimização e os resultados são armazenados num arquivo de saída.

Estes resultados finais são acompanhados por um conjunto de parâmetros estatísticos que permitem avaliar a qualidade do ajuste obtido: o desvio padrão nos dados de absorvância, σ_{data}, que é determinado a partir do conjunto de constantes de equilíbrio calculadas em cada ciclo de minimização, e que mede a qualidade do ajuste do modelo proposto aos dados experimentais; o desvio padrão associado a cada uma das constantes refinadas, σ_{CONST}; e, também, o desvio padrão associado a cada espectro, σ_{SPECT}.

RMN

Os dados experimentais obtidos por RMN foram tratados com o programa comercial KaleidaGraph (versão 2.1). Este programa contem um conjunto de subrotinas que permite efectuar a determinação dos coeficientes de uma dada função analítica utilizando o método dos mínimos quadrados, isto é, minimiza o quadrado dos erros obtidos entre os dados experimentais, que lhe são fornecidos, e os valores obtidos pela função analítica que lhes foi atribuída. Neste trabalho foi utilizada a função

$$[10^{\log c_{H^+}} \times \delta_{H_2L} + 10^{(-pK_a)} \times \delta_{HL}] / [10^{\log c_{H^+}} + 10^{(-pK_a)}] \qquad (6.5)$$

para a determinação individual das constantes de acidez associadas ao GABA (Capítulo 9) e a função

$$[(10^{\log c_{H^+}})^2 \times \delta_{H2L} + 10^{(-pKa1)} \times 10^{\log c_{H^+}} \times \delta_{HL} + 10^{(-pKa1)} \times 10^{(-pKa2)} \times \delta_L] / [(10^{\log c_{H^+}})2 + 10^{(-pKa1)} \times 10^{\log c_{H^+}} + 10^{(-pKa1)} \times 10^{(-pKa2)}] \qquad (6.6)$$

para a determinação simultânea das duas constantes de acidez do GABA, em que δ_{H_2L}, δ_{HL} e δ_L são os desvios químicos, respectivamente, das espécies protonada, neutra (ião dipolar; zwiteriónica) e aniónica.

ERROS

Os erros associados aos valores das constantes de equilíbrio calculadas computacionalmente são o desvio padrão correspondente o que traduz, em geral, os erros inerentes apenas a um determinado ensaio experimental. No entanto, os erros aliados a uma dada constante de equilíbrio estão mais relacionados com as diferenças observadas de uma titulação para outra do que aos erros inerentes aos pontos experimentais de uma única titulação.[157] Assim, alguns autores,[158] para minimizar estas dificuldades, apresentam como erro associado aos valores das constantes de equilíbrio que calculam, um valor que é 3 vezes o do desvio padrão dos valores encontrados.

Os erros aliados aos valores das várias constantes de equilíbrio determinadas ao longo deste trabalho são os definidos por Albert e Sergeant[159] como sendo a dispersão dos resultados obtidos, que não é mais que o desvio máximo permitido na obtenção de constantes de equilíbrio e é obtido pela diferença máxima encontrada entre o logaritmo da média dos valores das constantes de equilíbrio, calculadas para um dado sistema, e cada um dos valores logarítmicos individuais das constantes calculadas.

Se os valores de pK_a, portanto, valores logarítmicos, fossem usados directamente na determinação do valor médio, obter-se-ia um valor que não seria uma média mas sim uma soma logarítmica de raízes:

$$(pK_1+...+pK_n)/n =$$

$$[-\log K_1 +...+ (-\log K_n)]/n =$$

$$(1/n)(-\log K_1) +...+ (1/n)(-\log K_n) =$$

$$\log K_1^{(-1/n)} +...+ \log K_n^{(-1/n)}$$

valor que é diferente do logarítmo do valor médio dos antilogarítmos dos pK:

$$pK_a(\text{médio}) = \log [(10^{pK1} +...+ 10^{pKn})/n]$$

A razão por que se prefere usar a dispersão como medida do erro associado ao valor médio de pK_a, deve-se ao facto de esta fornecer uma medida mais real do desvio *máximo* obtido para um dado número de determinações, número esse que deve ser referenciado para que o valor da dispersão seja significativo.

Capítulo

7

Titulações Potenciométricas

Informações específicas exigidas pela IUPAC para a publicação de constantes de equilíbrio:

1 - pureza dos reagentes;

2 - composição das soluções, temperatura e força iónica;

3 - instrumentação utilizada e processo de calibração;

4 - intervalo de pH e valor de K_{ag} utilizado;

5 - número de pontos experimentais de uma mesma titulação e número de ensaios independentes efectuados;

6 - método de cálculo utilizado: erros obtidos e seu processo de cálculo.

UMA ANÁLISE DOS RESULTADOS PUBLICADOS SOBRE CONSTANTES DE EQUILÍBRIO REA-lizada pela IUPAC[77] mostrou uma enorme divergência no modo como estes foram obtidos e posteriormente apresentados. Em muitos casos a falta de especificação das condições experimentais utilizadas na obtenção dos dados experimentais não permite tirar conclusões sobre a fiabilidade dos resultados finais de equilíbrio químico, o que vai impedir a sua reprodução e a sua utilização em estudos posteriores. Assim sendo, a IUPAC propôs uma série de condições que devem ser seguidas para a determinação de constantes de equilíbrio válidas, de que se salienta a descrição da instrumentação utilizada (decimilivoltímetro, eléctrodos, espectrofotómetro, etc...), do método de calibração utilizado, da composição das soluções (indicando claramente a força iónica) e a indicação da temperatura a que as determinações foram realizadas.

Uma grande parte deste trabalho consistiu na determinação potenciométrica de valores de constantes de equilíbrio estequiométricas, não só em água como em misturas de água/metanol e de acordo com as condições propostas pela IUPAC é fundamental a descrição da instrumen-

tação utilizada e do seu modo de calibração. Como tal, neste capítulo descreve-se pormenorizadamente o sistema de titulação automático utilizado para a obtenção dos dados potenciométricos, e o modo como este mesmo sistema foi calibrado, quer para soluções aquosas, quer para soluções hidrometanólicas.

1 O sistema de titulação

A realização manual de titulações potenciométricas para obtenção de curvas de titulação pormenorizadas constitui uma operação fastidiosa e demorada, especialmente quando se analisam sistemas químicos cuja complexidade pode requerer a execução de titulações com cem ou mais pontos experimentais, para várias soluções com diferentes razões metal/ligando, pelo que a utilização de equipamento automático, embora mais dispendioso, constitui a solução lógica para este problema. Actualmente existem vários tituladores automáticos comerciais mas, de uma maneira geral, são optimizados para tarefas de rotina ou para a aquisição de dados de sistemas simples. O aparecimento, nos últimos anos, de microcomputadores de

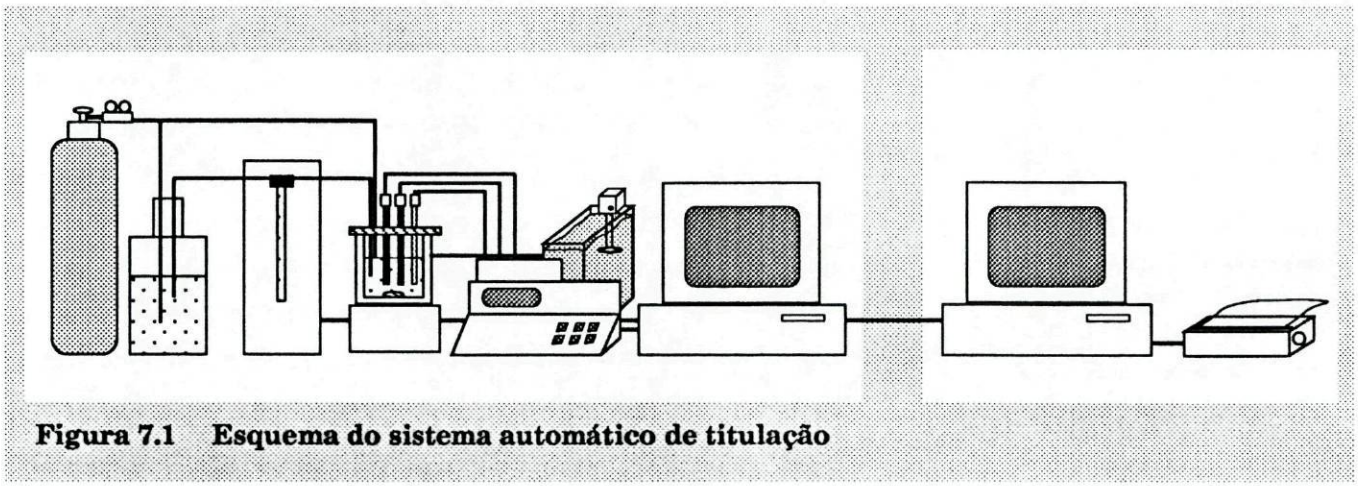


Figura 7.1 Esquema do sistema automático de titulação

Lista de Opções de Entrada

1- Volume amostra (cm^3)
2- Conc. Titulante (M)
3- Volume bureta (cm^3)
4- Comutador (S/N)
5- Nº de ESI
6- Adições fixas ou variáveis (F/V)
7- Incremento Adições
8- Volume total titulante
9- Potencial final
10- Nº leituras
11- Critério de estabilidade (mV)
12- Espera após adição (s)
13- Adição inicial (cm^3)
14- Filtro (%)

baixo custo, tornou possível o desenvolvimento de sistemas automáticos de titulação muito mais versáteis e que podem ser utilizados tanto em trabalho de rotina como na obtenção de constantes de equilíbrio.[160,161]

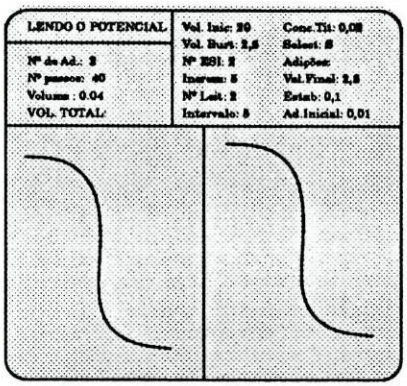
Neste trabalho utilizou-se um sistema automático de titulação composto por uma bureta automática da marca Crison 2031, um decimilivoltímetro Crison 2002 ambos controlados por um microcomputador Philips TC100 ligados através de interfaces série RS232C e ao qual foi ainda associado um comutador de eléctrodos,[162] também controlado pelo microcomputador. O programa de controlo e aquisição de dados deste sistema foi elaborado no Laboratório de Química - Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. O sistema pode ser utilizado para qualquer titulação potenciométrica, sendo apenas necessário usar o titulante e os eléctrodos adequados. Este sistema está ainda ligado a um computador Unisys PW 300 para tratamento dos resultados obtidos nas calibrações efectuadas (Figura 7.1).

Aquisição de dados

O programa de controlo tem várias opções de entrada permitindo a escolha de dois tipos de titulação — titulação dinâmica ou titulação monotónica.[163] Nas titulações dinâmicas, após a adição de um volume inicial previamente fixado e medição do potencial nesse ponto, os volumes a serem adicionados posteriormente são calculados automaticamente, sendo inversamente proporcionais ao declive da curva de titulação. Isto é, no início da titulação o declive é pequeno e são adicionados volumes grandes de titulante; perto do ponto de equivalência, o declive da curva é cada vez maior e os volumes de titulante adicionados são cada vez mais pequenos. Finalmente, e pela mesma razão, após o ponto de equivalência os volumes de titulante adicionados voltam a ser maiores. Nas titulações monotónicas a primeira adição é fixada para toda a titulação e portanto a adição de volumes é sempre constante. Em ambos os casos é imposto um tempo de espera constante en-

tre cada adicão de volume e leitura do potencial. Esta leitura de potencial só é aceite quando a diferença entre várias leituras, número de leituras este fixado previamente, de um mesmo ponto é inferior a um critério de estabilidade do eléctrodo, também previamente fixado, e só quando esta medição é aceite é que tem lugar a adição de uma nova quantidade de titulante seguindo-se uma outra sequência de medições. Os dados experimentais assim obtidos são bastante precisos ao longo de toda a titulação, mesmo quando é necessário um período de tempo longo para se atingir o equilíbrio eléctrodo/solução, por exemplo no caso de sistemas não aquosos ou por vezes até apenas sistemas mistos.

À medida que decorre um ensaio experimental visualiza-se no monitor a curva de titulação o que permite a detecção imediata de qualquer anomalia. Quando a titulação termina os resultados obtidos são automaticamente armazenados num suporte magnético e é efectuado o cálculo do volume equivalente pelo método da segunda derivada. Também é possível representar graficamente, não só o potencial do eléctrodo em função do volume de titulante adicionado, mas também as curvas de primeira e segunda derivada.



Os resultados experimentais obtidos nas calibrações do sistema foram tratados por um programa de regressão linear (escrito em QBASIC, versão 4.00, Microsoft) que permite o cálculo do volume equivalente pelo método de Gran e dos parâmetros de calibração do eléctrodo, aplicando a equação de Nernst e/ou o método de Gran.

2 Calibração do sistema em solução aquosa

Apesar da obtenção de constantes de equilíbrio por potenciometria com eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio ser uma das técnicas mais antiga e mais usada na obtenção destas constantes, ainda existe uma

grande polémica sobre a maneira mais precisa de calibrar este sistema, pois a calibração condiciona o tipo de constantes de equilíbrio que vão ser determinadas, isto é, constantes termodinâmicas, estequiométricas ou mistas.

Definição de pH

O conceito de pH, inicialmente introduzido como

$$\mathbf{pH = - \log} \, c_{H^+} \tag{7.1}$$

onde c_{H^+} é a concentração do catião hidrogénio (mol dm^{-3}) [164], foi posteriormente modificado para

$$\mathbf{pH = - \log} \, a_{H^+} = \mathbf{- \log} \, (c_{H^+} \gamma_{H^+}) \tag{7.2}$$

onde a_{H^+} é a actividade do catião hidrogénio. Como o pH é uma quantidade adimensional a equação7.2 deve ser escrita como

$$\mathbf{pH = - \log} \, (c_{H^+} \gamma_{H^+} / C^*) \tag{7.3}$$

ou

$$\mathbf{pH = - \log} \, (m_{H^+} \gamma_{m,H^+} / m^*) \tag{7.4}$$

onde C^* ou m^* são constantes arbitrárias, que representam a condição do estado padrão, numericamente igual a 1 M ou 1 $molkg^{-1}$, respectivamente, c_{H^+} é a molaridade do catião hidrogénio, m_{H^+} a molalidade e γ_{c,H^+},γ_{m,H^+} o coeficiente de actividade deste mesmo catião, respectivamente, nas duas escalas e em que γ_{c,H^+} é abreviado para γ_{H^+}.

Esta definição tem um interesse teórico, pois não só envolve a actividade de um só ião, quantidade que não é mensurável,[1657] como a sua definição está baseada no método usado para a sua medição. Então, a definição de pH designada por "definição operacional" assenta numa escala convencional de pH definida para soluções de referência com valores de pH imputados (ver abaixo) e força iónica inferior a 0,1 M. Para uma solução

amostra X tem-se

$$pH(X) = pH(S) - (E_X - E_S) / (RT/F) \log_e 10 \quad (7.5)$$

onde E_S é a força electromotriz da célula (I), E_X é a força electromotriz da mesma célula quando a solução S é substituída pela solução amostra X

Célula (I) **eléctrodo referência ‖ KCl (> 3,5 *M*) ‖ solução S ‖ H_2 (g) ‖ Pt**

e R é a constante dos gases, T a temperatura e F a constante de Faraday. Esta equação 7.5 assume, obviamente, o comportamento nernstiano do eléctrodo sensível ao catião hidrogénio.

DETERMINAÇÃO DE pH

A determinação de valores de pH para soluções de referência (S) é efectuada com a célula (II) sem junções líquidas.

Célula (II) **Pt (Pd) ‖ H_2 (g, p = 1 atm) ‖ solução referência, Cl^- ‖ AgCl ‖ Ag**

A força electromotriz desta célula é dada por[166]

$$E = E^0 - k \log [m_{H^+} m_{Cl^-} \gamma_{m,H^+} \gamma_{m,Cl^-} / (m^*)^2] \quad (7.6)$$

onde m é a molalidade e γ o coeficiente de actividade das espécies, E^0 é a força electromotriz padrão, $m^* = 1$ molKg^{-1} e $k = RT\ln(10)/F$, cujo significado foi atrás referido. Rearranjando esta equação 7.6 obtém-se

$$- \log (m_{H^+} \gamma_{m,H^+} \gamma_{m,Cl^-} / m^*) = (E - E^0) / k + \log (m_{Cl^-} / m^*) \quad (7.7)$$

A força electromotriz padrão, E^0, é obtida da equação 7.7 considerando $\gamma_{m,H^+} \gamma_{m,Cl^-} = \gamma_{\pm}^2$, em que $\gamma_{\pm}^2$ é o coeficiente de actividade médio de HCl 0,01 molkg^{-1}, para valores de E obtidos com a célula (II), mas substituindo

Comparação de valores de pH obtidos pelas escalas BSI e NBS

Solução (m)	BSI	NBS
Ktetraoxalato (0,05)	3,559	3.557
KH ftalato	4,008	4,008
Ácido acético/acetato de sódio (0,01/0,01)	4,716	4,718
KH_2PO_4/Na_2HPO_4 (0,025)/0,025)	6,858	6,865
$Na_2B_4O_7$ (0,01)	9,185	9,180

a solução de referência por HCl 0,01 molKg^{-1}.

A quantidade - log ($m_{H^+}\,\gamma_{m,H^+}\,\gamma_{m,Cl^-}$ / m^*) é calculada pela medição da força electromotriz de várias soluções com diferentes molalidades m_{Cl^-} e subsequente extrapolação a $m_{Cl^-} = 0$, o que permite calcular

$$\mathrm{pH\ (S)} = [-\log (m_{H^+}\,\gamma_{m,H^+}\,\gamma_{m,Cl^-}/\,m^*)]_{m_{Cl^-}\to 0} + \log\gamma_{m,Cl^-} \qquad (7.8)$$

em que γ_{Cl^-} é obtido pela convenção de Bates - Guggenheim.[167]

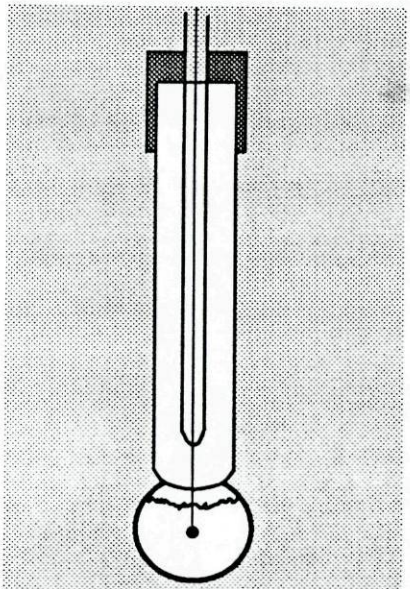
Esta determinação de valores de referência de pH é efectuada para materiais que são designados como "Certified Reference Materials" pela *National Standards Organization and Metrological Laboratories*[167] e dá origem a escala de pH conhecida por escala de Bates (NBS) que é a adoptada como escala internacional de padrões (international standard IEC 746) e a recomendada pela IUPAC.

Existem no entanto outras escalas de pH como a do Reino Unido (BSI) baseada no padrão primário hidrogenoftalato de potássio 0,05 *M* que se aplica apenas a soluções aquosas cujo pH de referência é dado por pH=4,000+ (t - 15/100)^2 e a do Japão que utiliza o mesmo padrão primário mas que recomenda outras soluções como soluções referência, no entanto são consideradas pela IUPAC como escalas secundárias de pH.[168,169]

O Eléctrodo de Vidro

As medições de pH, na prática, são efectuadas com o eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio e a sua resposta a variações de pH pode originar valores ligeiramente diferentes consoante a solução de referência usada. Os desvios relativamente ao eléctrodo de hidrogénio podem ser originados por variações nos potenciais de junção resultantes das diferentes composições das soluções e das diferentes mobilidades iónicas dos seus componentes, e por diferenças na geometria da interfase da junção líquida.[167]

CALIBRAÇÕES COM TAMPÕES



Eléctrodo de vidro

Verifica-se pois que a calibração do eléctrodo de vidro com tampões de pH específico, é válida quando apenas é necessária uma escala relativa de acidez, mas não é satisfatória para a determinação de constantes de equilíbrio. Mesmo que se assuma uma expressão matemática que permita relacionar o pH definido e a actividade do catião hidrogénio num tampão será sempre difícil relacioná-los correctamente com a concentração de catião hidrogénio de uma solução amostra, como a que é utilizada na determinação de constantes de equilíbrio. Primeiro o coeficiente de actividade do catião hidrogénio não é o mesmo na solução tampão e na solução amostra devido à sua diferente composição iónica e, segundo as diferenças que podem surgir nos potenciais de junção com a solução tampão e com a solução amostra trazem ainda mais incertezas na determinação desta quantidade. Estes problemas que surgem com o uso de tampões são exacerbados quando se utilizam concentrações elevadas de electrólito inerte para ajuste de força iónica. A utilização de tampões de concentração com força iónica ajustada[170] é uma alternativa, no entanto necessita de valores para o coeficiente de actividade do catião hidrogénio, o que obriga a sua determinação para cada caso específico.

CALIBRAÇÕES POR TITULAÇÃO ÁCIDO FORTE/BASE FORTE

Cada vez mais estão a ser efectuados estudos potenciométricos de constantes de equilíbrio em sistemas calibrados em função da concentração do catião hidrogénio[171,172] em vez da tradicional calibração com tampões que utilizam a definição operacional de pH. O objectivo de vários estudos potenciométricos de constantes de equilíbrio em sistemas calibrados em função de soluções padrão de referência estão a tentar encontrar um termo de conversão que permita comparar com eficácia os valores das constantes de equilíbrio determinadas pelos vários processos de calibração. Sigel *et al.*[172] assume a existência de um factor de conversão, $A = pH_{tam}$ -

p_cH, (pH_{tam} é o valor obtido para um ácido forte, p.e. HNO_3, quando a calibração do sistema é efectuado com soluções tampão de referência), valor este constante e igual a 0,02 independentemente da origem das soluções de referência usadas, do tipo e da origem do eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio, do equipamento usado e da força iónica, se esta estiver compreendida entre 0,1 - 0,5 *M*, qualquer que seja o electrólito inerte utilizado. Contudo, verifica-se a existência[173-175] de vários factores de conversão A, que variam desde 0,1 a 0,02. Estas discrepâncias podem ser explicadas com base em erros nos potenciais de junção devido à existência de numerosos eléctrodos de referência comerciais,[175] que diferem não só nas concentrações de KCl, mas também na geometria da junção líquida, parâmetro este que influencia o valor dos potenciais de junção.[176]

Embora pareça possível encontrar um termo de conversão que permita comparar com relativa eficácia os valores das constantes de equilíbrio determinadas pelos vários processos de calibração é necessário ter em conta os vários factores acima mencionados, particularmente a existência de potenciais de junção que terão uma influência decisiva nesta determinação. De salientar que para concentrações de ácido forte com $-\log c_{H^+} < 3{,}0$ os potenciais de junção apresentam variações apreciavéis[177] que impõem variabilidade no factor de conversão.

Condições experimentais recomendadas pela *ICB*

	Primárias	Secundárias
Temperatura	25 °C	37 °C
Força iónica	0,1 *M*	0,1 *M*

Neste trabalho optou-se pela calibração do sistema em termos da concentração de catião hidrogénio com força iónica ajustada, apesar de se utilizarem sempre concentrações da ordem de 10^{-3} *M*, o que evita a utilização não só de coeficientes de actividade como de factores de conversão mais ou menos exactos. Por outro lado as "Recommendations for Measurements and Presentation of Biochemical Equilibrium Data"publicadas pela *Interunion Commission on Biothermodynamics* (IUPAC, IUB e IUPAB) suge-

rem que as determinações de constantes de equilíbrio sejam efectuadas a uma força iónica constante pois a maior parte das reacções de equilíbrio com interesse prático, seja na área da saúde ou noutra (ambiental, alimentar, etc) ocorrem na presença de uma determinada quantidade de electrólito(s) inerte(s).[178]

CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

As determinações potenciométricas, neste trabalho, foram efectuadas com os eléctrodos de vidro e referência descritos no Capítulo 6. A calibração do sistema foi sempre efectuada com a célula (III).

Célula (III)

$Ag \mid AgCl, KCl_{sat} \parallel NaCl$ ou $NaClO_4$ (0,1 *M*) $\parallel$ $NaCl$ ou $NaClO_4$ (0,1 *M*), H^+ (c_H) $\mid$ eléctrodo de vidro

em termos da concentração de catião hidrogénio por titulação de soluções de ácido forte (HCl = 0,001 *M*) com base forte (NaOH 0,01 a 0,03 *M*) sempre a uma força iónica de 0,1 *M* em $NaClO_4$ ou NaCl, à temperatura de 25 °C e sempre em atmosfera de azoto, utilizando o método de Gran [179,180] e a equação de Nernst.

O potencial da célula (III) é

$$E = k_1 + k_2 \log c_{H^+} + k_2 \log \gamma_{H^+} \qquad (7.7)$$

em que k_1 engloba E^0_{cel} e os potenciais de junção e $k_2 = 2.303RT/F$ em que R, T e F têm o significado acima descrito. Como a força iónica está ajustada, o termo $k_2 \log (\gamma_{H^+})$ é constante e ter-se-á

$$E = k'_1 + k_2 \log c_{H^+} \qquad (7.8)$$

MÉTODO DE GRAN/ZONA ÁCIDA

O método de Gran lineariza a curva de titulação utilizando para a zona ácida, a função

$$F_{ac} = (V_0 + V_{ad}) 10^{(E/QF)} = C_b (V_e - V_{ad}) 10^{(k'_1/QF)}$$

em que V_0 é o volume inicial de solução, V_{ad} o volume adicionado em cada ponto da titulação, QF o declive de Nernst (2.303 RT/F), V_e o volume equivalente, C_b a concentração da base (titulante), E a fem em cada ponto da titulação e k'_1 o potencial normal.

A representação gráfica de $F_{ac} = f(V_{ad})$ permite determinar o declive da recta $B = C_b\ 10^{(k'_1/QF)}$ e a ordenada na origem $A = -V_e\ 10^{(k'_1/QF)}$ e o volume equivalente pode ser calculado através da expressão $V_e = -A / B$ e a concentração de base por $C_b = C_{ac}\ V_0 / V_e$, independentemente do valor do declive de Nernst e do potencial normal k_1, sendo C_{ac} a concentração de ácido forte (titulado).

Método de Gran/zona alcalina Para a zona alcalina a função utilizada é

$$F_{ba} = (V_0 + V_{ad})\ 10^{(E/QF)} = (C_b / K_{ag})\ (V_{ad} - V_e)\ 10^{(k'_1/QF)}$$

em que $V_e = -A / B$ em que A é a ordenada na origem e B o declive da função na zona alcalina. Como $B = C_b / K_{ag}\ 10^{(-k'_1/QF)}$ então o valor de $K_{ag} = C_b\ 10^{(k'_1/QF)} / B$, conhecida a concentração da base e assumindo o valor de k'_1 da zona alcalina igual ao da zona ácida é possível calcular o valor operacional do produto iónico da água, pois este parâmetro é uma constante condicional que depende do sistema usado[181] e como tal deve ser determinada para as condições experimentais em que se irão realizar as várias determinações potenciométricas. Este pocedimento é o seguido por Leporeti[182], nos estudos potenciométricos que realiza para a determinação de constantes de equilíbrio.

No programa de cálculo da função de Gran, no ramo ácido, pressupõe-se o declive teórico de Nernst para o cálculo do volume equivalente; com este valor determina-se $E = f(-\log c_{H^+})$ cujo declive corresponde a k_2

Tabela 7.1 **Volumes equivalentes obtidos pelo método de Gran para dois eléctrodos de vidro diferentes, numa mesma solução amostra**

1º Eléctrodo			2º Eléctrodo		
$V_{2ªder}$	V_{ac}	V_{alc}	$V_{2ªder}$	V_{ac}	V_{alc}
0,831	0,829	0,830	0,834	0,830	0,882
0,685	0,681	0,692	0,686	0,682	0,740
0,535	0,533	0,535	0,533	0,531	0,550
0,662	0,660	0,677	0,665	0,660	0,679
1,069	1,060	1,083	1,069	1,060	1,082

e cuja ordenada na origem corresponde a k'_1 do sistema. O conhecimento de k_2 permite o cálculo de k'_1 pela função de Gran da zona ácida e verifica-se que ambos estes valores são concordantes. Para o ramo básico pressupõe-se, também, o declive teórico de Nernst para o cálculo do volume equivalente; da concentração da base é possível determinar $K_{ag} = C_b\ 10^{(-k'1/QF)} / B$, e com este valor determina-se $E = f\,[-\log c_{H^+}]$ para a zona alcalina. O valor de $K_{ag} = C_b\ 10^{(-k'1/QF)} / B$ é agora recalculado usando os parâmetros de calibração do sistema obtidos para $E = f(-\log c_{H^+})$ para a zona alcalina, observando-se uma variação média de 0,02 unidades de pK entre estes valores.

Em todas as calibrações efectuadas com as soluções anteriormente descritas os volumes equivalentes foram determinados pelo método da segunda derivada (MSD) (incluído no programa de controlo do sistema de calibração) e pelo método de Gran, como acima descrito. Verificou-se sempre uma grande concordância entre os valores dos volumes equivalentes determinados pelo MSD e pelo Gran da zona ácida, mas nem sem-

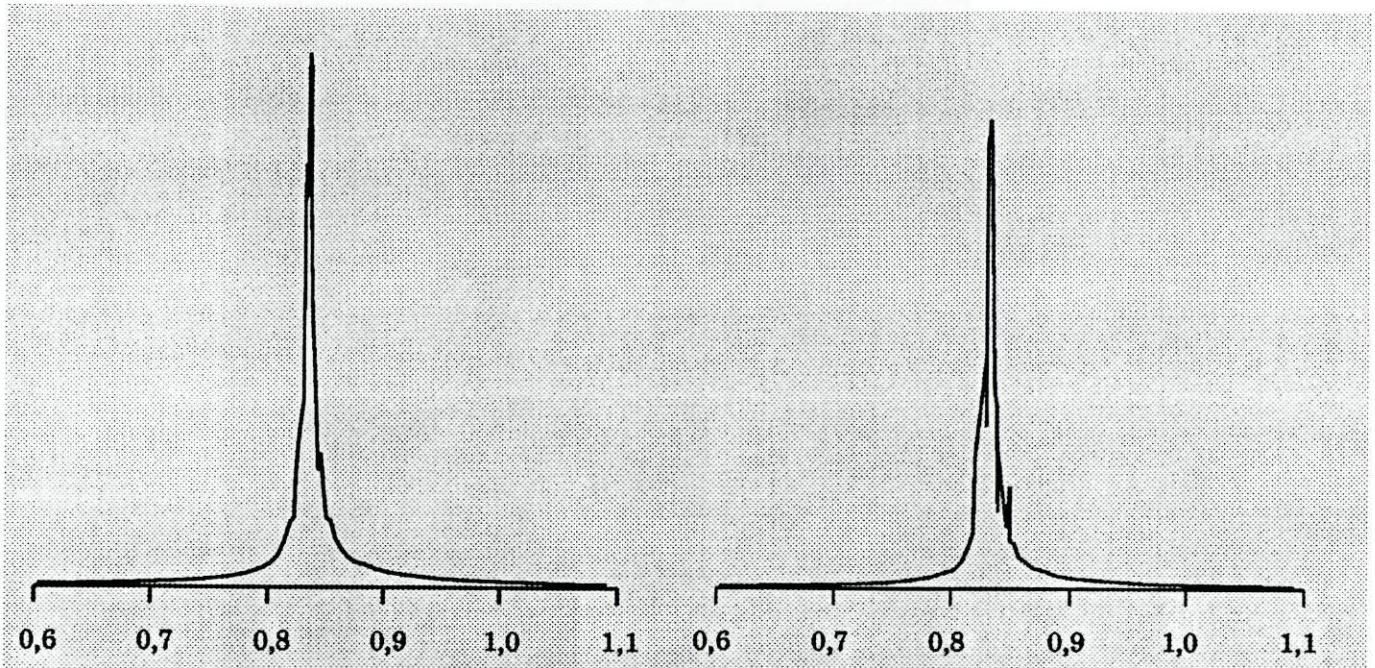


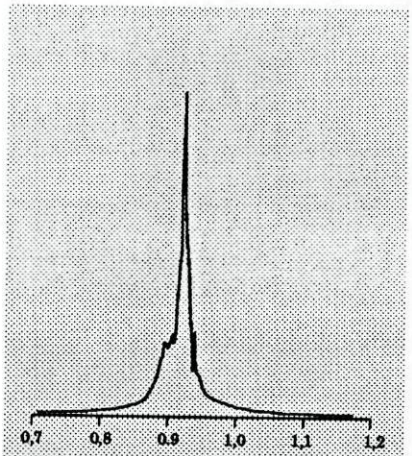
Figura 7.2 **Representação gráfica da 1ª derivada da curva de titulação de HCl com NaOH referente à primeira linha da Tabela I: (a) 1º eléctrodo; e (b) 2º eléctrodo. Evidenciando a ausência de carbonato que parecia poder existir para o caso (b) dada a diferença entre os volumes equivalentes determinados pelos dois ramos do método de Gran**

pre pelo Gran da zona alcalina (Tabela 7.1). Esta situação já tem sido verificada e é atribuída à existência de uma ligeira percentagem de carbonato na solução[183,1833] e/ou ao erro inerente a qualquer ajuste de dados experimentais a um modelo teórico,[181] neste último caso assume-se um volume equivalente que é a média dos volumes encontrados nos dois ramos, supondo que o desvio padrão é igual à precisão da bureta.

A análise dos resultados experimentais obtidos neste trabalho permite afirmar que para uma mesma solução titulada, simultaneamente,

Tabela 7.2 **Variação da diferença entre os valores de V_{ac} e de V_{alc} (ΔV), determinados pelo método de Gran ao longo de sete semanas, para dois eléctrodos diferentes (1 - Philips; 2 - Ingold) numa mesma solução amostra**

Semana	ΔV_1	ΔV_2
1	0,001 ± 0,005	0,052 ± 0,01
2	0,013 ± 0,005	0,069 ± 0,01
3	0,011 ± 0,005	0,058 ± 0,01
4	0,016 ± 0,005	0,058 ± 0,01
5	0,025 ± 0,01	0,084 ± 0,02
6	0,108 ± 0,05	0,128 ± 0,05
7	0,230 ± 0,05	0,234 ± 0,05



Exemplo de um gráfico da 1ª derivada para uma solução carbonatada com ΔV= 0,05

com dois eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio, os volumes equivalentes nos dois ramos são iguais ou diferentes consoante o eléctrodo utilizado (Tabela 7.1). Por exemplo o tratamento dos dados experimentais obtidos para o primeiro exemplo da Tabela 7.1, pelo método de Gran, faz pressupor, dada a diferença encontrada nos volumes equivalentes determinados por este método, a existência de uma certa percentagem de carbonato associada aos resultados do 2º eléctrodo mas não aos do 1º eléctrodo. Contudo os gráficos de primeira derivada (Figura 7.2) mostram uma ausência de carbonato em ambos os casos. Esta situação foi várias vezes encontrada, ao longo da realização experimental deste trabalho, e quase sempre aliada a eléctrodos cujo tempo de utilização era superior a um/dois meses.

A análise dos resultados obtidos pelo método de Gran para a calibração de uma mesma solução amostra com dois eléctrodos diferentes (um

novo (Philips) e outro já várias vezes utilizado (Ingold)), ao longo de sete semanas, permite verificar uma alteração gradual dos parâmetros de calibração da zona alcalina, alteração esta, profundamente evidenciada pelo aumento da diferença entre os valores dos volumes equivalentes determinados para o ramo ácido e para o ramo básico por este método (Tabela 7.2).

Dado os resultados acima obtidos a ausência de carbonato nas soluções de hidróxido de sódio utilizadas foi sempre verificada pela utilização conjunta do método de Gran, método tradicionalmente usado, e pela representação gráfica da primeira derivada obtida com o programa de controlo do sistema de titulação.[161]

Os resultados experimentais obtidos nas várias calibrações efectuadas ao longo de todo este trabalho permitem tirar uma série de conclusões que se passam a referir:

- A utilização do método de Gran, para titulações ácido forte/base forte, é um método rápido e preciso de calibrar o sistema. Necessitando apenas de pontos experimentais afastados do ponto de equivalência permite minimizar o tempo de execução experimental por utilização de titulações monotónicas, fornecendo resultados concordantes com os das titulações dinâmicas muito morosas.
- O comportamento dos eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio pode ser avaliada, através dos parâmetros de calibração, e da diferença de volumes equivalentes calculados pelo método de Gran para a zona ácida e para a zona alcalina, pela utilização deste mesmo método de calibração, sem a aquisição de novos dados experimentais, permitindo controlar a sua "degradação" ao longo do tempo.
- Esta "degradação" verificada para os eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio mostra que a utilização do método de Gran, para

controlo da percentagem de carbonato nas soluções a analisar, não permite por si só (para diferenças inferiores a 0,2 cm^3) verificar a ausência ou presença da carbonato, pois estas diferenças de volume equivalente obtidas pelo método de Gran para a zona ácida e zona alcalina podem não ser provocadas pela presença de carbonato, mas sim devidas ao sistema de eléctrodos usados.

3 Calibração do sistema em água/metanol

Para a obtenção de resultados potenciométricos precisos em sistemas mistos é necessário ter em consideração certos parâmetros que podem afectar o funcionamento do sistema de eléctrodos utilizado. A habilidade de um eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio responder a variações de actividade deste catião está associada à hidratação da membrana de vidro que dilata ligeiramente quando imersa numa solução aquosa e adquire uma camada de hidratação à medida que a água penetra na sílica o que parece facilitar o movimento de iões na membrana de vidro e baixar a sua resistência eléctrica. Para soluções não aquosas o equilíbrio de permuta iónica entre os iões em solução e os iões da membrana de vidro pode estabelecer-se lentamente e quando uma solução varia de básica para ácida ou vice-versa pode observar-se uma resposta lenta do eléctrodo e um dos factores que influencia esta velocidade de resposta é o grau de desidratação da membrana. Se se deixar "secar" o eléctrodo por desidratação não aquosa, ele deixa de responder a variações de actividade do catião hidrogénio.[169] Assim as medições efectuadas em solventes mistos ou não aquosos devem ser intercaladas com lavagens do eléctrodo em solução aquosa para garantir a hidratação da membrana.

ELÉCTRODOS DE REFERÊNCIA

Os eléctrodos com soluções aquosas de referência quando são colocados em meios mistos ou não aquosos adquirem um elevado potencial de junção de-

vido às diferentes velocidades de difusão dos iões nestes solventes e nas soluções aquosas contidas neste eléctrodo; estas diferenças de velocidade podem provocar leituras instáveis e obrigar a um maior tempo de estabilização. Estes potenciais de junção podem ser minimizados pela escolha do tipo de junção (junção que permita uma menor difusão de solução), pelo tipo de solução de enchimento e pela utilização de uma dupla junção que contenha uma solução com uma matriz semelhante à da amostra.[176]

A obtenção de valores correctos de pH num solvente misto ou não aquoso depende das características do próprio solvente e o modo de calibrar uma célula com junção líquida que contenha um eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio e um eléctrodo de referência imersos numa solução de ácido ou base preparada no mesmo solvente misto ou não aquoso pode diferir substancialmente da calibração em soluções aquosas.[184] A escala operacional de pH para soluções tampão de referência em solução aquosa foi desenvolvida através de medições potenciométricas, como se refere em 7.2. Este mesmo procedimento só é válido para solventes mistos ou não aquosos com elevada constante dieléctrica de modo a que o ácido clorídrico esteja completamente dissociado, que é o caso das calibrações em soluções mistas de água/metanol.

Definição de $_s^s$pH

Tal como para o caso das soluções aquosas, o conceito de pH num solvente *s* é definido por[185]

$$ {}_s^s\mathrm{pH} = \mathrm{p}\,{}_s^s a_{H^+} = -\log\left({}_s^s\gamma_{H^+}\, c_{H^+}\right) \qquad (7.9) $$

onde ${}_s^s a_{H^+}$ é a actividade do catião hidrogénio à concentração c_{H^+} e ${}_s^s\gamma_{H^+}$ é o correspondente coeficiente de actividade. De modo análogo ao de soluções aquosas ${}_s^s$pH é definido operacionalmente. Determina-se a fem ${}^sE(S)$ de uma solução referência, ${}_s^s$pH(S) com a célula operacional IV.

Célula (IV) **eléctrodo referência | ponte salina em s || solução ${}^{s}_{s}$pH(S) | H_2 (g) | Pt**

e exactamente nas mesmas condições, substitui-se a solução ${}^{s}_{s}$pH(S) por uma solução amostra com ${}^{s}_{s}$pH(X) desconhecido. Como ${}^{s}E(S)$ e ${}^{s}E(X)$ são função linear dos valores ${}^{s}_{s}$pH(S) e ${}^{s}_{s}$pH(X), respectivamente, de acordo com a relação de Nernst, vem

$$ {}^{s}_{s}\mathrm{pH(X)} = {}^{s}_{s}\mathrm{pH(S)} - [\,{}^{s}E(X) - {}^{s}E(S)]\,/\,k + [\,{}^{s}E_{JX} - {}^{s}E_{JS}\,] \qquad (7.10) $$

onde ${}^{s}E_{JX}$ e ${}^{s}E_{JS}$ são o potencial de junção líquida que aparece entre a solução amostra/ponte salina/solução referência, respectivamente. Estes últimos são considerados desprezáveis se a ponte salina for composta por uma solução concentrada de um sal binário no mesmo solvente *s* das respectivas soluções.[185]

Com base neste método, actualmente, já existem algumas soluções tampão de referência para solventes mistos[186,187] contudo ainda não está totalmente resolvido o problema das calibrações das células nestes solventes e as limitações, apontadas na secção anterior, para a utilização de tampões na calibração de células potenciométricas em água, não só se mantêm para soluções mistas, como até são exacerbadas, especialmente no que diz respeito à variabilidade dos potenciais de junção.

CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

Sendo o metanol um dos solventes não aquosos mais semelhante à água no que diz respeito ao seu comportamento protolítico é de supor que a calibração de um sistema misto água/metanol possa ser efectuado em função de - log c_{H^+} de uma maneira análoga à dos sistemas aquosos, o que permitirá determinar constantes de equilíbrio estequiométricas que possam ser comparadas com as determinadas para solventes aquosos e obter informação sobre o modo como o solvente influencia o equilíbrio em solução.

Velocidade de difusão para diferentes junções:

Cerâmica	≈ 5 μmoles Cl^- / hora
Quartzo	≈ 50 μmoles Cl^- / hora
Anelar	≈ 50 mmoles Cl^- / hora
Manga	≈ 500 mmoles Cl^- / hora

Neste trabalho foram utilizados vários eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio, mas os eléctrodos de referência foram sempre de prata/cloreto de prata de dupla junção Metrohm (Capítulo 6), pois alguns estudos efectuados com o eléctrodo de referência Orion mostraram que este último fornece resultados menos precisos, isto é, as leituras são muito mais instáveis e o tempo de estabilização é muito superior, principalmente para as soluções em 50% água/metanol. Estas diferenças são, talvez, provocadas pelos diferentes tipos de junções líquidas dos dois eléctrodos, (Metrohm: cerâmica; Orion: polímero sintético), pois como já foi referido o formato e o material de que são feitas as junção influenciam as velocidades de difusão.

A calibração do sistema em água/metanol, até 50% (v/v) em metanol foi sempre efectuada usando a célula (III) em função da concentração de catião hidrogénio por titulação de soluções de ácido forte (HCl = 0,001 *M*; diferentes proporções água/metanol) com base forte (solução aquosa de NaOH 0,01 a 0,03 *M*) sempre a uma força iónica de 0,1 *M* em NaCl, à temperatura de 25 °C e sempre sob atmosfera de azoto, utilizando o método de Gran[179] e a equação de Nernst.

O potencial da célula (III), em misturas de água/metanol, poderá ser dado por (*vide* Capítulo 5)

$$^{s}E = k_1 + k_2 \log c_{H^+} + k_2 \log {}^{s}_{ag}\gamma_{H^+} \qquad (7.11)$$

onde ${}^{s}_{ag}\gamma_{H^+}$, o coeficiente de actividade total de transferência (efeito total do meio), é dado por $\log {}^{s}_{ag}\gamma_{H^+} = \log {}^{s}_{ag}\gamma^{0}_{H^+} + \log {}^{s}_{s}\gamma_{H^+}$; ${}^{s}_{ag}\gamma^{0}_{H^+}$ é o coeficiente de actividade de transferência primário (efeito primário do meio) e está associado com a mudança de meio de água para água/metanol; e ${}^{s}_{s}\gamma_{H^+}$ o efeito da concentração (o coeficiente de actividade do catião hidrogénio no solvente *s* referido ao estado padrão no mesmo solvente).[51,188,189] O termo k_1 contém o potencial normal padrão ($^{s}E^{0}_{cel}$) e os potenciais de junção, quantidades que são constantes e independentes da composição do solvente em mei-

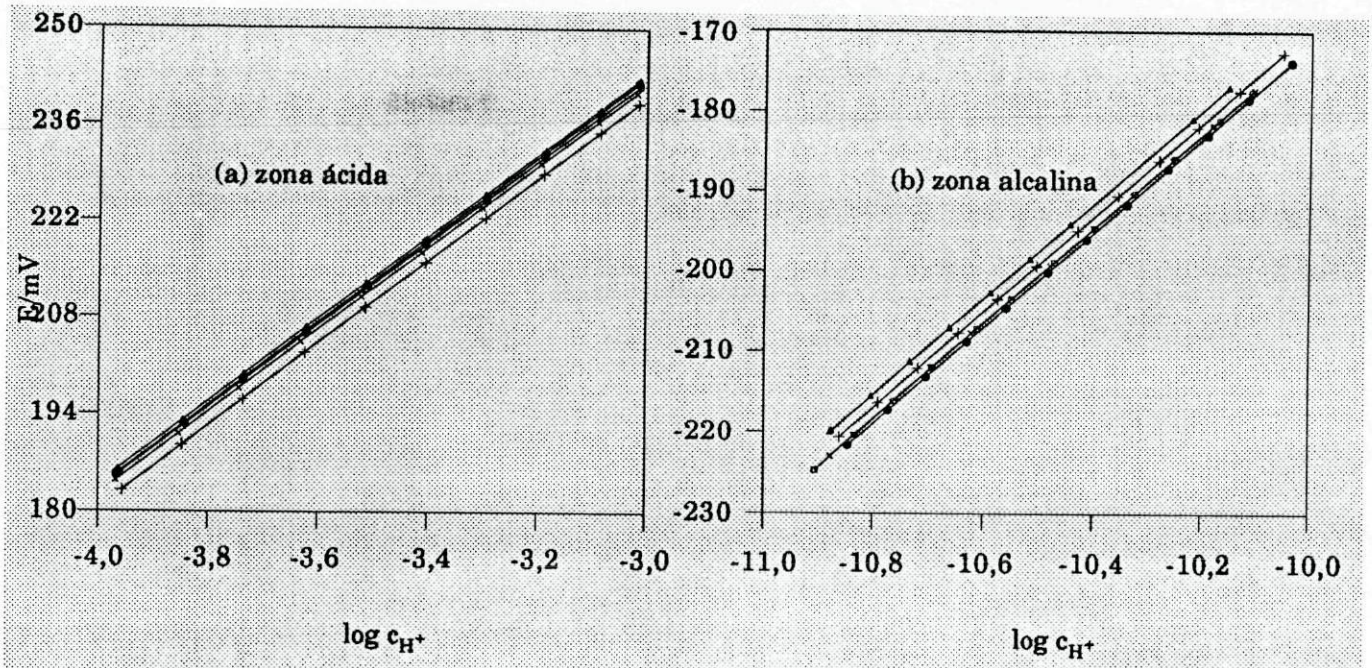
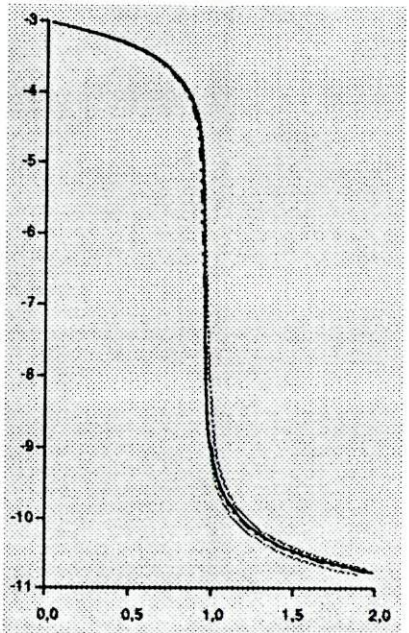


Figura 7.3 **Representação gráfica da função $^sE = f(-\log c_{H^+})$ para as diferentes percentagens de água/metanol utilizadas: (a) zona ácida; e (b) zona alcalina**

os hidrometanólicos e $k_2 = 2{,}303\ RT/F$ em que R, T e F têm o significado habitual já descrito. Quando a força iónica é mantida constante o coeficiente ${}^s_s\gamma_{H^+}$ é constante e a equação 7.11 pode ser escrita como

$$^sE = {}^sk + k_2 \log c_{H^+} \qquad (7.12)$$

onde ${}^sk = k_1 + k_2 \log {}^s_s\gamma_{H^+} + \log {}^s_{ag}\gamma^0_{H^+}$: os dois primeiros termos são independentes da composição do solvente e o último é proporcional à energia de Gibbs de transferência do catião hidrogénio de água para água/metanol e por isso o único termo dependente da composição do solvente (para uma força iónica de 0,1 M neste trabalho).



Representação gráfica de log c_{H^+} em função do volume de titulante adicionado para diferentes composições de água/metanol

A linearização da curva de titulação e o cálculo dos volumes equivalentes foram efectuados seguindo a metodologia descrita em 7.2. As funções de Gran foram sempre lineares, tanto na zona ácida como na zona básica, e os volumes equivalentes calculados foram sempre concordantes para qualquer percentagem água/metanol utilizada até 50% (v/v). As diferenças entre os volumes equivalentes determinados pelo método de Gran na zona ácida e na zona básica são da ordem de grandeza dos observados em solução aquosa e dependem fundamentalmente do sistema de eléctrodos utilizado.

Os resultados experimentais obtidos permitem verificar que para todas as percentagens de água/metanol estudadas, ${}^{s}E = f(-\log c_{H^+})$ são funções lineares com o mesmo declive, k_2, mas com ordenadas na origem, ${}^{s}k_{exp}$, que variam com a composição do solvente (Figura 7.3), tanto na zona ácida como na zona alcalina, havendo apenas uma ligeira diminuição do declive k_2 da zona alcalina o que está de acordo com as características gerais dos eléctrodos sensíveis ao catião hidrogénio. As curvas de titulação de - log c_{H^+} em função do volume de titulante adicionado são praticamente sobreponíveis em toda a zona de - log c_{H^+} estudada (ver figura anexa), o que mostra que a concentração de catião hidrogénio é independente da percentagem de água/metanol, como era de esperar.

Sendo $\log {}^{s}_{ag}\gamma^{\rho}_{H^+}$ proporcional à energia de Gibbs de transferência do catião hidrogénio de água para água/metanol (Capítulo 2) e sendo este o único termo que faz variar ${}^{s}k_{exp}$ (equação 7.12) é de esperar que haja uma correlação entre estes dois parâmetros. Os resultados experimentais obtidos para ${}^{s}k_{exp}$ em várias titulações independentes mostram uma tendência para aumentar de 0% a 30% de metanol e diminuír ligeiramente até 50% de metanol no entanto a variabilidade neste último é grande o que torna o seu valor menos preciso. Os valores actualmente aceites pela IUPAC para

Tabela 7.3 Parâmetros de calibração do sistema de titulação nas diferentes percentagens água /metanol

% CH_3OH	$^{s}k_{exp}$	pK_{ag}	$pK_{ag}^{(Lit)}$	ΔG_t / KJmol$_{-1}$
0	420,0	13,80	14,00	—
10	420,5	13,82		0,5
20	421,6	13,83	14,04	0,8
30	421,0	13,84		0,7
40	420,7	13,85	14,08	0,4
50	418,1	13,86		-0,2

função de Gibbs de transferência do catião hidrogénio de água para água/metanol[190] mostram esta mesma tendência verificando-se, no geral, uma relação linear para $^{s}k_{exp} = f(\log {}^{s}_{ag}\gamma^{0}_{H^+})$ (Tabela 7.3).

As observações feitas nos dois parágrafos anteriores permitem confirmar que ^{s}k apenas varia devido ao termo $\log {}^{s}_{ag}\gamma^{0}_{H^+}$ quantidade proporcional à energia de Gibbs de transferência do catião hidrogénio de água para água/metanol, e verificam experimentalmente a existência da relação linear dada pela equação 7.12 para qualquer composição de solvente utilizada neste trabalho.

pK_s OPERACIONAL

Os valores de pK_s^{op} para as misturas água/metanol foram determinados pelo método de Gran pela maneira descrita em 7.2 para soluções aquosas. Os valores referidos na literatura para as constantes de autoprotólise nestas misturas, pK_{SH}, aumentam linearmente com o aumento da quantidade de metanol até 60% (p/p) em metanol[191,1927] e verifica-se que os valores ex-

perimentalmente obtidos para pK_s^{op} aumentam também ligeiramente desde água pura até 50% de água/metanol (tabela 7.3). Os valores de pK_s^{op} obtidos estão de acordo com o comportamento verificado para vários solventes mistos na região rica em água, o que faz supor que nesta região é a água que actua como base[193]. Supõe-se que o centro aquoso da camada de hidratação do protão vai interactuar com a molécula orgânica por ligações de hidrogénio que fazem aumentar a basicidade do centro aquoso fazendo diminuir a sua afinidade protónica, cada soluto orgânico afecta as moléculas de água vizinhas e torna-as mais básicas por isso a concentração destas moléculas de água mais básicas variam linearmente com a concentração de soluto orgânico.

Potenciais de Junção

Como já foi referido os potenciais de junção não variam no meio água/metanol, no entanto foi efectuada a determinação dos potenciais de junção para as condições experimentais em que as várias calibrações foram efectuadas e como se esperarava estes são desprezáveis. Utilizou-se o método de Rossotti[191] em que se considera que o potencial de junção líquida varia linearmente com a concentração de catião hidrogénio (meio ácido: E_J = constante x c_{H^+}) ou com a concentração de anião hidróxido (meio alcalino: E_J = constante' x c_{OH^-}). Para o meio ácido, a representação da função ${}^sE - {}^sk_{exp} \log c_{H^+} = f(c_{H^+})$ forneceu uma recta paralela ao eixo das abcissas e para o meio alcalino, a representação da função ${}^sE - {}^sk_{exp} \log c_{OH^-} = f(c_{OH^-})$ também forneceu uma recta paralela ao eixo das abcissas o que mostra, em ambos os casos, que o valor do potencial de junção é desprezável.

Considerações Gerais

A maior parte dos estudos potenciométricos de constantes de equilíbrio em solventes mistos tem sido efectuada para substâncias pouco solúveis em água numa tentativa de caracterizar as suas propriedades de ionização

mas sem o objectivo de correlacionar propriedades químicas em diferentes solventes. Estes sistemas foram em geral calibrados em função de soluções padrão de referência em soluções aquosa[194,195] ou em termos de soluções padrão de referência em solventes mistos[196] e em alguns casos nem sequer se descreve em detalhe o processo de calibração, o que neste último caso dá origem à determinação de constantes de equilíbrio mistas.[7.42,43] Recentemente surgiu um trabalho em que se tenta relacionar o pH definido operacionalmente para um tampão aquoso, com a concentração do catião hidrogénio da solução amostra, esta em água/metanol, através de uma expressão matemática multiparamétrica,[197] para se obter valores de constantes de equilíbrio estequiométricas. No entanto não foi obtido nenhum factor de conversão que fosse aplicável a todo a gama de pH utilizada, o que mostra que, tal como para soluções aquosas, não é possível encontrar um termo de conversão que permita comparar, para toda a gama de pH, valores de pH com valores de - log c_{H^+}.

Alguns autores[194,195] sugerem que a calibração em água/metanol seja feita directamente em função de - log c_{H^+}, e estes empregam uma metodologia análoga à utilizada neste trabalho e em ambos os casos é efectuada uma análise estatística dos resultados obtidos nas várias calibrações. Fisicaro[195] afirma que a análise de titulações potenciométricas ácido forte/base forte obriga a determinação de uma constante de equilíbrio, pK_{ag}, e que o erro associado a esta determinação é da mesma ordem de grandeza do erro associado à determinação de posteriores constantes de equilíbrio num mesmo sistema e afirma que este erro advém principalmente da variabilidade existente entre as várias titulações consecutivas e não de erros provenientes dos pontos experimentais de uma mesma titulação.

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho mostram que a calibração do sistema por titulação directa ácido forte/base forte (método

de Gran) com $c_{H^+} = 10^{-3}\ M$ e concentração de titulante da ordem dos $10^{-2}\ M$ permite obter valores de - log c_{H^+} para qualquer solução água/metanol até 50% (v/v) em metanol a partir das rectas de calibração ${}^sE$ vs - log c_{H^+}, obviando assim os problemas associados à determinação de parâmetros de conversão que permitam relacionar actividades com concentrações de modo a permitir a posterior determinação de constantes de equilíbrio estequiométricas.

4 Conclusões

O sistema automático de titulação descrito em 7.1 mostrou-se uma boa alternativa aos sistemas automáticos comerciais permitindo uma muito maior versatilidade na aquisição de resultados potenciométricos, num espaço de tempo menor, e com uma óptima precisão; a reprodutibilidade nos valores de potencial obtidos foi sempre excelente e as adições de volume (controladas por pesagem) foram sempre rigorosas.

O modo de calibração deste sistema mostrou-se também bastante preciso e uma análise global de todos os resultados experimentais obtidos durante a realização experimental deste trabalho, no que diz respeito às numerosas calibrações efectuadas, permite afirmar que a variabilidade nos parâmetros de calibração determinados é inferior à normalmente descrita na literatura.[181]

A utilização do comutador de eléctrodos, associado ao sistema de titulação, permitiu verificar que o comportamento dos eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio, variam de eléctrodo para eléctrodo. Este diferente comportamento pode não ser detectado quando se utiliza um único eléctrodo o que poderá fornecer informações duvidosas sobre o comportamento do sistema. Poder-se-á talvez concluir que para a maioria dos eléctrodos de vidro comerciais, sensíveis ao catião hidrogénio (indepen-

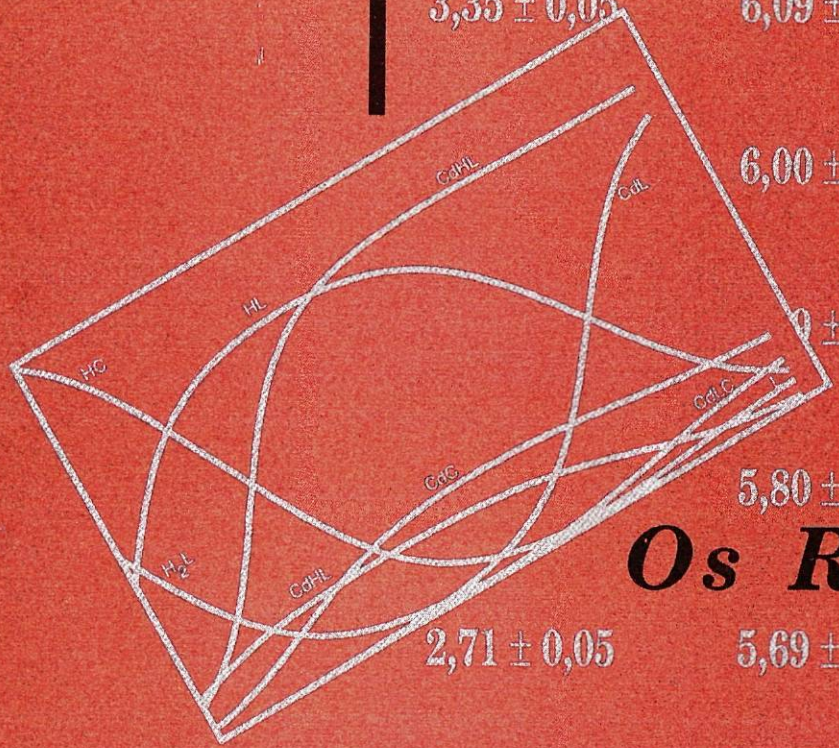
dentemente da marca) há uma variação nítida, ao longo de um curto espaço de tempo (máximo 2 meses) na sua resposta na zona alcalina, situação que poderá afectar a precisão com que serão determinadas constantes de equilíbrio nesta zona.

A precisão dos resultados obtidos permitiu ainda comparar parâmetros de calibração obtidos em solução aquosa e em soluções mistas água/metanol. Verificou-se que o declive da equação de Nernst se manteve inalterado para as várias misturas hidrometanólicas utilizadas e que a diferença entre as ordenadas na origem obtidos nestas diferentes soluções são proporcionais aos valores do coeficiente de actividade de transferência primário (efeito primário do meio), ${}^{s}_{ag}\gamma^{0}_{H^+}$, coeficiente que está associado à mudança de meio de água para água/metanol (*vide* Capítulo 2).

Parte Terceira

Os Resultados

Diazepam	*Medazepam*	*Clorodiazepóxido*
		$4{,}82 \pm 0{,}03$
$3{,}35 \pm 0{,}05$	$6{,}09 \pm 0{,}04$	$4{,}68 \pm 0{,}03$
	$6{,}00 \pm 0{,}03$	$4{,}59 \pm 0{,}03$
	$\pm 0{,}04$	$4{,}46 \pm 0{,}02$
	$5{,}80 \pm 0{,}04$	$4{,}32 \pm 0{,}04$
$2{,}71 \pm 0{,}05$	$5{,}69 \pm 0{,}04$	$4{,}19 \pm 0{,}05$



Capítulo

8

Sistema citidina/glicilglicina/ catião do grupo 12

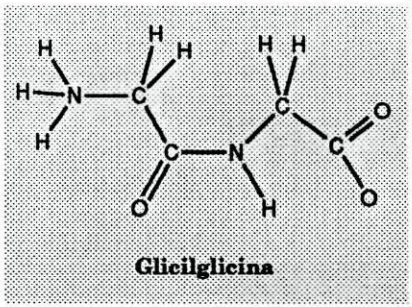
A IMPORTÂNCIA DAS INTERACÇÕES ENTRE CATIÕES METÁLICOS E LIGANDOS COM relevância biológica tem sido muito estudada e é hoje bem conhecida, pois sob condições puramente biológicas existem sempre numerosas interacções entre vários ligandos e catiões metálicos nos fluidos biológicos. Por definição a espécie mais simples que existe é um complexo ternário[112] que consiste na interacção de um metal com dois ligandos diferentes em que nenhum deles seja o solvente.

A existência de um complexo ternário citidina/catião zinco(II)/glicilglicina foi proposta por Li *et al*[198] resultado que não era de esperar pois a coordenação deste catião com a citidina em $(CH_3)_2SO$ ocorre em muito pequena extensão[199] e não se detectou nenhuma interacção deste catião com a citosina monofosfatada.[200] Os autores verificaram que a) a constante de equilíbrio entre este catião e a glicilglicina, medida potenciometricamente, tinha o mesmo valor na presença e na ausência de citidina, e b) que os desvios químicos do núcleo H5 da citidina, em soluções com concentração variável de cloreto de zinco(II) e pH fixo (para diferentes experiências a pH 4,7 e 5,3) são sempre maiores quando a glicilglicina está presente.

Com base nestas observações concluíram que, em soluções equimoleculares de citidina e glicilglicina, só existe o complexo ternário.

Como a glicilglicina e a citidina são ligandos biológicos relativamente bem estudados[201-206], decidiu-se usar o sistema citidina/glicilglicina/catião metálico do grupo 12 não só para testar o sistema de titulação potenciométrico já descrito no Capítulo 7, mas também para verificar a hipótese, levantada por Li *et al*[198], de ocorrer uma interacção entre o zinco(II) e a citidina na presença de glicilglicina. Estudos efectuados sobre a actividade biológica do catião cádmio(II)[3] caracterizaram-no como um catião tóxico com actividade carcinogénica através de uma possível interacção com bases nucléicas. Assim estudaram-se as possíveis interacções deste catião com os ligandos já referidos podendo os resultados obtidos ser interpretados como um modelo para as possíveis interacções deste catião com as bases do DNA, tal como estudos semelhantes efectuados para outros nucleosídeos ou nucleotídeos.[207]

1 Glicilglicina: protão e catiões metálicos



Glicilglicina

TODAS AS DETERMINAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS FORAM EFECTUADAS COM O SISTEMA de titulações automáticas já descrito no Capítulo 7, o eléctrodo de referência de prata/cloreto de prata de dupla junção da Merck e eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio da marca Metrohm ou Philips (Capítulo 6). A calibração do sistema foi efectuada como se descreve no Capítulo 7, usando ácido nítrico 0,001 *M* com força iónica ajustada a 0,1 *M* com $NaClO_4$ ou 0,6 *M* com KNO_3 e hidróxido de sódio 0,01/0,05 *M* também com força iónica ajustada a 0,1 *M* com $NaClO_4$ ou 0,6 *M* com KNO_3; todas as determinações foram efectuadas a 25 °C.

As constantes de acidez da glicilglicina foram determinadas por titulação de 25 cm^3 de HNO_3 0,1 m*M* (I = 0,1 *M* $NaClO_4$; 25°C) na presença

de 1m*M* ou 2,5 m*M* de ligando com NaOH 0,03 *M*, sob atmosfera de azoto. Foram também efectuados alguns ensaios a força iónica 0,6 *M* em KNO_3. As constantes de estabilidade dos complexos binários foram determinadas por titulação de 25 cm^3 de HNO_3 (0,4 m*M* - 10 m*M*; I = 0,1 *M* $NaClO_4$; 25°C) na presença de $M(NO_3)_2$ ou MCl_2 (0,6m*M* – 40 m*M*) e na presença de ligando (1 m*M*–10 m*M*), com NaOH 0,03 *M*, sob atmosfera de azoto.

O cálculo das constantes de acidez e de estabilidade dos complexos binários formados foi efectuado com o programa SUPERQUAD.[89] Os resultados obtidos, para as constantes de acidez provêm de valores de pelo menos seis titulações independentes, cada uma com mais de 20 pontos experimentais. Os resultados obtidos para as constantes de estabilidade provêm de valores de pelo menos 10 titulações independentes, com diferentes razões metal/ligando e até valores de - log c_{H^+} onde começa a precipitação dos hidróxidos dos catiões em estudo, bem visível na curva de titulação. Os equilíbrios de hidrólise[208] do catião Zn^{2+} e do catião Cd^{2+} e os equilíbrios Zn^{2+}/Cl^- e Cd^{2+}/Cl^- em solução[209] foram incluídos em todos os modelos testados. O pK_{ag} utilizado foi determinado neste trabalho (Capítulo 7) e foi nestes casos de 13,75.

pK_a Glicilglicina

As constantes de acidez da glicilglicina estão extensivamente estudadas[210] sendo pK_{a1} atribuído à ionização do grupo carboxílico e pK_{a2} à ionização do grupo amina, pois o grupo amida (ligação peptídica) é considerado neutro na ausência de iões metálicos.[211] Os resultados obtidos neste trabalho foram determinados quer utilizando titulações numa zona de - log c_{H^+} entre 3 e 9, o que permitiu o cálculo simultâneo das duas constantes de acidez, quer utilizando apenas as zonas de - log c_{H^+} em que cada uma das constantes é relevante, isto é 3 < - log c_{H^+} < 5 para pK_{a1} e 7 < - log c_{H^+} < 9 para pK_{a2}. Em ambos os casos os valores obtidos são concordantes não só entre si, como com os descritos na literatura, para as mesmas condições

Tabela 8.1 Constantes de acidez da glicilglicina

	Presente trabalho		Literatura[210]	
I/moldm^{-3}	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
0,1	3,05±0,01	7,98±0,01	3,13±0,05	8,08±0,03
0,6	3,15±0,01	8,12±0,01	—	—

experimentais (Tabela 8.1). Os valores de pK_a são dependentes da força iónica, como se vê pelo aumento de 0,10 e 0,14 nos valores de pK_{a1} e pK_{a2}, respectivamente, quando a força iónica varia de I = 0,1 *M* para I = 0,6 *M*. Este comportamento é semelhante ao observado para aminoácidos, e.g., os valores de pK_{a1} e pK_{a2} para a glicina variam de 0,2 e 0,05, respectivamente, quando a força iónica varia de 0,1 *M* para 0,65 *M*.[212, 213] De referir que as determinações efectuadas a diferentes forças iónicas foram sempre antecedidas por calibrações ácido forte/base forte à mesma força iónica e com o mesmo electrólito inerte.

O valor da constante de acidez atribuída à ionização do grupo amina, pK_{a2}, foi obtida a partir de valores de - log c_{H^+} determinados tanto por calibrações na zona ácida, - log c_{H^+} entre 2,9 e 3,8, como por calibrações na zona alcalina, - log c_{H^+} entre 10 e 11 verificando-se uma óptima concordância entre todos os valores. De realçar que quando as determinações foram efectuadas com um eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio com um tempo de vida superior a dois meses (*vide* Capítulo 7) o valor de pK_{a2} se mantinha inalterado, desde que se utilizassem todos os parâmetros de calibração determinados pelo método de Gran para a zona alcalina. Isto é, quando a diferença entre os volumes equivalentes obtidos pelo método de Gran, quer para a zona ácida, quer para a zona alcalina,

Tabela 8.2 Constantes de formação da glicilglicina com o catião zinco(II) e cádmio(II)

M^{2+}	$\log \beta_{110}$		$\log K_f^N$		$\log \beta_{11\text{-}1}$
	P.T.[a]	Literatura[214]	P.T.[a]	Literatura[210]	
Zn^{2+}	—	0,64±0,01	3,40±0,05	3,44±0,03	-4,58±0,04
Cd^{2+}	1,02±0,08	—	3,02±0,05	2,90±0,05	-4,96±0,05

[a] Resultados obtidos no presente trabalho

eram superiores a 0,05 a concentração de titulante determinada pelo ramo ácido não era concordante com a concentração de titulante determinado pela zona alcalina, no entanto a utilização desta última, conjuntamente com os valores determinados para este ramo para o declive e a ordenada na origem da equação de Nernst, permitiram sempre obter valores de pK_{a2} concordantes.

Constantes de Formação

Os valores obtidos para as constantes de complexação de catião Zn^{2+} e do catião Cd^{2+} com a glicilglicina são concordantes com resultados já descritos obtidos tanto por ressonância magnética nuclear (RMN)[214] como por potenciometria[210] (Tabela 8.2). Os resultados de RMN descritos na literatura mostram a existência de dois locais de coordenação - um que envolve o grupo carboxílico e é importante para altas concentrações de catião hidrogénio, e o outro que envolve o grupo amina.

O modelo usado para análise dos resultados experimentais obtidos assumiu a existência de duas espécies complexantes em solução, $ML_{(NH_2)}$ e $MHL_{(COO^-)}$, onde HL simboliza a glicilglicina na forma de ião dipolar e L a glicilglicina desprotonada no grupo amina. No programa de cálculo definiram-se os equilíbrios:

$$M^{2+} + HL \rightleftharpoons MHL^{2+} \qquad \beta_{110} \qquad (8.1)$$

$$M^{2+} + HL \rightleftharpoons ML^{+} + H^{+} \qquad \beta_{11-1} \qquad (8.2)$$

em que ß têm o significado descrito no Capítulo 6, além das constantes de acidez anteriormente determinadas, os equilíbrios de hidrólise dos catiões e as constantes de complexação dos respectivos catiões com o anião cloreto. O equilíbrio definido pela equação 8.2 engloba a constante de formação

$$M2^{+} + L^{-} \rightleftharpoons ML^{+} \qquad K_f^N \qquad (8.3)$$

em que $\log K_f^N = \log \beta_{11-1} - \log K_{a2}$

CATIÃO ZINCO(II)

Para o sistema catião zinco(II)/glicilglicina os resultados experimentais obtidos não permitiram detectar a formação da espécie $ZnHL^{2+}$ mas os valores obtidos para a constante de formação da espécie ZnL^{+} são idênticos, a menos do erro experimental, aos descritos na literatura.[210] A zona de - log c_{H^+} onde se dá a formação da espécie ZnL^{+} depende como é de esperar da razão metal/ligando e da ordem de grandeza das concentrações utilizadas. Verifica-se que para concentrações de glicilglicina da ordem dos 10^{-3} *M*, ordem de grandeza utilizada neste trabalho, só uma zona restrita da curva de titulação permite o cálculo da constante (- log c_{H^+} entre 5,4 a 7,5) valor este que, embora idêntico ao da literatura, poderia não ser o exacto devido às baixas concentrações usadas, no entanto, para concentrações da ordem dos 10^{-2} *M* de glicilglicina obtém-se o mesmo valor de constante numa zona de - log c_{H^+} muito mais ampla (- log c_{H^+} entre 3,8 a 7,5) (Figura 8.1A e B). Os resultados obtidos permitem afirmar que apesar de a ordem de grandeza das concentrações utilizadas neste trabalho serem baixas, permitem a obtenção de valores de constantes de formação precisas para uma percentagem de complexo formado de 47% em relação à concentração de glicilglicina total.

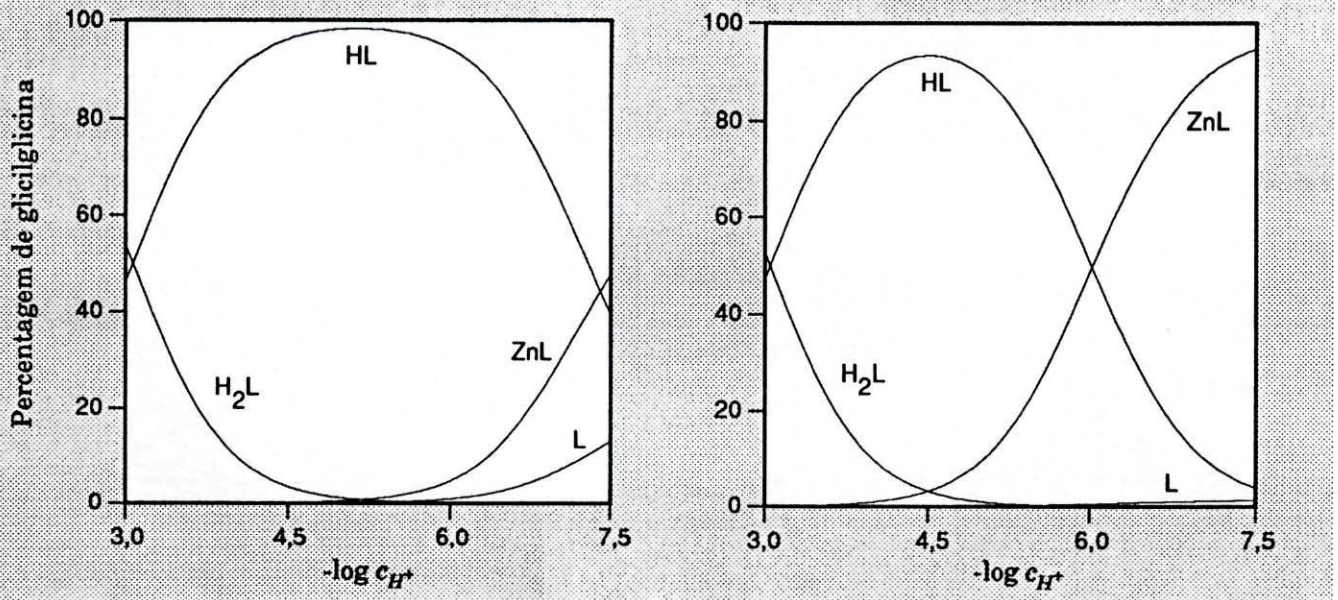


Figura 8.1 **Diagramas de distribuição para o sistema zinco/glicilglicina. A: $1x10^{-3}$ *M* de glicilglicina; B: $1x10^{-4}$ *M* de glicilglicina**

Catião Cádmio(II)

Para o sistema catião cádmio(II)/glicilglicina foi detectada a formação da espécie $CdHL^{2+}$ e a sua constante de complexação determinada. Contudo só se conseguiu obter valores completamente concordantes entre as várias titulações efectuadas para razões metal/ligando da ordem dos 25/10. Os resultados obtidos para concentrações mais baixas, 10^{-3} *M*, só detectam a formação desta constante para razões metal/ligando superiores a 5/1, contudo a incerteza aliada a estes valores foi grande. O valor obtido (Tabela 8.2), embora com uma precisão baixa devido à sua variabilidade para os ensaios obtidos com razões metal/ligando superiores a 10/5, é concordante com valores descritos na literatura determinados por RMN.[110] Os diagramas de

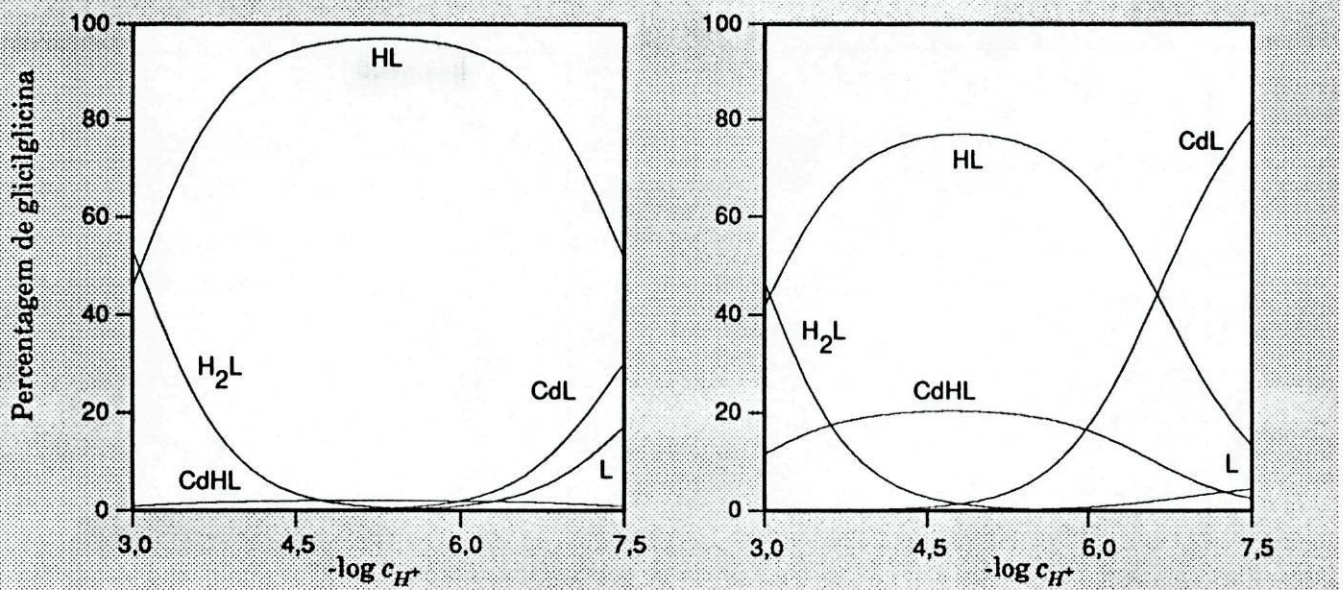


Figura 8.2 Diagramas de distribuição para o sistema cádmio/glicilglicina. A- $1x10^{-3}$ *M* de glicilglicina e $2x10^{-3}$ *M* de Cd^{2+}; B - $1x10^{-3}$ *M* de glicilglicina e $2,5x10^{-3}$ *M* de Cd^{2+}. Resultados obtidos a força iónica 0,1 *M* com $NaClO_4$ e a 25°C

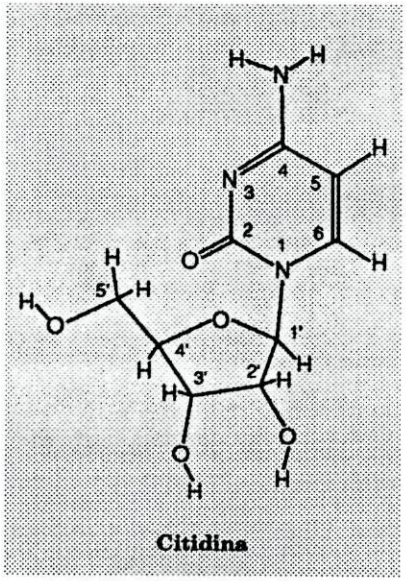
distribuição apresentados na Figura 8.2 mostram que para razões metal/ligando inferiores a 5/1 a espécie $CdHL^{2+}$ praticamente não se forma e para razões metal/ligando 25/10 a sua percentagem de formação é de 20% em relação à quantidade de glicilglicina usada.

A formação da espécie CdL^{+} ocorre de um modo análogo à do catião zinco(II), isto é, para concentrações de glicilglicina da ordem dos 10^{-3} *M* e o valor obtido para a sua constante de formação seja concordante com valores já descritos na literatura (Tabela 8.2) só uma zona restrita da curva de titulação permite a sua determinação; no entanto os valores assim obtidos são bastante precisos e iguais aos determinados com concentrações de glicilglicina da ordem dos 10^{-2} *M*.

Embora as condições experimentais utilizadas não favoreçam a formação das espécies ML_2, pois a concentração de metal é sempre igual ou superior à do ligando; e por outro lado como os resultados obtidos para as constantes de estabilidade não mostraram nenhuma dependência com as diferentes concentrações de metal não era de prever a formação de espécies M_2L, contudo foram também testados modelos que previam a existência destas espécies, mas em nenhum caso foi detectada a sua formação.

2 Citidina: protão e catiões metálicos

As determinações potenciométricas e as calibrações foram efectuadas exactamente do mesmo modo que as da glicilglicina exceptuando alguns ensaios pontuais em que se ajustou a força iónica a 0,6 M com $Ca(NO_3)_2$.



Citidina

As constantes de acidez da citidina foram determinadas por titulação de 25 cm^3 de HNO_3 0,1 m*M* (I = 0,1 *M* $NaClO_4$; 25°C) na presença de 1m*M* ou 2,5 m*M* de ligando com NaOH 0,03 *M*, sob atmosfera de azoto. Foram efectuados alguns ensaios a força iónica 0,6 *M* com KNO_3 e também com $Ca(NO_3)_2$. As constantes de estabilidade dos complexos binários foram determinadas por titulação de 25 cm^3 de HNO_3 (0,4 m*M* - 10 m*M*; I = 0,1 *M* $NaClO_4$; 25°C) na presença de $M(NO_3)_2$ ou de MCl_2 (0,6m*M* - 60 m*M*) e na presença de ligando (1 m*M* - 10 m*M*), com NaOH 0,03 *M*, sob atmosfera de azoto.

O cálculo das constantes de acidez e de estabilidade dos complexos binários formados fori efectuado com o programa SUPERQUAD.[89] Os resultados obtidos provêm de mais de quarenta titulações independentes, cada uma com mais de 50 pontos experimentais e para várias razões metal/ligando. Os equilíbrios de hidrólisedo catião Zn^{2+} e do catião Cd^{2+} e os

equilíbrios Zn^{2+}/Cl^- e Cd^{2+}/Cl^- em solução foram incluídos em todos os modelos testados. O pK_{ag} utilizado foi determinado neste trabalho e foi nestes casos de 13,75.

A auto-associação das purinas e pirimidinas está bem caracterizada e pode ocorrer pelo menos de duas formas distintas: interacções por ligações de hidrogénio e interacções de empilhamento.[215, 216] A auto-associação da citidina, por interacções de empilhamento, foi estudada por RMN em H_2O/D_2O[217] e em $(CH_3)_2SO$[218], tendo Scheller *et al*[219] calculado, também por RMN, uma constante de auto-associação para a citidina de $1,1 \pm 0,3$ *M*, o que permitiu concluir que esta ocorre em solução aquosa, mas em pequena extensão. Nas condições em que este trabalho foi efectuado (concentração de citidina da ordem dos 10^{-3} *M*) a auto-associação pode ser desprezada, pois para estas concentrações mais de 99% da citidina encontra-se sob a forma de monómero, pelo que este equilíbrio nunca foi incluído nos cálculos efectuados.

pK_a DA CITIDINA

A constante de acidez da citidina tem sido bastante estudada em vários solventes e por várias técnicas e é atribuída à protonação do N-3.[220] A citidina, na sua forma neutra, pode libertar um protão do resíduo ribose[221] mas esta reacção tem um pK_a de 12,5. Então, dadas as condições experimentais utilizadas neste trabalho só se considerou a existência de uma constante de acidez

$$HC \rightleftharpoons H^+ + C \qquad (8.4)$$

Os resultados experimentais obtidos encontram-se sumariados na Tabela 8.3, bem como os valores descritos na literatura para condições experimentais análogas. A constante de acidez da citidina mostra uma ligeira dependência da força iónica embora um pouco inferior à observada por Sigel *et al*[220], (0,08 unidades logarítmicas de 0,1 *M* a 0,5 *M*, com $NaClO_4$), mas a

Tabela 8.3 Constantes de acidez da citidina

I/ moldm^{-3}	pK_a[a]	pK_a[b]
0,1	4,07±0,01	4,11±0,02
0,6	4,12±0,03	4,24±0,02
0,6[c]	4,12±0,08	

[a] Resultados obtidos no presente trabalho

[b] Referência 209

[c] I = 0,6 *M* em $Ca(NO_3)_2$

utilização de diferentes electrólitos inertes não afecta o valor médio desta constante. Tal como para a glicilglicina as determinações efectuadas a diferentes forças iónicas foram sempre antecedidas por calibração ácido forte/base forte à mesma força iónica e com o mesmo electrólito inerte. De referir que os valores das constantes de acidez obtidos com $Ca(NO_3)_2$, como electrólito inerte, apresentaram uma dispersão superior à obtida pela utilização de KNO_3 à mesma força iónica, o que poderá estar associado às diferentes mobilidades iónicas destes catiões e portanto com os parâmetros de calibração do eléctrodo.

Constantes de Formação

Alguns estudos efectuados sobre a coordenação de catiões metálicos à citidina indicam que esta ocorre no azoto endocíclico N–3.[222, 223] Várias determinações de estruturas cristalinas de complexos de catião cobre(II) com a citidina mostram a existência de não só de uma ligação Cu^{2+}/N–3 mas também de uma ligação, embora muito mais fraca com o oxigénio O–2.[224] Contudo afirma-se que se esta interacção ocorre também em solução ela não contribui de uma maneira significativa para a formação do complexo.[224]

O modelo utilizado no cálculo das constantes de formação do catião zinco(II) e do catião cádmio(II) com a citidina pressupôs o equilíbrio descrito pela equação 8.4

$$M^{2+} + C \rightleftharpoons MC^{2+} \qquad \beta_{110} \qquad (8.5)$$

bem como a constante de acidez da citidina, anteriormente determinada, e os equilíbrios de hidrólise dos catiões. Os resultados obtidos (Tabela 8.4) mostram que não foi possível calcular a constante de complexação zinco/citidina com o programa SUPERQUAD, mas que o valor obtido para a constante cádmio/citidina está de acordo com resultados recentemente

Tabela 8.4. Constantes de formação do complexo de citidina com o catião zinco(II) e o catião cádmio(II)

M^{2+}	$\log \beta_{110}$		$\log \beta_{110}$ (eq4)	
	P.T.[a]	Literatura[110]	P.T.[a]	Literatura[220]
Zn^{2+}	-	-0,42±0,11	-	0,20±0,03
Cd^{2+}	1,15±0,03	-	1,09±0,20	0,91±0,07

descritos na literatura.[220] Verifica-se que a formação da espécie ocorre para valores de - log c_{H^+} entre 3 e 8 (para - log c_{H^+} > 8 começa a precipitação do hidróxido de cádmio) e para concentrações de cádmio muito elevadas forma-se numa extensão de aproximadamente 50% da concentração de citidina em solução (figura 8.3).

Sigel *et al*[220] afirmam que as constantes MC^{2+}, dada a sua ordem de grandeza são pouco precisas e de difícil quantificação, i.e., a diferença Δ(- log c_{H^+}) entre as curvas de titulação (zona de - log c_{H^+} entre 3 e 7) do catião metálico na presença e na ausência de citidina é muito pequena o que dificulta ou até impossibilita o cálculo destas constantes pela aplicação da metodologia de cálculo que normalmente utilizam.

O cálculo de β_{110} foi, então, efectuado com a expressão

$$\beta_{110} = (K'_a - K_a) / (K_a \ | M^{2+}|_t) \qquad (8.6)$$

onde K'_a é a constante de acidez aparente para a desprotonação da citidina na presença de largo excesso de catião metálico. K'_a é determinado a partir das diferenças entre duas curvas de titulação consecutivas obtidas para uma solução de ácido forte na presença e na ausência de citidina e catião metálico. O modelo de cálculo utilizado considera que em solução apenas

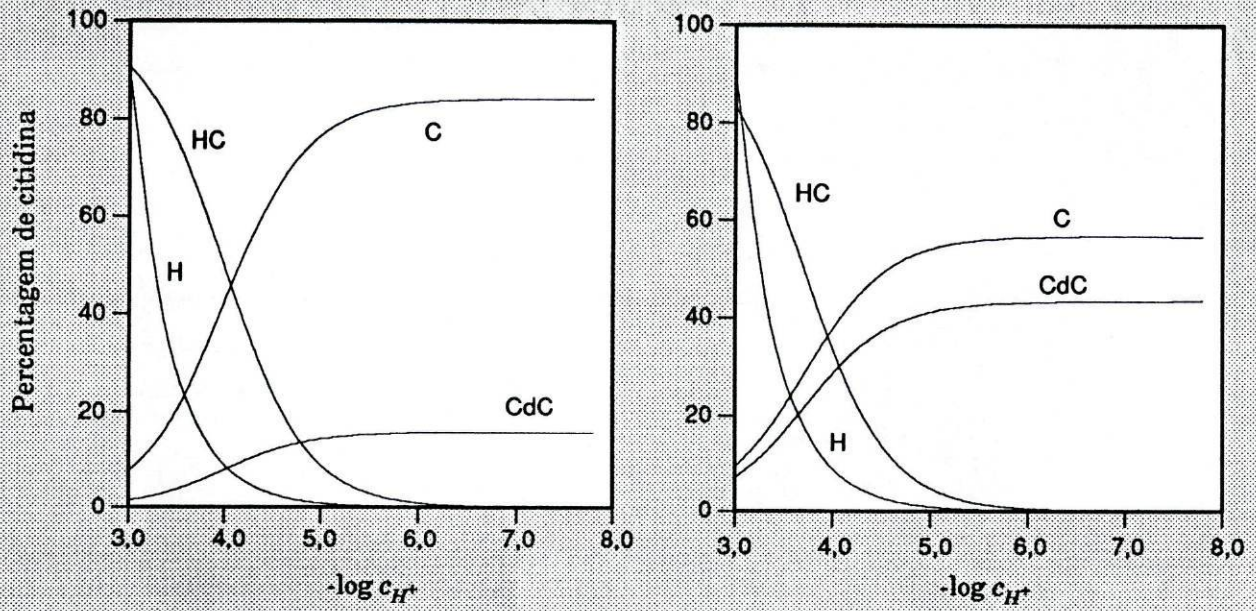


Figura 8.3 **Diagramas de distribuição para o sistema cádmio/citidina. A– $1x10^{-3}$ *M* de citidina e $1x10^{-3}$ *M* de Cd^{2+}; B—$1x10^{-3}$ *M* de citidina e $6x10^{-3}$ *M* de Cd^{2+}. Resultados obtidos a força iónica 0,1 *M* com $NaClO_4$ e a 25°C**

existe o equilíbrio de ácido/base da citidina e a autoprotólise da água.

Os resultados assim obtidos fazem com que Sigel *et al*[220] afirme que para certos catiões metálicos só com este procedimento é que é possível obter resultados precisos e de confiança, no entanto a sua utilização só é válida para elevadas razões metal/ligando o que implica a utilização de soluções com força iónica elevada (I > 0,5 *M*) e portanto sai fora do âmbito deste trabalho.

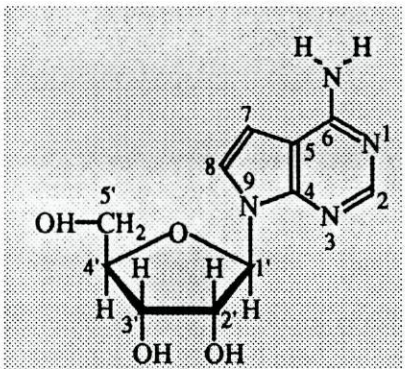
A aplicação desta equação aos resultados experimentais obtidos, neste trabalho, é possível para o sistema cádmio/citidina e fornece valores

concordantes com os obtidos com o programa SUPERQUAD mas com uma pior precisão (Tabela 8.4), o que pode advir de a razão máxima metal/ligando utilizada ter sido apenas de 60:1, isto é, 20 vezes inferior à utilizada por Sigel *et al.*[220]

LOCAIS DE COORDENAÇÃO

Os estudos potenciométricos de constantes de equilíbrio não permitem por si só, de uma maneira inequívoca, inferir locais de coordenação, mas verifica-se que, para ligandos relacionados estruturalmente, a utilização da relação linear entre log K_f *vs* pK_a, para cada ião metálico permite por vezes (*vide* Capítulo 4) obter correlações que fornecem alguma informação estrutural.

Sigel *et al*[220] comparou os valores obtidos para as constantes de formação da citidina, da piridina e da tubercidina, verificando que as constantes de formação de vários catiões metálicos com a citidina eram maiores do que as correspondentes constantes de formação com a tubercidina, apesar desta última ser uma base mais forte. Assim considerou que a maior estabilidade dos complexos de citidina com os vários catiões metálicos provinha da existência do grupo *o*-carbonilo da citidina. Comparando os valores obtidos para os sistemas catião metálico/citidina com as correlações lineares, entre log K_f *vs* pK_a, para os mesmos catiões metálicos com ligandos tipo piridina e com ligandos tipo *o*-amino-piridina Sigel *et al*[220, 225] verificou que dependendo do catião metálico a citidina terá um comportamento relacionado com (i) ligandos tipo piridina, (ii) ligandos tipo *o*-amino-piridina ou (iii) ligando com características próprias e por isso caracterizou-a como um ligando ambivalente. Esta ambivalência é atribuída a uma possível interacção dos catiões metálicos não só com o azoto endocíclico mas também com o oxigénio exocíclico, interacção esta que será verificada apenas para alguns catiões metálicos. Assim considera que no sistema cádmio(II)/citidina esta se comporta como um ligando tipo piridina devido



Tubercidina

ligando tipo *o*-amino-piridina

(pK_a= 5,21±0,03; 0,1*M* $NaClO_4$)

ao cancelamento do efeito estereoquímico do grupo *o*-amino pela interacção do catião cádmio(II) com o oxigénio exocíclico e que no sistema zinco(II)/citidina a citidina se comporta como um ligando com características próprias, com formação de constantes de estabilidade de ordem de grandeza intermédia entre os ligandos tipo piridina e tipo *o*-aminopiridina .

Uma análise detalhada dos valores obtidos por Sigel *et al*[220] para as constantes de formação da citidina e da turbicidina, todas obtidas pelo uso da equação 8.6, mostra que a incerteza aliada à determinação da maior parte destas constantes, não permite demonstrar, de uma maneira segura e inequívoca, a interacção de catiões metálicos com o oxigénio exocíclico. Por exemplo o valor da constante de estabilidade obtida para o sistema zinco/citidina advém de uma diferença de 0,02 unidades logarítmicas nos valores de K'_a e de K_a , diferença esta igual ao erro da constante de acidez da citidina calculada no mesmo trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho e, considerando que para a citidina a existência de um grupo na posição *orto* da piridina provoca um impedimento estereoquímico à coordenação dos metais, permitem apenas concluir que a diferença de comportamento entre o sistema zinco(II)/citidina e cádmio(II)/citidina deve advir da diferença na distância da ligação M^{2+}–N(3) que é sem dúvida superior para o catião cádmio (II) do que para o catião zinco (II).

Aplicação da equação(5) ao catião zinco(II) para força iónica 0,50 *M*

Usando o valor de β_{110} determinado por Siegel (0,20) virá:

$0{,}20 = (K'_a - 10^{-4{,}24}) / (0{,}1333 \times 10^{-4{,}24})$

donde $pK'_a = 4{,}22$

3 Complexos ternários metal/citidina/glicilglicina

As determinações potenciométricas foram efectuadas exactamente como descrito para os complexos binários e as calibrações do sistema também.

As constantes de estabilidade dos complexos ternários foram determinadas por titulação de 25,00 cm^3 de HNO_3 (0,4 m*M* - 10 m*M*; I = 0,1 *M* $NaClO_4$; 25°C) na presença de $M(NO_3)_2$ ou de MCl_2 (0,6m*M* - 60 m*M*), de

glicina (1 m*M* - 25 m*M*) e de citidina (1m*M* - 10 m*M*) com NaOH 0,03 *M*, sob atmosfera de azoto.

Foi também estudada uma possível interacção molecular entre a citidina e a glicilglicina por titulação de 25,00 cm^3 de HNO_3 (0,4 m*M* - 10 m*M*; I = 0,1 *M* $NaClO_4$; 25°C) na presença de glicina (1 m*M* - 25 m*M*) e de citidina (1m*M* - 10 m*M*) com NaOH 0,03 *M*, sob atmosfera de azoto, mas os resultados experimentais obtidos não permitiram detectar qualquer interacção.

As determinações dos valores das constantes de estabilidade foram efectuadas também com o programa SUPERQUAD.[89] Os resultados obtidos provêm de dados de cinquenta titulações independentes, com diferentes razões metal/citidina/glicilglicina, cada uma com mais de 40 pontos experimentais. Os modelos testados incluíram sempre as constantes de acidez dos ligandos, determinadas neste trabalho, as constantes de estabilidade dos complexos binários, também determinadas neste trabalho, os equilíbrios de hidrólise[208] do catião Zn^{2+} e do catião Cd^{2+} e os equilíbrios Zn^{2+}/Cl^- e Cd^{2+}/Cl^- em solução[209]. O pK_{ag} utilizado foi determinado neste trabalho e foi nestes casos de 13,75.

COMPLEXOS MISTOS

O modelo utilizado no cálculo das constantes de formação do catião zinco(II) e do catião cádmio(II) com a citidina e a glicilglicina assumiu os equilíbrios:

$$M^{2+} + HL + C \rightleftharpoons MHLC^{2+} \qquad \beta_{1110} \qquad (8.7)$$

$$M^{2+} + HL + C \rightleftharpoons MLC^{2+} + H^+ \qquad \beta_{111-1} \qquad (8.8)$$

bem como as constantes de acidez e as constantes de formação determinadas neste trabalho e os equilíbrios de hidrólise dos catiões e as constantes de complexação dos respectivos catiões com o anião cloreto. A espécie

MHLC corresponde à formação do complexo ternário catião metálico/citidina/glicilglicina com esta última na forma de ião dipolar e MLC à formação do complexo ternário com a glicilglicina na sua forma completamente desprotonada. No entanto, em nenhuma determinação foi possível detectar a formação da espécie $MHLC^{2+}$.

Catião Zinco(II)

Os resultados experimentais obtidos para o sistema zinco(II)/citidina/glicilglicina permitem concluir que, potenciometricamente e em meio aquoso, não se detecta formação do complexo ternário. Contudo existem resultados, obtidos por RMN[110] que apontam para a formação deste complexo embora com uma constante muito pequena. A simulação, para as condições experimentais utilizadas, da curva de titulação do sistema Zn(II)/glicilglicina/citidina considerando a existência do complexo ternário com o valor de constante determinado por RMN, mostra que esta é completamente sobreponível com a curva experimental obtida neste trabalho logo conclui-se que a potenciometria com eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio não permite detectar a formação deste complexo ternário.

Catião Cádmio(II)

Os resultados experimentais obtidos para o sistema cádmio(II)/citidina/glicilglicina permitem calcular a constante $\log \beta_{111\text{-}1}$ (tabela 8.5) numa zona de $-\log c_{H^+}$ entre 5,5 e 7,5 e verifica-se que a sua concentração é inferior à de qualquer complexo binário (Figura 8.4). Só se conseguiu detectar a formação desta espécie para concentrações superiores a 10^{-2} *M*, e a precisão aliada a esta constante é pequena pois foi determinada com base em todas as condições experimentais em que foi possível a sua detecção. Esta constante de equilíbrio global está associada ao equilíbrio definido por

$$Cd^{2+} + L + C \rightleftharpoons MCL \qquad K_{m/f} \qquad (8.9)$$

em que $\log K_{m/f} = \log \beta_{111\text{-}1} - \log K_{a2}$.

A existência deste complexo ternário deve pois ser quantificada

Tabela 8.5 Constantes de formação do complexo ternário catião cádmio(II)/citidina/glicilglicina

M^{2+}	$\log \beta_{111\text{-}1}$	$K^{CdL}{}_{CdLC}$	$\log K_{m/f}$	$\Delta \log K$
Cd^{2+}	-3,74±0,20	1,22±0,25	4,24±0,20	0,07±0,28

em relação aos complexos binários correspondentes (Capítulo 4) e para tal define-se o equilíbrio

$$CdL + C \rightleftharpoons CdLC \qquad K^{CdL}_{CdLC} \qquad (8.10)$$

cuja constante de equilíbrio (calculada de $\log K_{m/f}$ - $\log K_f^N$) se encontra na Tabela 8.5.

COOPERATIVIDADE

Como a estabilidade de um complexo ternário formado a partir das espécies binárias 1:1 correspondentes pode ser quantificada determinando a posição do equilíbrio (Capítulo V)

$$CdL + CdC \rightleftharpoons CdLC + Cd^{2+} \qquad (8.11)$$

cuja constante é dada por

$$\Delta \log K = \log K^{CdL}_{CdLC} - \log \beta_{110} \qquad (8.12)$$

onde $\log K^{CdL}_{CdLC}$ é a constante acima definida. Calculou-se o valor experimental associado a $\Delta \log K$ (Tabela 8.5) e o erro a ele associado pelas equações de propagação de erro.

O valor estatístico esperado para $\Delta \log K$, depende do número de coordenação do catião metálico, da denticidade dos ligandos e obviamente da geometria do complexo formado (Capítulo 4). Considerando um núme-

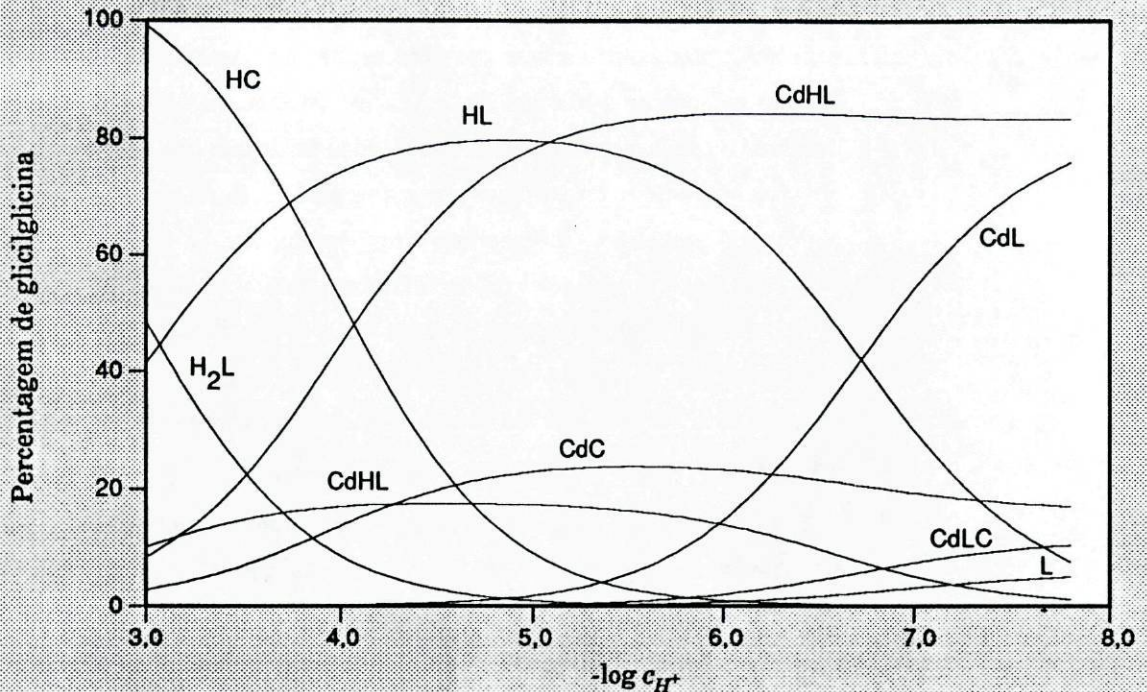


Figura 8.4 **Diagrama de distribuição para o sistema cádmio/citidina/glicilglicina: $1x10^{-3}$ *M* de citidina, $1x10^{-3}$ *M* de glicilglicina e $2,5x10^{-3}$ *M* de Cd^{2+} a força iónica 0,1 *M* com $NaClO_4$ e a 25°C**

Valor estatístico de ΔlogK considerando Cd^{2+} com número de coordenação 6 e geometria octaédrica

Ligandos[a]		proporção	ΔlogK
A	B		
bi	bi	5/12	-0,38
bi	mo	4/12	-0,48
mo	mo	5/6	-0,08

[a] bi– bidentado; mo– monodentado

ro de coordenação de seis para o catião cádmio, uma geometria octaédrica, tal como se verifica para muitos complexos com nucleosídeos e/ou aminoácidos,[226] e que ambos os ligandos podem ter características ambidentadas na coordenação a catiões metálicos, os vários valores estatísticos que Δlog*K* pode assumir encontram-se em anexo. Como o valor experimental obtido é de 0,07±0,21 (Tabela 8.5) pode-se apenas afirmar que existirá uma ligeira cooperatividade na formação deste complexo misto se se considerar que a glicilglicina se comporta como um ligando bidentado.

4 Conclusões

OS RESULTADOS OBTIDOS TANTO NO ESTUDO DOS SISTEMAS CATIÃO METÁLICO/GLICILglicina como no estudo dos sistemas catião metálico/citidina são bastante precisos e concordantes com os resultados já existentes na literatura, tanto obtidos potenciometricamente como por RMN. Pode-se pois afirmar que o sistema de titulação automático apresentado neste trabalho e o método utilizado para a sua calibração fornecem dados potenciométricos válidos que permitem obter valores de constantes de equilíbrio, para soluções com concentrações da ordem dos $10^{-3}M$, idênticos, a menos do erro experimental, aos obtidos para os mesmos sistemas com outros sistemas potenciométricos e/ou com outros métodos experimentais.

Não foi possível determinar potenciometricamente a existência de uma interacção entre a citidina e o catião zinco(II), mas valores obtidos por RMN[110] mostram que esta constante de formação é muito baixa e como tal não pode ser obtida potenciometricamente. Não foi também possível a determinação da constante de formação do complexo misto catião zinco(II)/glicilglicina/citidina, mas tal como no caso anterior valores obtidos por RMN mostram que esta constante de formação é baixa e potenciometricamente o valor da constante de formação da espécie ZnL^+ é o mesmo na presença ou na ausência de citidina, desde que se considere, como é óbvio, o valor da constante de acidez desta espécie. Os resultados obtidos neste trabalho não permitem pois confirmar a hipótese de Li *et al* [198] sobre a possível formação de um complexo ternário catião zinco(II)/glicilglicina/citidina.

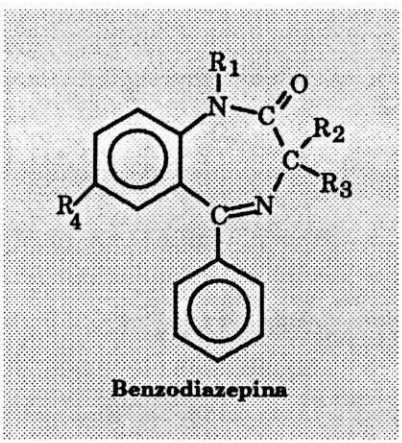
As constantes de estabilidade obtidas para o catião cádmio(II) mostram a sua possível interacção com os ligandos biológicos aqui estudados e que o seu comportamento é similar ao do catião zinco(II). A comparação dos valores obtidos neste trabalho e de valores já descritos na literatu-

ra[3, 30] permite ainda afirmar que a interacção do catião cádmio com os ligandos citidina e glicilglicina é na maioria dos casos superior à interacção do catião zinco(II) com estes mesmos ligandos. Este facto permite explicar a toxicidade do catião cádmio(II) em determinados processos biológicos.

Capítulo

9

Constantes de Acidez de Benzodiazepinas



Benzodiazepina

A EFICÁCIA DE QUALQUER SUBSTÂNCIA COM ACÇÃO TERAPÊUTICA (DROGA, FÁRMACO) depende não só da sua via de administração mas também do seu grau de ionização e este depende como é óbvio da(s) constante(s) de acidez dessa substância. O conhecimento dessas constantes permitirá avaliar a extensão com que a droga é absorvida pelo organismo, fornecer informação sobre o modo como atravessa as membranas biológicas e condicionar não só o seu modo de excrecção como o dos seus metabolitos. As 1,4-benzodiazepinas, substâncias terapêuticas que actuam a nível do sistema nervoso central, têm uma solubilidade, em água, muito reduzida facto que tem dificultado a determinação precisa e exacta das suas constantes de acidez em solução aquosa, sendo a maioria dos valores descritos na literatura determinados em solventes mistos.[227-229] A maioria destes estudos, contudo, não fornece informação suficiente sobre as condições experimentais em que as referidas constantes foram determinadas: normalmente não indicam a temperatura usada e não controlam a força iónica.

Neste capítulo é descrito o estudo efectuado para a determinação das constantes de acidez do *diazepam*, *medazepam* e *clorodiazepóxido* se-

gundo as normas da "Recommendations for Measurements and Presentation of Biochemical Equilibrium Data",[178] por titulação potenciométrica em água, por titulação espectrofotométrica, também em água, e por titulação potenciométrica em água/metanol. Dada a exactidão dos resultados obtidos por estas três metodologias, fez-se o estudo de uma outra benzodiazepina, *prazepam*, apenas solúvel em misturas de água/metanol (percentagem de metanol superior a 20%) por titulação potenciométrica em água/metanol e por titulação espectrofotométrica, em água tendo-se obtido valores idênticos usando as duas metodologias.

1 Execução experimental e métodos de cálculo

COMO AS CONSTANTES DE ACIDEZ FORAM DETERMINADAS POR TRÊS METODOLOGIAS diferentes, começa-se por descrever a execução experimental e os métodos de cálculos utilizados em cada uma delas. Posteriormente será feita uma análise de todos os valores obtidos e que serão, também, comparados com valores já existentes na literatura.

1.1 Determinação potenciométrica em água

OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS FORAM OBTIDOS POR TITULAÇÃO DE 20,00 cm^3 DE HNO_3 0,1 m*M* na presença das benzodiazepinas ($3{,}0\times10^{-4}$ a $1{,}0\times10^{-3}$ *M*) com NaOH (≈ 0,02 *M*; I = 0,1 *M* NaCl) sob atmosfera de azoto. A calibração do sistema foi sempre efectuada antes e depois de cada uma das titulações das soluções amostra pelo método descrito no Capítulo 7 e o pK_{ag} calculado foi de 13,80. O cálculo das constantes de acidez foi efectuado com os programas SUPERQUAD[89] e BEST[87], utilizando valores de pelo menos dez titulações independentes, cada uma com mais de 30 pontos experimentais.

Estudos efectuados por RMN em $CDCl_3$[230] e por espectrofotometria de ultravioleta/visível[227], em solventes mistos, indicam a existência de apenas uma constante de acidez para estas benzodiazepinas, em que a protonação do *diazepam* e do *medazepam* ocorre no azoto imínico N–4 do anel benzodiazepínico, e a protonação do *clorodiazepóxido* no átomo de oxigénio ligado também ao azoto imínico N–4, ou seja ao grupo N-óxido.

O modelo utilizado para a determinação das constantes de acidez do *diazepam* e do *medazepam* (pK_{a1}) assumiu apenas o equilíbrio traduzido pela equação

$$BZP + H^+ \rightleftharpoons HBZP^+ \qquad (9.1)$$

pois o azoto N–1 no *diazepam* corresponde a uma função amida que em principio não tem propriedades ácido/base em solução aquosa e o azoto N–1 do *medazepam* é uma função amina terciária que terá uma constante de acidez muito baixa não sendo possível devido à sua reduzida solubilidade em solução aquosa alcalina obter valores para esta constante, pelo método utilizado. Para o *clorodiazepóxido* começou por se assumir um modelo apenas com o equilíbrio descrito pela equação 9.1 mas verificou-se que dada a solubilidade desta substância na zona alcalina foi possível obter curvas de titulação até - log $c_{H^+} \approx 11$ e portanto adoptou-se um novo modelo com uma constante de acidez que poderia estar associada à protonação do grupo $-NHCH_3$ ligado ao C–2.

As constantes de acidez do *diazepam*, *medazepam* e *clorodiazepóxido* (Tabela 9.1) foram obtidas em condições experimentais bem definidas de modo a que não ocorresse precipitação, esta facilmente identificada na execução experimental (ver quadro anexo), usando concentrações sempre inferiores às suas solubilidades,[230] e de modo a que não ocorresse hidrólise. As zonas de - log c_{H^+} utilizadas foram 2,9 – 3,9 para o *diazepam*, 4,0 – 6,3 para o *medazepam* e 3,1 – 11,0 para o *clorodiazepóxido* e os valores de

Tabela 9.1 *pKa das benzodiazepinas determinados por métodos potenciométricos e

Benzodiazepinas	Presente trabalho			Valores da Literatura
	Potenciometria		Espectrofotometria (água)	
	Água	Água-metanol		
Diazepam	3,58 ± 0,03	3,54 ± 0,05	3,57 ± 0,06	3,3
				3,17
				3,3
				3,35
				3,38
Medazepam	6,17 ± 0,03	6,19 ± 0,04	6,21 ± 0,03	6,17
				6,19
				6,25
				6,20
				6,19
				6,16
Clorodiazepóxido	4,79 ± 0,03	4,82 ± 0,03	4,82 ± 0,.03	4,60
				4,88
				4,82
Prazepam	—	3,21 ± 0,05	3,22 ± 0,04	3,04
				2,94

pK_a obtidos foram sempre constantes e independentes da concentração de titulado.

Para o clorodiazepóxido foi sempre obtida uma segunda constante de acidez associada ao equilíbrio traduzido pela equação

$$\text{ClDZP} \rightleftharpoons \text{ClDZP} + \text{H}^+ \qquad (9.2)$$

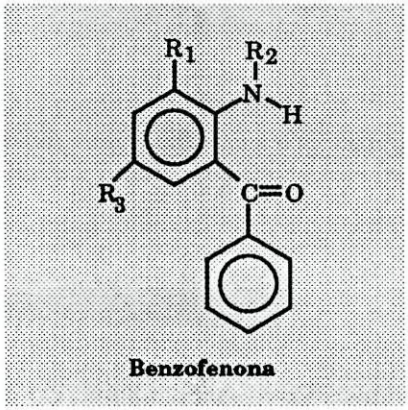
espectrofotométricos em solução aquosa e em água/metanol.

Benzodiazepinas	Método	Meio	Temperatura (°C)	Referência
Diazepam	Espectrofotometria	Água/metanol (95+5, v/v)	20	227
	Espectrofotometria	Água/etanol (98+2, v/v)	25	231
	Espectrofotometria	Água/etanol (90+10, v/v)	—	232
	Potenciometria	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
	Solubilidade	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
Medazepam	Espectrofotometria	—	37	288
	Solubilidade	—	37	288
	Espectrofotometria	Água/etanol (90+10, v/v)	—	232
	Espectrofotometria	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
	Potenciometria	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
	Solubilidade	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
Clorodiazepóxido	Espectrofotometria	Água/metanol (95+5, v/v)	20	231
	Potenciometria	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
	Solubilidade	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
Prazepam	Espectrofotometria	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230
	Solubilidade	Água (0,10 *M* NaCl)	25	230

cujo valor foi sempre concordante e independente da concentração de *clorodiazepóxido* utilizada (pK_{a2} = 10,24±0,05). A existência deste equilíbrio parece indicar que esta espécie é um ácido diprótico o que implica que em soluções ácidas se encontre sob a forma de H_2ClDZP^{2+}, em soluções neutras sob a forma de $HClDZP^{+}$ e em soluções alcalinas sosb a forma de ClDZP.

HIDRÓLISE DAS BENZODIAZEPINAS

As 1,4 - benzodiazepinas em solução aquosa têm tendência a decompor-se, especialmente em soluções muito ácidas ou muito básicas.[233,234] Neste trabalho a hidrólise ácida é particularmente importante pois tanto o *clorodiazepóxido* como o *diazepam* (embora o mecanismo de hidrólise não seja totalmente conhecido) têm uma certa tendência a hidrolisar, neste meio, dando origem às correspondentes benzofenonas.



Benzofenona

Neste trabalho a possível ocorrência de hidrólise foi verificada pela constância nos valores de pK_a obtidos, para várias determinações independentes efectuadas, com a mesma solução amostra durante 48 horas e por análise dos espectros de RMN das mesmas soluções amostra no mesmo período de tempo. Verificou - se que para o *diazepam* após 36 horas da preparação da amostra, o valor do pK_a (aparente) aumentava, ΔpK_a = - 0,16 (sendo ΔpK_a a diferença entre o pK_a do diazepam em água antes e depois da hidrólise) e que os espectro de RMN exibiam uma banda adicional perto da banda do grupo metilo após estas mesmas 36 horas. Para o *clorodiazepóxido* e para o *medazepam* não foi verificada nenhuma alteração nos valores de pK_a nem nos espectros de RMN durante este mesmo período de tempo.

1.2 Determinação espectrofotométrica em água.

DE ACORDO COM A LITERATURA[233], ESTAS SUBSTÂNCIAS TÊM ABSORPTIVIDADES MOLARES superiores a 10^4 $mol^{-1}cm^{-1}$ o que implicou que as soluções utilizadas tivessem sempre concentrações da ordem dos $5x10^{-5}$ a $1x10^{-4}$ *M*, por forma a não exceder as 2 unidades de absorvância (especificada pela instrumentação utilizada). Como o *prazepam* é solúvel em água para concentrações desta ordem de grandeza fez-se também o estudo da sua constante de acidez em solução aquosa.

Tabela 9.2 Valores de λ_{max} (nm) e das absortividades molares para as bandas de absorção de espectros típicos de benzodiazepinas

Benzodiazepina	HBZP⁺		BZP		HBZP⁺		BZP	
	Presente Trabalho				Literatura[a]			
	λ_{max}	ε_{BH^+} (x10⁴)	λ_{max}	ε_B (x10⁴)	λ_{max}	ε_{BH^+} (x10⁴)	λ_{max}	ε_B (x10⁴)
Diazepam	241	2,3	229	3,4	241	2,8	231	3,3
	285	1,1	250(s)	1,6	286	1,3	253(s)	1,7
	360	0,3	315	0,2	360	0,4	310	0,2
Medazepam	254	2,2	230	2,1	253	2,4	230	2,2
	288(s)	1,2	333	0,1	280	1,4	330	0,1
	455	0,4			450	0,4		
Clorodiazepóxido	245	3,1	262	3,2	245	2,6	260	2,5
	310	0,9	355	0,3	310	0,6		

[a] 228,229

Espectros de UV/VIS

Os espectros de ultravioleta/visível obtidos para as benzodiazepinas estudadas encontram-se na Figura 9.1 e mostram o tipo de espectro que se obtem, para cada uma das benzodiazepinas estudadas, quando se varia - log c_{H^+}. Na Tabela 9.2 apresentam-se os valores dos comprimentos de onda máximos (λ_{max}) e das absorptividades molares, ε_{BH^+} absorptividade molar da espécie protonada e ε_B absortividade molar da espécie neutra (valores obtidos neste trabalho e da literatura), para as benzodiazepinas que absorvem nas zonas de - log c_{H^+} estudadas. Verificou-se que os valores das absorptividades molares calculados pelo programa SQUAD ou calculados directamente a partir dos espectros eram concordantes a menos do

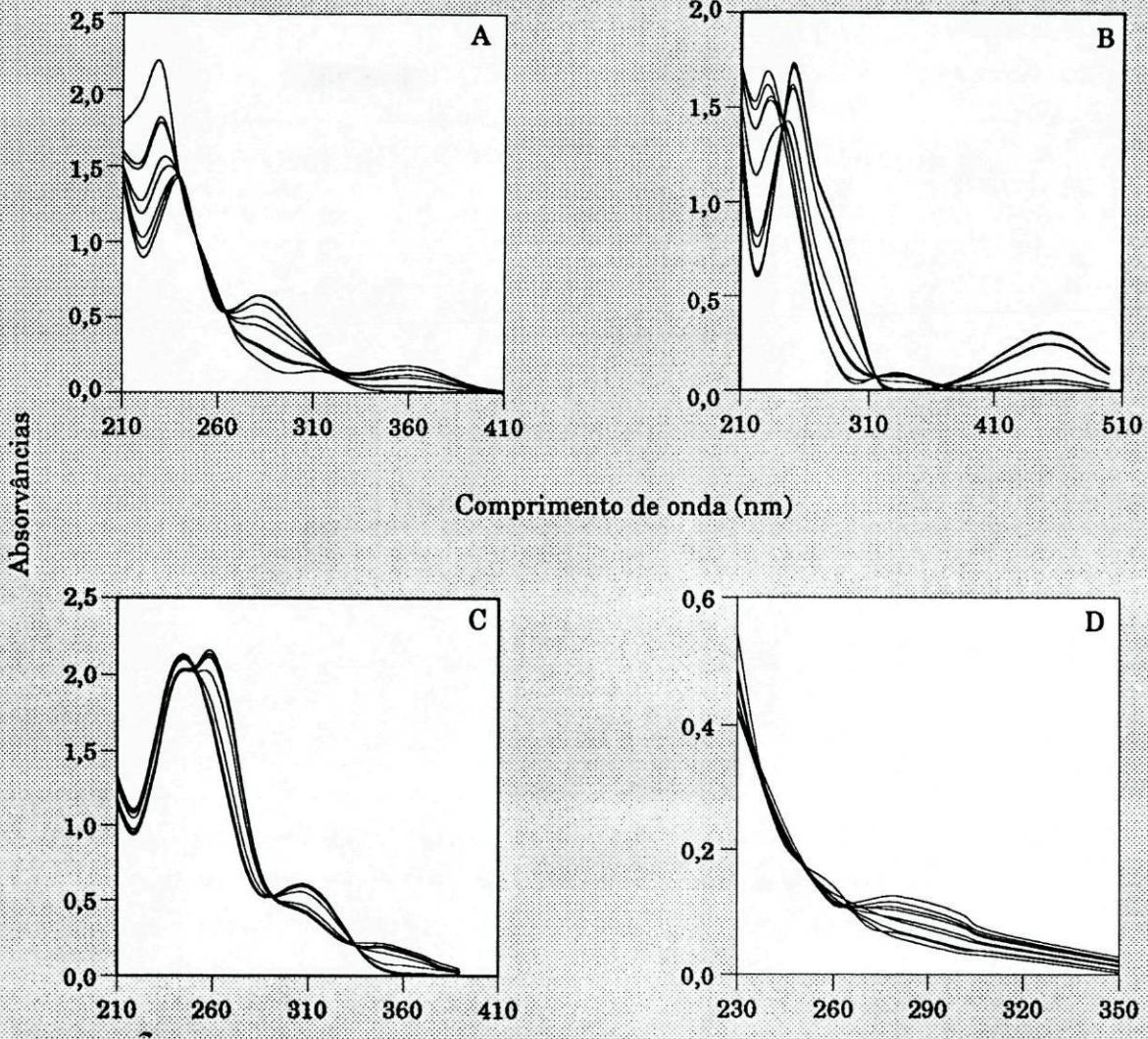
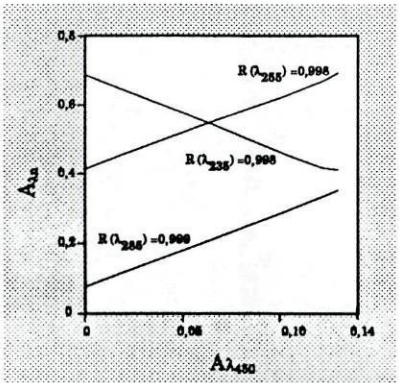


Figura 9.1Espectros típicos de *diazepam* (A), *medazepam* (B), *clorodiazepóxido* (C) e *prazepam* (D).A: (a) - log c_{H^+} > 5,0 e (b) - log c_{H^+} < 2,8; B: (a) - log c_{H^+} > 8,0 e (b) - log c_{H^+} < 3,5;C: (a) - log c_{H^+} > 7,0 e (b) - log c_{H^+} < 3,0; D: (a) - log c_{H^+} > 5,0 e (b) - log c_{H^+} < 2,3

erro experimental, como era de esperar, e que os valores descritos na literatura, embora da mesma ordem de grandeza não eram coincidentes. Estes últimos foram no entanto calculados em soluções hidrometanólicas o que explica, em parte, as diferenças obtidas.

Valores publicados[227,232] mostram que para o *medazepam* as absorptividades molares em etanol são mais altas do que em água e que há um deslocamento ligeiro nos máximos das bandas (hipsocrómico) e que para o *diazepam* e para *clorodiazepóxido* as absorptividades molares são mais baixas em etanol (principalmente para este último), praticamente sem deslocamento nos máximos das bandas. Estes dados justificam perfeitamente os valores obtidos neste trabalho para o *clorodiaxepóxido* e para o *medazepam*, mas não para o *diazepam*. Para este último as absortividades molares obtidas neste trabalho em solução aquosa são inferiores às descritas para soluções hidroalcoólicas.[227] Um aumento das absorvâncias nos λ_{max} da espécie protonada pode estar associado à presença de produtos de hidrólise (ver abaixo), isto é, a existência de uma certa percentagem de benzofenona fará, sem dúvida, aumentar as absortividades molares associadas à espécie protonada pois as absorptividades molares das benzofenonas podem ser 20% superiores às do *diazepam*[233,234] e dadas as condições experimentais descritas[233,230,231] para os estudos efectuados em soluções hidroalcoólicas é muito possível a existência de produtos de hidrólise.



Representação gráfica da relação linear obtida entre as absorvâncias do *medazepam* a vários comprimentos de onda

Determinação de pK_a

A lei de Beer-Lambert foi verificada para as condições experimentais utilizadas e o modelo assumido, uma constante acidez, foi escolhido por métodos gráficos.[91,93] Verifica-se a ocorrência de uma relação linear entre as absorvâncias a dois comprimentos de onda diferentes para toda a gama de comprimentos de onda utilizados (ver em anexo). As curvas de titula-

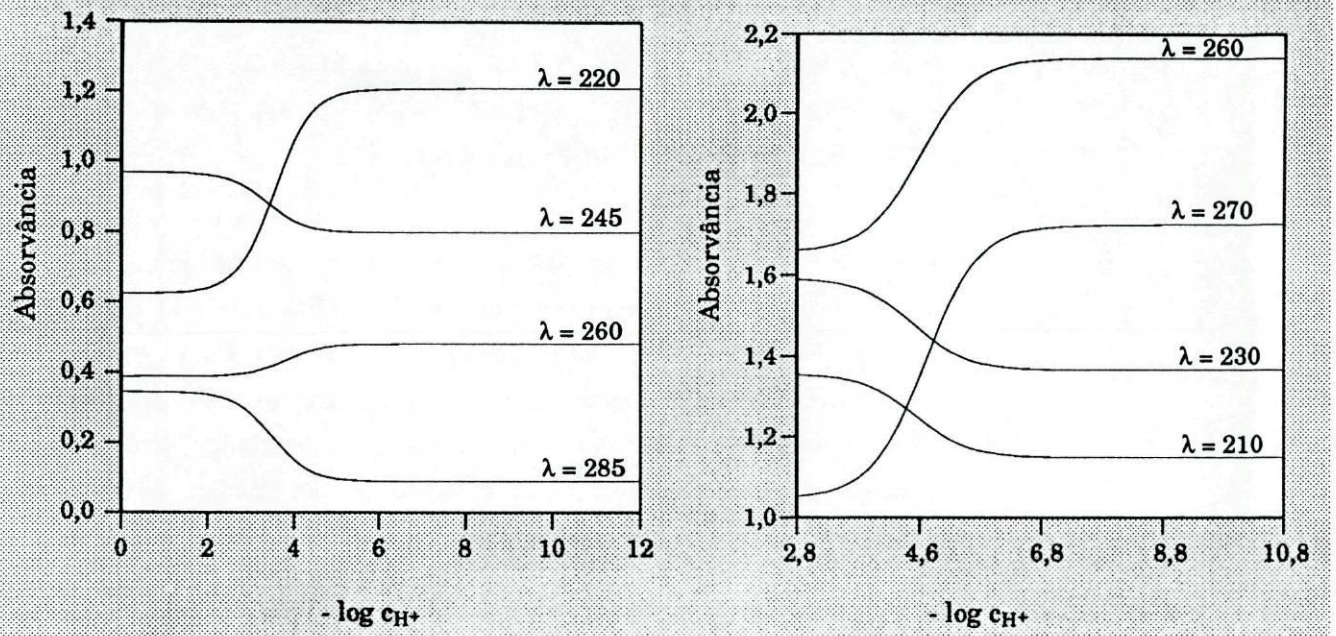


Figura 9.2 **Representação gráfica de $A_\lambda = f(-\log c_{H^+})$ para o *diazepam* (A) e para o *cloro-diazepóxido* (B), mostrando uma inflexão perto do valor obtido para os pK_a, para vários comprimentos de onda.**

ção de $A_\lambda = f(-\log c_{H^+})$ permitiram verificar a existência de uma inflecção perto do valor obtido para os pk_a das várias benzodiazepinas (Figura 9.2), embora as curvas obtidas para comprimentos de onda afastados dos λ_{max} das espécies mostrem uma menor inflexão.

Transformações lineares das várias funções $A_\lambda = f(-\log c_{H^+})$, para ácidos monopróticos permitem obter valores para as suas constantes de acidez e das várias transformações que se encontram descritas na literatura[91] foram escolhidas três para analisar os dados obtidos neste trabalho:

$$\log [(A_\lambda - A_{\lambda_{BH^+}}) / (A_\lambda - A_{\lambda_B})] = -\log c_{H^+} - pK_a \qquad (9.3)$$

$$(A_\lambda - A_{\lambda_B}) \cdot 10^{-\log c_{H^+}} = -(1/K_a) A_\lambda + (1/K_a) A_{\lambda_{BH^+}} \quad (9.4)$$

$$(A_\lambda - A_{\lambda_{BH^+}}) \cdot 10^{\log c_{H^+}} = -K_a A_\lambda + K_a A_{\lambda_B} \quad (9.5)$$

onde A_{λ_B} é a absorvância da espécie neutra B ao comprimento de onda λ e $A_{\lambda_{BH^+}}$ é a absorvância da espécie ionizada BH^+ ao comprimento de onda λ. A equação 9.3 necessita dos valores limites das absorvâncias da espécie ionizada e da espécie neutra enquanto que para as equações 9.4 e 9.5 só é necessário o conhecimento de um dos valores limites das absorvâncias, isto é ou A_{λ_B} ou $A_{\lambda_{BH^+}}$, respectivamente.

Os dados adquiridos para quatro titulações independentes, cada uma com pelo menos dez pontos, e a quatro comprimentos de onda diferentes foram tratados, com base nestas três equações, por regressão linear com o programa comercial KaleidaGraph 2.02. Estes mesmos dados foram ainda tratados com o programa SQUAD.

Os resultados obtidos com a equação 9.3 foram bastante imprecisos e não permitiram obter valores de confiança para as constantes de acidez de nenhuma das benzodiazepinas estudadas. No entanto os resultados obtidos com as equações 9.4 e 9.5 foram bastante precisos e da ordem de grandeza dos obtidos por potenciometria para as três benzodiazepinas já estudadas em solução aquosa. A utilização da equação 9.4, que não necessita do valor experimental de $A_{\lambda_{BH^+}}$, permitiu a determinação das constantes de acidez sem necessitar da utilização de soluções com $-\log c_{H^+} < 2{,}5$ o que era vantajoso no caso de se verificar hidrólise das benzodiazepinas a estas concentrações de catião hidrogénio. Na maioria das determinações experimentais efectuadas, foi possível verificar uma boa concordância entre os valores das absorvâncias limites determinadas experimentalmente e as obtidas tanto pela equação 9.4 como pela equação 9.5. Na Tabela 9.3 mostram-se os resultados obtidos para o *diazepam*, pois o erro inerente às determinações efectuadas com a equação 9.4 poderia ser grande

Tabela 9.3 pK_a **obtidos com a equação 9.4 para o *diazepam* e com a equação 9.5 para o *clorodiaxepóxido***

Diazepam

λ_{max}	$pK_{a(eq9.4)}$	$A_{\lambda_{BH^+}}$	$A_{\lambda_{BH^+(exp)}}$
220	3,58	0,064	0,064
255	3,57	0,460	0,465
300	3,53	0,128	0,130

Clorodiazepóxido

λ_{max}	$pK_{a(eq9.5)}$	A_{λ_B}	$A_{\lambda_{B(exp)}}$
260	4,81	0,812	0,814
300	4,82	0,381	0,381
350	4,82	0,160	0,159

devido ao aparecimento de produtos de hidrólise, e para o *clorodiazepóxido*, pois os valores obtidos pela equação 9.5 poderiam vir afectados de erro pela existência da espécie aliada a um segundo equilíbrio. Os valores obtidos com o programa SQUAD são iguais, a menos do erro experimental, aos valores obtidos com estas duas últimas equações pelo que na Tabela 9.1 são apenas apresentados os valores médios obtidos pelos dois métodos de cálculo.

Como já foi referido, secção 9.1.1, tanto o *clorodiazepóxido* como o *diazepam* têm tendência a sofrer hidrólise[235,2367]e o *prazepam* também.[237,238] O mecanismo de hidrólise destas benzodiazepinas não é, ainda, totalmente conhecido mas há vários estudos efectuados por espectrofotometria de ultravioleta/visível[233] que referem que as benzofenonas associ-

adas à hidrólise do *diazepam* e do *clorodiazepóxido* absorvem em soluções ácidas com absortividades molares 20% superiores às dos compostos que lhe dão origem. Lafargue *et.al239* verificaram que em soluções 0,2 *M* de HCl a benzofenona associada ao *diazepam* (2-metilamino-5-clorobenzofenona) absorve a 237 nm e que a benzofenona associada ao *clorodiazepóxido* (2-amino-5-clorobenzofenona) absorve a 236 e 213 nm e Clifford *et.al*[233], referem que estudos efectuados em soluções 4 *M* HCl, apontam valores de λ_{max} de 214 e 255 nm para o produto de hidrólise do *clorodiazepóxido* e de 214 e 248 nm para o do *diazepam*. Um *Handbook* mais recente[2375], onde são apresentados os espectros destas duas benzodiazepinas, do *prazepam* e das correspondentes benzofenonas para soluções 0,1 *M* HCl mostra que existe uma banda pouco intensa para a benzofenona associada ao *diazepam* a 270 nm, uma banda um pouco mais intensa para a benzofenona associada ao *clorodiazepóxido* a 260 nm e que a benzofenona associada ao *prazepam* não apresenta espectro. Como se pode ver pela Figura 9.1, em nenhum dos espectros é detectada qualquer destas bandas e para o espectro do *diazepam* a 248 nm obtem-se um ponto isosbéstico que seria facilmente alterado se existisse algum produto de hidrólise, o que aponta para a não existência de hidrólise nas condições experimentais utilizadas.

Como os resultados descritos na literatura sobre os produtos de hidrólise das benzodiazepinas não são completamente concordantes a possibilidade de ocorrência de hidrólise foi verificada, neste trabalho, controlando a absorvância das soluções a vários comprimentos de onda, durante um período de 48 horas. Para o *diazepam* e o *prazepam*, as benzodiaze-pinas mais ácidas, verificou-se uma alteração nos valores da absorvância das soluções após um período de 24 horas e o valor do pK_a, calculado com a equação 9.5, diminuía (ΔpK =+0,12). Para o *medazepam* e o *clorodiazepóxido* não se verificaram alterações durante o período de tempo mencionado.

Tabela 9.4 **$^{a}pK_a$ de benzodiazepinas em meios hidrometanólicos com diferentes composições**

% CH_3OH	$^{a}pK_a$ das benzodiazepinas			
	Diazepam	*Medazepam*	*Clorodiazepóxido*	*Prazepam*
0[a]	*3,54 ± 0,05*	*6,19 ± 0,04*	*4,82 ± 0,03*	*3,21 ± 0,05*
10	3,35 ± 0,05	6,09 ± 0,04	4,68 ± 0,03	—
20	3,22 ± 0,03	6,00 ± 0,03	4,59 ± 0,03	2,90 ± 0,02
30	3,05 ± 0,02	5,89 ± 0,04	4,46 ± 0,02	2,78 ± 0,02
40	2,87 ± 0,04	5,80 ± 0,04	4,32 ± 0,04	2,62 ± 0,05
50	2,71 ± 0,05	5,69 ± 0,04	4,19 ± 0,05	2,45 ± 0,05

[a] Valores obtidos por extrapolação

Os resultados obtidos para o *clorodiazepóxido* apontam apenas para a existência de uma constante de acidez associada ao equilíbrio definido pela equação 9.1. Em toda a gama de -log c_{H^+} utilizada só se verifica a existência de uma inflecção e mesmo ensaios efectuados apenas na zona alcalina não permitiram confirmar a existência de uma segunda espécie.

1.3 Determinação potenciométrica em água/metanol

As condições experimentais foram idênticas às utilizadas para soluções aquosas. A calibração do sistema foi sempre efectuada antes e depois de cada uma das titulações das soluções amostra pelo método descrito no Capítulo 7.3 e os valores de pK_{SH} utilizados foram os apresentados na Tabela 7.3. O cálculo das constantes de acidez , às várias percentagens de água/metanol utilizadas, foi efectuado com os programas SUPERQUAD e BEST, utilizando valores de pelo menos dez titulações independentes, cada

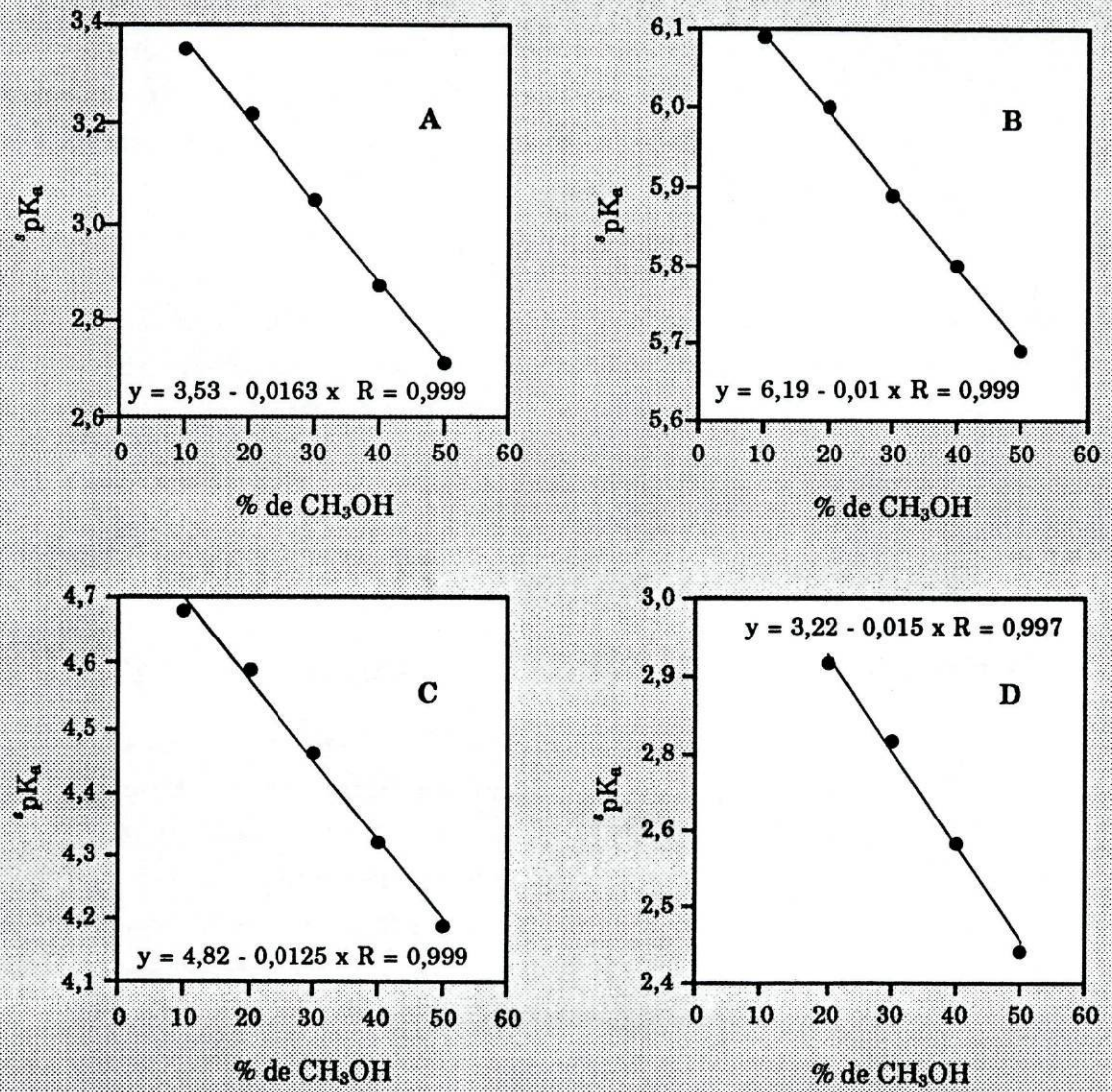


Figura 9.3 Representação gráfica da relação linear existente entre os $'pK_a$ das benzodiazepinas e a quantidade de metanol no solvente. A-*diazepam*; B-*medazepam*; C-*clorodiazepóxido*; D-*prazepam*.

uma com mais de 30 pontos experimentais e os modelos utilizados foram iguais aos das soluções aquosas.

Os valores dos pK_a obtidos para diferentes percentagens de água/metanol encontram-se sumariados na Tabela 9.4. Estes resultados permitiram verificar a influência de solventes mistos hidrometanólicos nas propriedadses ácido/base das benzodiazepinas em estudo e mostraram a existência de uma relação linear entre a quantidade de metanol no solvente e as constantes de acidez (Figura 9.3). Esta relação linear permitiu determinar por extrapolação o valor das constantes de acidez para soluções aquosas puras e estes são idênticos, a menos do erro experimental, aos obtidos neste trabalho por titulação potenciométrica e titulação espectrofotométrica em solução aquosa (Tabela 9.1).

2 Análise e discussão dos resultados obtidos.

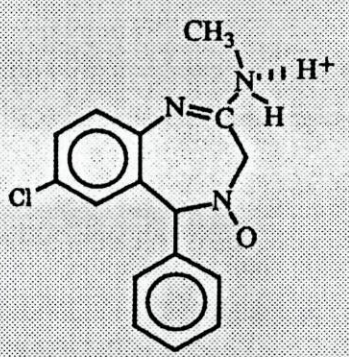
2.1 Valores obtidos para soluções aquosas puras

Os valores das constantes de acidez descritos na literatura para as benzodiazepinas estudadas são escassos, principalmente, para o *clorodiazepóxido* e para o *prazepam* e mostram uma grande dispersão.[227-230] Uma análise exaustiva da literatura permitiu concluir que a maioria dos estudos foram efectuados por titulação espectrofotométrica em meios hidroalcoólicos, muitas vezes sem ajuste de força iónica e sem controlo de temperatura[232,234] e que apenas um dos trabalhos publicados determina as constantes de acidez destas quatro benzodiazepinas em solução aquosa.[230] De referir, também, que a calibração do eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio, necessária para ajustar o "pH" das soluções foi em todos os trabalhos publicados feito com soluções tampão comerciais.

A análise dos resultados obtidos vai ser efectuada dividindo em dois grupos as quatro benzodiazepinas estudadas, isto é, o *medazepam* e o *clorodiazepóxido* que são substâncias mais solúveis, mais básicas e sem tendência a hidrolisar, nas condições em que este trabalho foi efectuado, vão ser analisadas primeiro e posteriormente o *diazepam* e o *prazepam*, substâncias menos solúveis em água, com carácter ácido acentuado e com tendência a hidrolisar.

MDZ / ClDZ

O primeiro valor determinado para o pK_a do *medazepam* foi de 4,4[9.1] mas posteriormente verificou-se que este valor não era o correcto e um valor de 6,17 foi determinado, também por espectrofotometria[9.2]. Analisando os dois trabalhos efectuados não é possível garantir uma causa para esta discrepância, pois no segundo não são referidas as soluções tampão utilizadas no ajuste de "pH", contudo é provável que o valor de 4,4 tenha origem numa possível interacção do tampão utilizado no ajuste de "pH", tampão que contem ácido fosfórico, ácido bórico e ácido acético, com o *medazepam*, pois não é impossível uma interacção entre o grupo carboxílico do ião acetato com o *medazepam* na sua forma protonada, $HMDZ^+$ (vide Capítulo 10). Considerando incorrecto o valor de 4,4 para o *medazepam*, os valores das constantes de acidez determinados neste trabalho estão de acordo com os já publicados para estas duas benzodiazepínas.



Estrutura possível do *clorodiazepóxido*, em solução neutra, se existir o equilíbrio associado à segunda protólise obtido por potenciometria

Para o clorodiazepóxido só é descrita uma constante de acidez,[230] no entanto os resultados obtidos neste trabalho por potenciometria, indicam a existência de uma segunda constante que poderá estar associada ao grupo amina $-NHCH_3$ ligado ao carbono C–2 e cujo valor está de acordo com o obtido para outras aminas secundárias,[240] A existência desta constante de acidez pressupõe que o clorodiazepóxido, em solução aquosa neutra se encontra sob a forma protonada em anexo. No entanto é de referir que por espectrofotometria de UV/VIS não foi possível detectar este equilíbrio.

Diazepam e prazepam

Estas duas benzodiazepinas são muito pouco solúveis em água, mas o principal problema associado à determinação das suas constantes de acidez é a sua tendência a hidrolisar, principalmente em soluções ácidas.[233,237,238]

O *diazepam* é a benzodiazepina mais estudada, pois é um dos ansiolíticos mais utilizados (*valium*), e várias metodologias foram utilizadas para a determinação do seu pK_a tendo-se obtido resultados bastante divergentes (Tabela 9.1). Os valores da literatura obtidos por titulação espectrofotométrica em meios hidroalcoólicos são idênticos ao obtido, neste estudo para água/metanol (10% metanol, v/v) (Tabela 9.4), mas os valores descritos na literatura para as constantes de acidez destas duas benzodiazepinas, em solução aquosa, são 0,20 unidades de pK_a inferiores às obtidas neste trabalho (Tabela 9.1).

Pfendt et al[230] usaram duas metodologias diferentes (potenciometria e solubilidade) para calcular o pK_a destas benzodiazepinas e obtiveram resultados concordantes entre elas o que lhes permitiu validar o método de solubilidades desenvolvido. O facto de apenas o valor das constantes destas duas benzodiazepinas ser inferior aos calculados neste trabalho leva a supor que o principal problema com os seus método está associado à calibração do eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio. Para regiões de "pH" superiores a 3,5, a calibração do sistema foi efectuada utilizando soluções tampão de referência de pH 4,01 e 7,00 (Radiometer) e a equação $pH_{GE} = -\log c_{H^+} + 0{,}04$ foi escolhida para relacionar o pH_{GE}, valor lido directamente no decimilivoltímetro, com a c_{H^+}, e afirmam que a mesma equação é válida para a região de "pH" 2,0 - 3,5, baseados na medição, por potenciometria directa, de soluções de HCl com força iónica ajustada (0,1 *M* NaCl). Nesta última região não é provável que esta mesma equação seja válida, pois a elevada concentração de catião hidrogénio utilizada provoca não só

aparecimento de valores apreciáveis no potencial de junção mas também variabilidade no coeficiente de actividade deste mesmo ião, pois a concentração de electrólito inerte para ajustar a força iónica é cada vez menor à medida que cresce a concentração de ácido. Estes dois efeitos juntos, "potencial de junção aparente,"[170,177] afectam a escala de "pH" e o seu efeito é tanto maior quanto maior for a concentração de catião hidrogénio.

Assim sendo, é de prever que uma equação do tipo $pH_{GE} = -\log c_H$ + **const** só seja válida para uma região superior a $-\log c_{H^+} > 3,0$, e que abaixo destes valores haja uma variabilidade no valor de **const** que não permita a determinação correcta de $-\log c_{H^+}$ através da mesma expressão. Considerando que os efeitos provocados por alterações no coeficiente de actividade do catião hidrogénio e nos potenciais de junção sejam opostos,[170,177] os valores correctos de $-\log c_{H^+}$ devem ser maiores que os obtidos com $pH_{GE} = -\log c_H + 0,04$, especialmente na região de $-\log c_H +$ entre 2,0 - 3,0, e por isso os valores dos pK_a do *diazepam* e do *prazepam* devem ser superiores aos descritos.[91,227,230] É também de salientar que as medições foram feitas em função do "pH", pelo que estava em jogo, simultâneamente a calibração não só do eléctrodo mas também do decimilivoltímetro[170] Para o *prazepam* o valor determinado por Pfendt por espectrofotometria (3,04) estará afectado de um erro proveniente da utilização da equação 9.3, que necessita do valor limite da absorvância $A_{\lambda_{BH^+}}$, o que obriga à utilização de soluções com $-\log c_{H^+} < 1$, situação em que deve ocorrer hidrólise; esta situação foi verificada por Pfendt et al., que reconheceram que este valor não oferecia confiança.

Finalmente deve ainda ser mencionado que um estudo recente sobre a determinação de pK_a por vários métodos, mostra que os valores das constantes de acidez da piretanida e da furosemida (substâncias com pK_{a2} da ordem de grandeza das benzodiazepinas) determinados pelo méto-

do de solubilidade são 0,2 unidades de pK_a inferiores aos dos valores obtidos por outros métodos.

2.2 Valores obtidos para soluções hidrometanólicas

CONSIDERANDO QUE A VARIAÇÃO OBSERVADA NA CONSTANTE DE ACIDEZ DE UM ÁCIDO, (quantificada pelo valor de pK_a) com a composição do solvente é dada por[51,193]

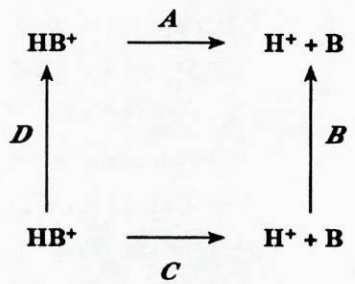
$$\ln(10)\, RT\, \Delta pK_a^{s,ag} = \Sigma\, \Delta G_t^{ag,s}(P) - \Sigma\, \Delta G_t^{ag,s}(R) \qquad (9.6)$$

em que ΔG_t (R, P) é a variação da função de Gibbs associada à transferência de espécies de água para o solvente *s*, pode-se para ácidos catiónicos definir o ciclo termodinâmico:

em que A = -RT ln(10) pK_a^{ag}, B = $\Delta G_t^{ag,s}$(P), C = -RT ln(10) pK_a^{s} e D = $\Delta G_t^{ag,s}$(R), o que mostra que a variação na constante de acidez é dada por:

$$\ln(10)RT\Delta pK_a^{s,ag} = \Delta G_t^{ag,s} =$$

$$= \Delta G_t^{ag,s}(H^+) + \Delta G_t^{ag,s}(B) - \Delta G_t^{ag,s}(BH^+) \qquad (9.7)$$



onde $\Delta G_t^{ag,s}(H^+)$ é a função de ibbs de transferência do catião hidrogénio e $\Delta G_t^{ag,s}$(B) e $\Delta G_t^{ag,s}(BH^+)$ são as funções de Gibbs de transferência das espécies neutras e protonadas,respectivamente.

A função de Gibbs de transferência de iões, ΔG_t , pode, segundo Popovych[2415], ser dividida em duas componentes, uma puramente electrostática (*el*) e outra não electrostática (*nel*) e assume que $\Delta G_t,nel^{ag,s}$ $(BH^+) = \Delta G_t,nel^{ag,s}(B)$, porque considera que a energia necessária para abrir uma cavidade no solvente e as interacções de dispersão são iguais para um dado ácido e a sua base conjugada, o que reduz a equação 9.6 a

$$\Delta G_t^{ag,s} = \Delta G_t^{ag,s}(H^+) - \Delta G_t,el^{ag,s}(BH^+) \qquad (9.8)$$

e considera ainda que a componente electroestática é praticamente constante independentemante do grupo que se encontra ligado à função amina o que advem das interacções electroestáticas estarem localizadas no grupo funcional onde reside a carga. Apresenta também uma tabela (ver em anexo) que permite verificar que valores médios de ΔpK calculados da literatura, para 13 ácidos catiónicos em metanol e em etanol, desde o catião amónio até ao catião octilamónio e catiões anilínio substituídos com constantes de acidez que vão de 2 a 10, são praticamente constantes para cada meio sendo o erro aliado a esta determinação da ordem de grandeza do da determinação das próprias constantes de acidez. Uma comparação destes valores com os valores das funções de Gibbs de transferência do protão[193,241] nos mesmos meios permitiu que concluísse que o comportamento das duas funções é idêntico embora os valores de ΔpKa sejam inferiores aos de $\Delta G_t^{ag,s}(H^+)$. Esta diferença é atribuída à componente electrostática que é positiva para a transferência de água para meios com constantes dieléctricas mais baixas (equação 9.8).

ΔpKa de algumas aminas (escala molal, 25 °C)

% alcool	água/etanol	água/metanol
10		-0,11±0,01
20	-0,24±0,03	
30	-0,35±0,04	-0,40±0,03
50	-0,73±0,04	-0,75±0,07

Fleming et al[193] fizeram um estudo semelhante e consideram que a aproximação mais simples para calcular $\Delta G_t,el$ é o modelo de solvatação de Born (Capitulo 2) :

$$\Delta G_t,el^{ag,s} = Z_i^2 /2 * (1/\varepsilon^s - 1/\varepsilon^{ag}) * 1/r_i \qquad (9.9)$$

em que $\Delta G_t,el^{ag,s}$ é a variação da função de Gibbs associada a variações na constante dieléctrica da solução, Z_i e r_i são, respectivamente a carga e o raio do ião i e ε^s e ε^{ag} são as constantes dieléctricas das misturas e da água pura, respectivamente Combinando esta equação 9.8 com a equação 9.5 obtêm, na escala molar, com r_i expresso em angstrom e temperatura de 22 °C

$$\Delta pK_t,el^{s,ag} = 122{,}8\ (1/\varepsilon^s - 1/\varepsilon^{ag})^* \ 1/r_i \qquad (9.10)$$

e então para ácidos catiónicos a equação 9.6 pode ser reescrita como

$$\Delta pK^{s,ag} = \Delta pK_t^{s,ag}(H^+) - \Delta pK_t,el^{s,ag}\ (BH^+) \qquad (9.11)$$

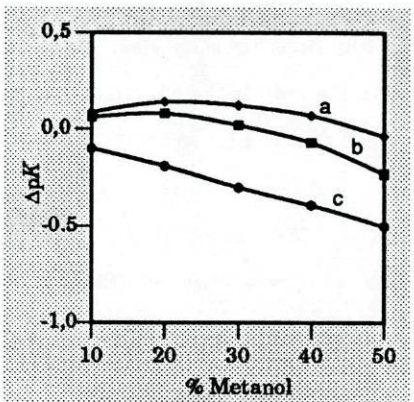
o que confirma que o efeito da função de Gibbs electoestática é o de diminuir ainda mais o pK_a deste tipo de ácidos do que o que é previsto pelos valores de $\Delta pK_t^{s,ag}(H^+)$.

As benzodiazepinas estudadas são ácidos catiónicos e os valores das constantes de acidez obtidos, neste trabalho, para as diferentes percentagens água/metanol mostram que a sua acidez aumenta à medida que aumenta a quantidade de metanol no solvente e que este aumento de acidez é idêntico para todas elas podendo ser descrito pela expressão geral:

$$^spK_a = {}^{ag}pK_a - 0{,}013(\pm 0{,}03)\ x\ (\%CH_3OH) \qquad (9.12)$$

Este comportamento está de acordo com o que atrás se descreve e com o observado experimentalmente para a maioria dos ácidos catiónicos, BH^+, incluíndo o catião amónio.[193,241]

A utilização de valores actualmente aceites pela IUPAC[190] para a função de Gibbs de transferência do catião hidrogénio (ver em anexo) mostra que o comportamento das benzodiazepinas estudadas em água/metanol é idêntico ao obtido por Popovych e Fleming[193,241] para outros ácido catiónicos. A utilização da equação de Born para as condições experimentais utilizadas, 25°C, e considerando que o raio do catião benzodiazepínio é da ordem de grandeza do catião anilínio, mostra que a componente



Valores de ΔpKa calculados com: (a) equação 9.10 sem a componente da energia de Born, (b) equação 9.10 com a componente da energia de Born, (c) equação 9.11, ΔpKa = ^spK_a - $^{ag}pK_a$

Tabela 9.5 ΔpK_a **experimental e calculado a partir da equação 9.7 em diferentes meios hidrometanólicos**

% CH_3OH	$\Delta pK_{a(exp)}$	$\Delta pK_{lit}^{s,ag}(H^+)^a$	$\Delta pK_{el}^{s,ag}(BH^+)^b$	$\Delta pK_{a(9.11)}$
10	-0,14	0,09	0,03	0,06
20	-0,23	0,14	0,06	0,08
30	-0,36	0,12	0,10	0,02
40	-0,50	0,07	0,14	-0,07
50	-0,63	-0,04	0,19	-0,23

[a] Valor extraído da referência 190

[b] Valor obtido da equação 10 para 25 °C e utilizando o raio do catião anilínio.

electrostática da função de Gibbs de transferênca calculada pela equação de Born tende a diminuir os valores dos ^sK_a das benzodiazepinas com o aumento da quantidade de metanol (Tabela 9.5).

3 Conclusões

A DIFICULDADE NA OBTENÇÃO DE VALORES DE CONSTANTES DE ACIDEZ DE CONFIANÇA para as benzodiazepinas advem da sua baixa solubilidade em solução aquosa e da sua tendência para hidrolisar, principalmente, em soluções ácidas. Estes factos justificam os estudos efectuados por espectrofotometria de ultravioleta /visível em solventes mistos, mas não permitem explicar a variabilidade dos valores até agora descritos na literatura.

A potenciometria é o método mais preciso para determinar constantes de equilíbrio desde que o modelo que descreve o sistema seja conhe-

cido. Neste trabalho, em condições experimentais muito bem definidas, embora no seu limite dada as baixas concentrações das benzodiaze-pinas estudadas, para se obter os valores das constantes de acidez estequiométricas destas substâncias a força iónica 0,1 *M* NaCl e os valores obtidos foram bastante precisos. Para verificar a exactidão dos resultados potenciométricos, determinaram-se estas mesmas constantes de acidez por titulação espectrofotométrica, em água, e os resultados obtidos permitem concluir que os valores dos pK_a determinados são não só precisos como exactos. Determinaram-se ainda as mesmas constantes de acidez por titulação potenciométrica em água/metanol até 50%(v/v) em metanol o que revelou a existência de uma relação linear entre o ${}^{s}pK_a$ determinado e a percentagem de metanol, o que permitiu a determinação dos ${}^{aq}pK_a$ em água pura por extrapolação linear; esta metodologia permite obviar o problema relacionado com a solubilidade das benzodiazepinas e dada a concordância entre os valores de pK_a determinados pela várias metodologias este método pode ser considerado preciso e de confiança.

EXTRAPOLAÇÃO DE pK_a

Albert *et al* afirmam[159] que a extrapolação linear para água pura só é possível quando se conseguem obter valores de constantes de acidez para substâncias que sejam insolúveis em água mas solúveis em percentagens alcoólicas inferiores a 10/20%. No entanto, neste trabalho determinaram-se não só as constantes de acidez do *diazepam*, *medazepam* e *clorodiazepóxido,* benzodiazepinas com uma solubilidade muito reduzida em água, mas também as constantes de acidez do *prazepam*, benzodiazepina cuja solubilidade só permitiu a determinação da sua constante de acidez, por potenciometria, para percentagens de metanol superiores a 20%. Os resultados obtidos mostram que a metodologia utilizada para determinações em água/metanol permite uma boa extrapolação mesmo para substâncias insolúveis para composições de 15% de metanol.

Os resultados globais obtidos nas titulações em meio hidrometanólico permitem concluir que quando se efectuam titulações potenciométricas, com o eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio, em água/metanol até 50% em metanol e o sistema é directamente calibrado em função da concentração do catião hidrogénio consegue-se obter valores para as constantes de acidez estequiométricas bastante precisos e que a extrapolação destes valores, obtidos às diferentes percentagens, para àgua pura permitem obter valores para as constantes de acidez em àgua precisos e exactos.

Com esta metodologia é então possível determinar constantes de acidez de confiança para substâncias praticamente insolúveis em água, desde que estas sejam solúveis em água/metanol. No entanto a validade do método pressupõe que sejam sempre verificadas as seguintes condições experimentais:

- a calibração do eléctrodo deve ser efectuada antes de cada titulação, utilizando o método de Gran, por titulação de soluções, com força iónica ajustada (normalmente < 0,15 *M*) de ácido forte com base forte de concentrações conhecidas
- as calibrações têm que ser efectuadas num meio com a mesma composição com que posteriormente se vai efectuar a determinação da constante de acidez garantindo-se que neste mesmo meio a dissociação do ácido forte e da base forte utilizadas é total e que a concentração do ácido forte é da ordem de 10^{-3} *M*
- o comportamento dos eléctrodos deve ser controlado de modo a que sejam satisfeitas as condições gerais referidas em 7.3
- que o meio é água /metanol até 50%(v/v), onde é estável o eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio e onde os potenci-

ais de junção são constantes.

A verificação destas condições permite afirmar que as técnicas de extrapolação linear não são afectadas pelos problemas normalmente associados a esta metodologia(), e que a extrapolação linear dos $^{s}pK_a$, determinados em água /metanol até 50% (v/v) em metanol, para água pura é sempre uma recta cuja ordenada na origem fornece valores de $^{ag}pK_a^{ag}$ idênticos aos determinados por titulações potenciométricas ou espectrofotométricas em água. Então para a determinação de constantes de acidez de substâncias praticamente insolúveis em água, mas solúveis em água / metanol, deve-se seguir esta metodologia, que é rápida, de fácil aplicação e origina resultados bastante precisos.

pK_a EM ÁGUA/METANOL

Os valores obtidos para as constantes de acidez das benzodiazepinas em água/metanol estão de acordo com o que era esperado para ácidos catiónicos, isto é, há uma dimuição do valor de pK_a à medida que se aumenta a concentração de metanol no solvente. Contudo a determinação teórica do $\Delta pK^{s,ag}$ pela utilização da equação 9.8 aliada à equação 9.10, para as condições experimentais em que este trabalho foi efectuado, não permite obter uma concordância, entre este valor e o valor de $\Delta pK^{s,ag}$ experimental, da ordem de grandeza obtida por Fleming[193], embora a tendência seja a mesma e se verifique que a influência da componente electrostática de Born é predominante. Como os valores de $\Delta pK^{s,ag}$ são idênticos qualquer que seja o ácido catiónico em estudo pode-se afirmar que a solvatação específica do resíduo aromático, que está distante do local da reacção, não deve ter um papel importante na determinação do $\Delta pK^{s,ag}$ e que neste local as variações observadas são devidas principalmente a variações na resposta dieléctrica do meio. Tal como Fleming afirma[193] o processo de dissociação dos ácidos catiónicos deve ser fortemente determinado pelo tipo de sol-

vatação do protão através das ligações de hidrogénio rodeiam o dador e o aceitador do protão.

O comportamento de ácidos catiónicos parece à partida diferir do observado para ácidos neutros[51], no entanto o que se verifica é uma diminuição da constante de acidez destes últimos à medida que aumenta a quantidade de alcool no solvente. Se se observar a equação 9.6 verifica-se que para os ácidos neutros

$$\ln(10)RT\ \Delta pK_a^{s,ag} = \Delta G_t^{ag,s} =$$

$$= \Delta G_t^{ag,s}(H^+) + \Delta G_t^{ag,s}(A^-) - \Delta G_t^{ag,s}(HA) \quad (9.13)$$

e se se efectuarem as mesmas considerações que foram efectuadas para os ácidos catiónicos tem-se

$$\Delta pK^{s,ag} = \Delta pK_t^{s,ag}(H^+) + \Delta pK_{t,el}^{s,ag}(A^-) \quad (9.14)$$

o que mostra que o aumento ou a diminuição das constantes de acidez de qualquer tipo de ácidos depende predominantemente da energia de transferência dada pela equação de Born.

Dados da literatura[242,243]permitem verificar a existência de um valor para $\Delta pK^{s,ag}$ da ordem de grandeza, em módulo, do observado para os ácidos catiónicos o que parece apontar para um comportamento semelhante para qualquer tipo de ácido, isto é, o processo de dissociação de qualquer tipo de ácido deve ser largamente determinado pelo tipo de solvatação do protão através das ligações de hidrogénio que rodeiam o dador e o aceitador deste mesmo protão.

Estas observações estão de acordo com o facto de as espécies iónicas estarem preferencialmente rodeadas por moléculas de água enquanto que as espécies mais lipofílicas estão rodeadas por uma cadeia de moléculas de solvente de baixa constante dieléctrica[193,159]. Contudo dada a constância nos valores de $\Delta pK^{s,ag}$ (em módulo) de qualquer tipo de ácido, pelo

menos até 50% (v/v) na região rica em água as interacções junto dos locais de reacção devem ter um efeito predominante neste valor.

Capítulo

10

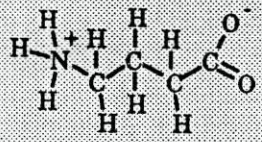
Constantes de Associação GABA/Benzodiazepinas

Como já foi referido no Capítulo 1, as benzodiazepinas são substâncias que actuam ao nível do SNC e cuja acção terapêutica está associada ao neurotransmissor GABA, ácido γ - aminobutírico. O seu mecanismo de acção ainda não é totalmente conhecido mas sabe-se que existe um aumento da interacção GABA/receptor na presença de benzodiazepinas. Como as propriedades das benzodiazepinas como ligandos, em solução não se encontram estudadas e como a sua acção terapêutica está directamente associada ao GABA é importante verificar qual o tipo de interacções que poderão existir entre estas substâncias em solução. No início deste capítulo descreve-se o estudo efectuado sobre o comportamento ácido/base do neurotransmissor GABA, nas condições experimentais em que foram determinadas as constantes de acidez das benzodiazepinas. Posteriormente, apresenta-se o estudo efectuado para a determinação das constantes de associação entre o GABA e duas das benzodiazepinas já estudadas, *medazepam* e *clorodiazepóxido*. Com base apenas nos resultados potenciométricos obtidos não é fácil definir quais os átomos envolvidos na formação dos sistemas GABA /BZP, razão pela qual se tentou estudar estes mesmos

sistemas por espectrofotometria de ultravioleta/visível. Não foi possível utilizar RMN no estudo deste tipo de interacções devido à baixa solubilidade das benzodiazepinas em solução aquosa.

1 Constantes de acidez do ácido γ - aminobutírico.

1.1 Determinação potenciométrica



Ácido γ – amino butírico

AS DETERMINAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS FORAM SEMPRE EFECTUADAS COM O SISTEma de titulações automáticas já descrito (Capítulo 7), utilizando o eléctrodo de referência de dupla junção da Merck e eléctrodos de vidro da marca Russel e Ingold. A calibração do sistema foi também efectuada como se descreve em 7.2. As constantes de acidez foram determinadas por titulação de 20,00 cm^3 de HNO_3 0,1 m*M* (I = 0,1 *M* NaCl; 25 °C) na presença de 1m*M* ou 2 m*M* de GABA com NaOH = 0,3 *M*, sob atmosfera de azoto. Foram efectuadas seis titulações independentes cada uma com mais de 30 pontos experimentais. O cálculo das constantes de acidez foi efectuado com o programa SUPERQUAD[89] e BEST.[87]

Tabela 10.1 p*Ka* do GABA e de alguns aminoácidos análogos

Aminoácido	H_2G	HG
GABA [a]	4,06 ± 0,02	10,44 ± 0,04
GABA [b]	4,09 ± 0,04	10,14 ± 0,05
Glicina [c]	2,37 ± 0,07	9,60 ± 0,05
α- Alanina [c]	2,33 ± 0,05	9,72 ± 0,05
β- Alanina [c]	3,57 ± 0,05	10,14 ± 0,05

[a] Valores obtidos neste trabalho; [b] valores da referência 112; [c] valores da referência 112

O GABA (em anexo) é um aminoácido com uma função carboxílica e outra amina e como tal calcularam-se duas constantes de acidez estando o pK_{a1} associado ao grupo carboxílico e o pK_{a2} atribuido à ionização do grupo amina. Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com os da literatura[244, 245] embora estes sejam escassos. Os valores obtidos são superiores aos normalmente observados para os α - aminoácidos o que é de esperar pois o aumento da distância entre os locais de protonação faz aumentar a basicidade dos grupos funcionais.[246] Esta distância faz pois aumentar a constante de protonação do grupo

carboxílico o que implica que a sua determinação seja efectuada numa zona de -log c_{H^+} > 3, o que permite a determinação precisa do valor desta constante. Por outro lado a desprotonação do grupo amina vai ocorrer acima de -log c_{H^+} =10, o que aumenta ligeiramente a incerteza do valor desta constante. Na Tabela 10.1 mostram-se os resultados obtidos neste trabalho e os valores das constantes de protonação retiradas da literatura para α–, β– e γ–aminoácidos.

1.2 Determinação espectroscópica

Os valores das constantes de acidez do GABA foram determinados também por RMN em água para verificar a exactidão dos resultados potenciométricos obtidos, principalmente para a constante de acidez aliada ao grupo amina. Não foi utilizada a espectrofotometria de ultravioleta/visível pois o GABA não apresenta nenhuma banda a comprimentos de onda superiores a 230 nm.

Utilizaram-se concentrações de GABA da ordem dos $5x10^{-3}$ *M* e foram preparadas várias amostras com -log c_{H^+} entre 2,8 e 10,3 (vide Capítulo 6). Na Figura 10.1 estão representados os espectros típicos obtidos para as soluções limite, isto é, -log c_{H^+} = 2,8 e -log c_{H^+} = 10,3, nas condições descritas no Capítulo 6. É possível observar a existência de um deslocamento significativo, no sentido de desvios químicos mais baixos, em todas as bandas do espectro, excluíndo, como é obvio a da referência. O tripleto da esquerda corresponde aos protões ligados ao átomo de carbono C–4, observando-se um alargamento dos picos devido ao acoplamento com os hidrogénios do grupo NH_3^+. O tripleto central corresponde aos protões ligados ao C–2 directamente ligado ao grupo carboxílico e o quintupleto corresponde aos protões ligados ao C–3. Foram efectuados dois ensaios independentes e os valores das constantes de acidez foram calculadas com o pro-

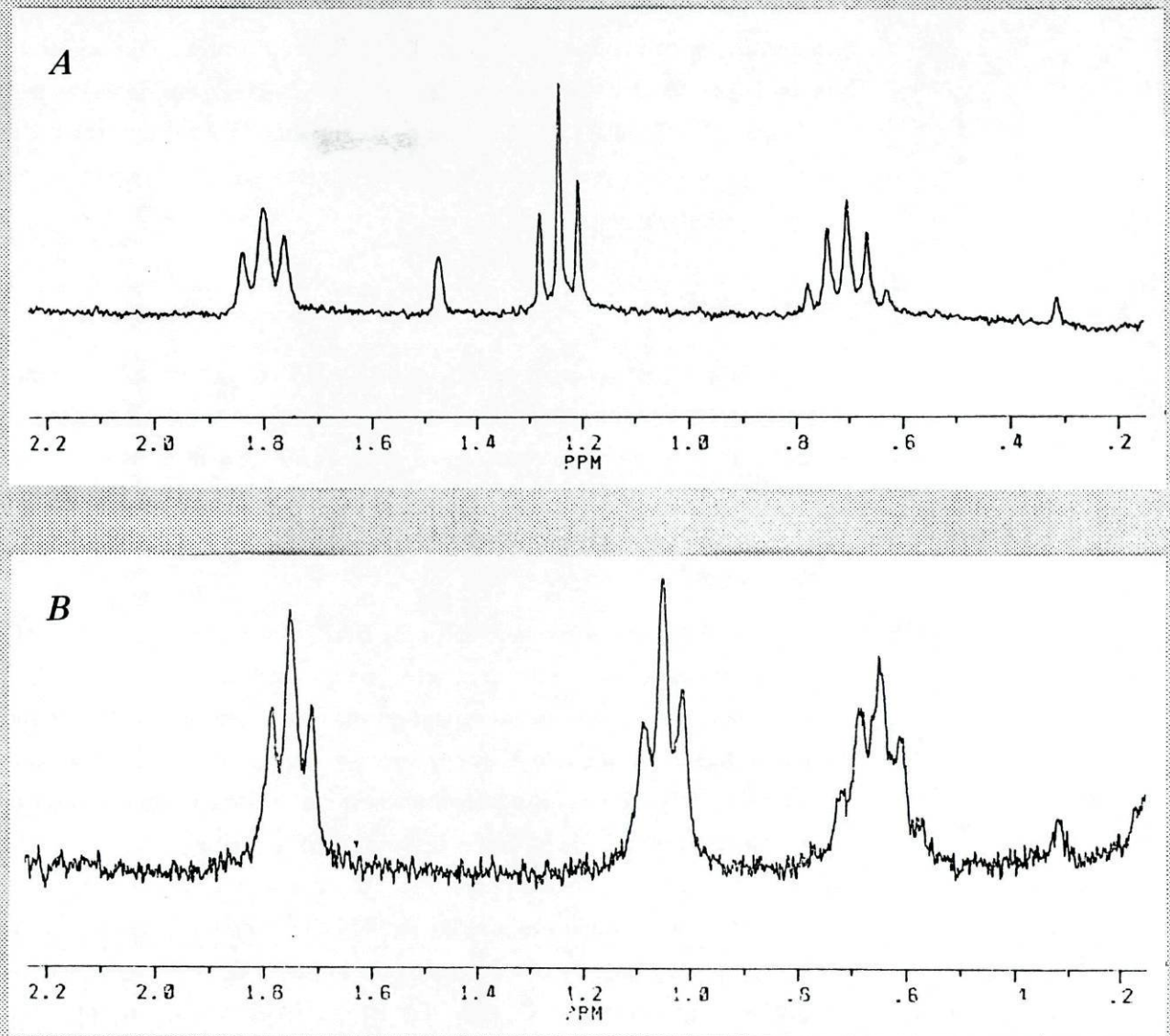


Figura 10.1 Espectros de RMN de ^1H do ácido γ-aminobutírico a pH 2,8 (A) e 10,3 (B)

Tabela 10.2 **Desvios químicos obtidos para o pico central do multipleto associado a cada tipo de átomos de hidrogénio em função de - $\log c_{H^+}$**

- $\log c_{H^+}$	Desvio químico / Hz		
	C–2	C–3	C–4
2,95	252,56	140,87	360,72
3,93	236,08	136,72	360,72
4,61	219,97	132,32	356,57
5,19	213,13	130,86	354,37
5,68	211,18	130,13	353,39
6,2	210,69	130,00	354,13
8,94	209,47	128,91	352,54
9,45	208,25	126,22	347,17
10,34	200,93	110,35	317,04
11,08	197,73	94,12	286,50

grama KaleidaGraph 2.02 com as equações que se apresentam em 6.3. Na Tabela 10.2 estão indicados, para cada valor de -log c_{H^+} , os desvios médios observados para o pico central de cada tripleto e para o pico central de cada quintupleto.

Havendo um equilíbrio rápido entre as várias espécies complexadas e não complexadas, o desvio químico, δ^j, para uma substância (j) é a média pesada dos desvios químicos das várias espécies em que esta substância existe em solução (δ_i^j), com um peso proporcional à fracção molar de cada espécie ($p_i = c_i/c_T$), em que c_i é a concentração de i e c_T a concentração total da espécie em solução; então $\delta^j = \Sigma_i\, p_i\, \delta_i$.[110] Para as constantes de

Tabela 10.3 Valores de pK_a do GABA determinados por RMN de ^1H e desvios químicos limite obtidos para as espécies H_2G (δ_{H_2G}), HG (δ_{HG}) e G (δ_G)

Carbono	pK_{a1}	pK_{a2}	δ_{H_2G}	δ_{HG}	δ_L
C–2	4,04	10,09	263,3	217,4	197,0
C–3	4,03	10,44	141,8	130,1	85,8
C–4	—	10,43	—	354,8	271,2

acidez do GABA obtêm-se $\delta^j = (\Sigma_h p_h \delta_h^j)$ que será, para a curva de titulação global

$$\delta_{cal} = |H_2G| / C_T \delta_{H2G} + |HG| / C_T \delta_{HG} + |A| \delta_G \qquad (11.1)$$

Esta equação está relacionada, através dos balanços materiais, com as constantes de acidez do GABA e estas são calculadas encontrando o conjunto de valores (δ_h^j, K_a) que minimiza a diferença entre a soma do quadrado dos resíduos entre os valores dos desvios químicos observados e calculados para a substância em estudo. As equações utilizadas estão descritas em 6.3, e devido à diferença entre as duas constantes de acidez é possível tratar os dados da zona ácida e da zona básica quer separadamente quer em conjunto. Exemplos das curvas de titulação obtidas encontram-se na Figura 10.2. Verifica-se a existência de duas inflexões nas curvas de titulação obtidas para os desvios observados associados ao C–2 e ao C–3. No entanto, a primeira inflexão é muito menos pronunciada para os desvios deste último, o que está de acordo com o facto de os desvios químicos observados para um determinado protão diminuirem com a distância ao núcleo onde se dá a coordenação. Pela mesma razão para os desvios químicos associados ao C–4 só se observam variações significativas para - log c_{H^+} superiores a 6.

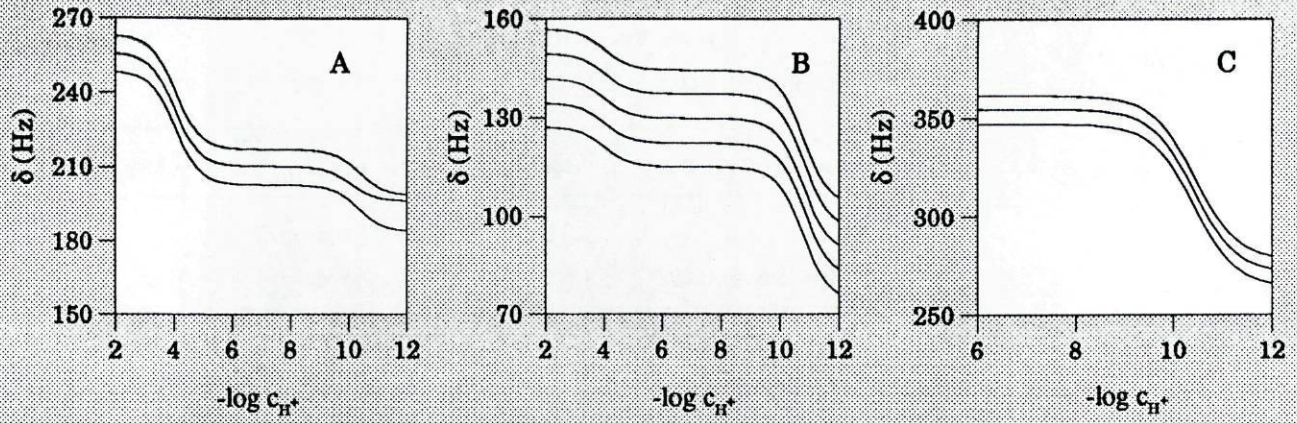


Figura 10.2 **Representação gráfica das curvas de titulação $\delta = f(-\log c_{H^+})$; (A) desvios químicos obtidos para o multipleto associado ao C– 2; (B) desvios químicos obtidos para o multipleto associado ao C – 3; (C) desvios químicos obtidos para o multipleto associado ao C– 4**

Os valores das constantes de acidez obtidos com os desvios químicos observados para C–2 e C–3 são concordantes entre si (Tabela 10.3), no entanto, verifica-se que para C–4 só é possível obter valores concordantes para a constante de acidez associada ao grupo amina, o que mostra que a densidade electrónica dos átomos de hidrogénio de C–4 é pouco influenciada pela protonação do grupo carboxílico.

2 Constantes de associação

2.1 Determinações potenciométricas

As constantes de associação foram determinadas por titulação, sob atmosfera de azoto (sistema e condições gerais já descritas nos Capítulos 6 e 7) de 20,00 cm^3 de HNO_3 1-3 m*M* (I = 0,1 *M* NaCl; 25 °C) na presença de

Tabela 10.4 Constantes de associação obtidas por titulação potenciométrica para os sistemas GABA/*medazepam* e GABA/*clorodiaxepóxido*

Benzodiazepina	$\log\beta_{111}$	$\log\beta_{110}$	$\log\beta_{11\text{-}1}$
Medazepam	8,91 ± 0,05	2,90 ± 0,05	-
Clorodiaxepóxido	7,51 ± 0,06	2,89 ± 0,04	-7,21 ± 0,03

GABA (1m*M* - 2,5 m*M*) e na presença de benzodiazepina (0,5 - 1 m*M*) com NaOH ≈ 0,03 *M*. Foram efectuados cerca de 30 ensaios independentes para cada sistema todos com mais de 40 pontos experimentais. O cálculo das constantes foi efectuado com os programas SUPERQUAD e BEST. Nos modelos utilizados nestes programas, para a análise dos resultados experimentais obtidos assumiu-se a existência de três equilíbrios de associação, definidos pelas equações

$$\mathrm{BZP + HG + H^+ \rightleftharpoons HBZP(HG)} \qquad \beta_{111} \qquad (10.2)$$

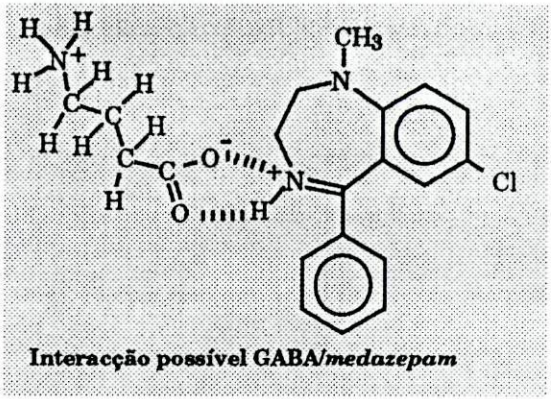
$$\mathrm{BZP + HG \rightleftharpoons BZP(HG)} \qquad \beta_{110} \qquad (10.3)$$

$$\mathrm{BZP + HG \rightleftharpoons BZPG + H^+} \qquad \beta_{11\text{-}1} \qquad (10.4)$$

em que BZP é qualquer uma das benzodiazepinas estudadas e HG representa o GABA na forma de ião dipolar e os β têm o significado descrito no Capítulo 6. As constantes de acidez destas duas espécies e a constante de autoprotólise da água determinadas neste trabalho, foram sempre incluídas no modelo.

MEDAZEPAM

Os dados experimentais obtidos para o *medazepam* só permitiram a determinação das constantes correspondentes aos dois primeiros equilíbrios (Tabela 10.4)., dado que se observou a formação de um precipitado a - $\log c_{H^+}$ ≈



Interacção possível GABA/*medazepam*

6,7 o que impede a determinação do terceiro equilíbrio. Estes resultados não dão, por si só, qualquer informação estrutural sobre as espécies formadas nos equilíbrios químicos detectados em solução. De qualquer modo, é possível tecer algumas considerações sobre a estrutura provável destas espécies. Assim sendo, para o equilíbrio definido pela equação 10.2 será plausível que ele englobe a desprotonação do grupo carboxílico e a sua associação ao grupo ionizado do *medazepam* (em anexo), dado que existirá uma repulsão entre este último grupo e o grupo amina do GABA. Teremos então o equilíbrio traduzido pela equação

$$HMDZ^+ + H_2G \rightleftharpoons HMDZ(HG) + H^+ \qquad (10.6)$$

que confirma a existência de um aumento da concentração de catião hidrogénio livre em solução, em relação ao que era esperado se não houvesse nenhuma interacção entre estas duas espécies em solução, como foi verificado experimentalmente. Pode-se então definir o equilíbrio de associação traduzido por

$$HMDZ^+ + HG \rightleftharpoons HMDZ(HG) \qquad K_{ass}^{HMDZ} \qquad (10.7)$$

em que $\log K_{ass1}^{HMDZ} = \log \beta_{111} + \log K_{a(MDZ)}$.

O equilíbrio traduzido pela equação 10.3 poderia estar associado à desprotonação do *medazepam* no equilíbrio traduzido por

$$HMDZ(HG) \rightleftharpoons MDZ(HG) + H^+ \qquad (10.8)$$

ou seja a constante de acidez da espécie HMDZ(HG), no entanto isto implicaria a desprotonação no local da associação o que não parece muito provável. Uma hipótese mais aceitável é que a desprotonação ocorra no grupo amina do GABA, equilíbrio traduzido por:

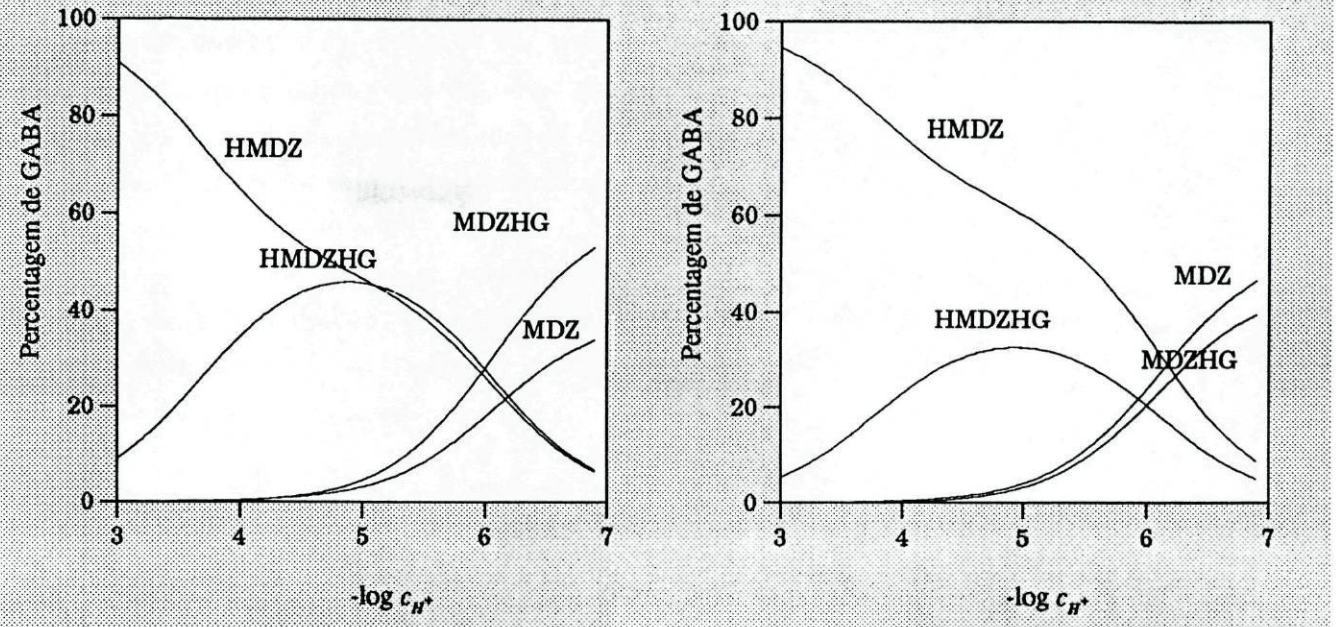


Figura 10.3 **Diagrama de distribuição para o sistema GABA/*medazepam*. A— 6 x 10^{-4} *M* de *medazepam* e 2,5 x 10^{-3} *M* de GABA; B:—6x10^{-4} *M* de *medazepam* e 1,0 x10^{-3} *M* de GABA**

$$\mathbf{HMDZ(HG) \rightleftharpoons HMDZ(G) + H} \qquad K^{H}_{HMDZ(HG)} \qquad \mathbf{(10.9)}$$

em que $\log K^{H}_{HMDZ(HG)} = \log \beta_{110} - \log \beta_{111}$

Os diagramas de distribuição (Figura 10.3) mostram que o equilíbrio traduzido pela equação 10.2 ocorre em toda a gama de - $\log c_{H^+}$ estudada mas com formação máxima a - $\log c_{H^+} \approx 4{,}8$ e que o aumento da concentração de GABA faz aumentar a sua percentagem de formação em solução. O equilíbrio traduzido pela equação 10.3 começa a ser importante à volta deste mesmo valor, o que é indicativo de uma aumento substancial

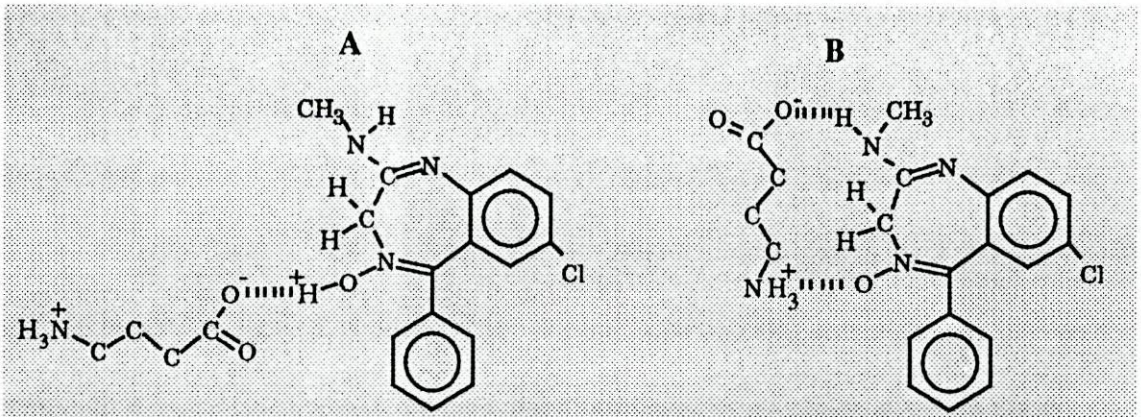
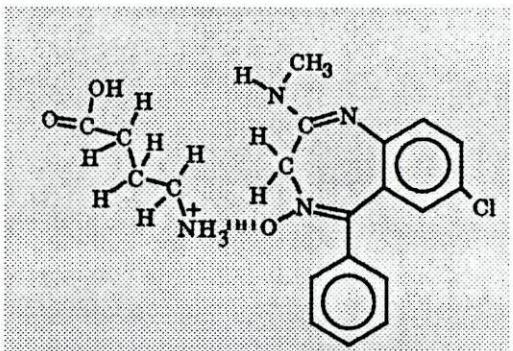


Figura 10.4 Interacções possíveis entre o *clorodiazepóxido* e o GABA. A: interacção correspon-dente ao equilíbrio definido pela equação 10.10 B:Interacção correspondente à associação do grupo amina do GABA com o grupo N–O do *clorodiazepóxido*

da acidez do grupo amina do GABA, quando este se encontra associado ao *medazepam* .

Clorodiazepóxido

Para esta benzodiazepina observaram-se os três equilíbrios traduzidos pelas equações 10.2 a 10.4, (os valores das constantes de associação estão incluídos na Tabela 10.4), o que advém da maior solubilidade desta benzodiazepina em solução alcalina (Capítulo 9) que permitiu a realização de titulações até - log $c_{H^+} \approx 11$.



Interacção possível GABA /*clorodiazepóxido*

Para este sistema temos duas hipóteses a considerar:

- o equilíbrio definido pela equação 10.2 englobaria a desprotonação do grupo carboxílico e a sua associação ao grupo ionizado do *clorodiazepóxido* (Figura 10.4A) dando origem a

$$\mathbf{HClDZ^+ + HA \rightleftharpoons HClDZ(HA)} \qquad K_{ass}^{HClDZ} \qquad \mathbf{(10.10)}$$

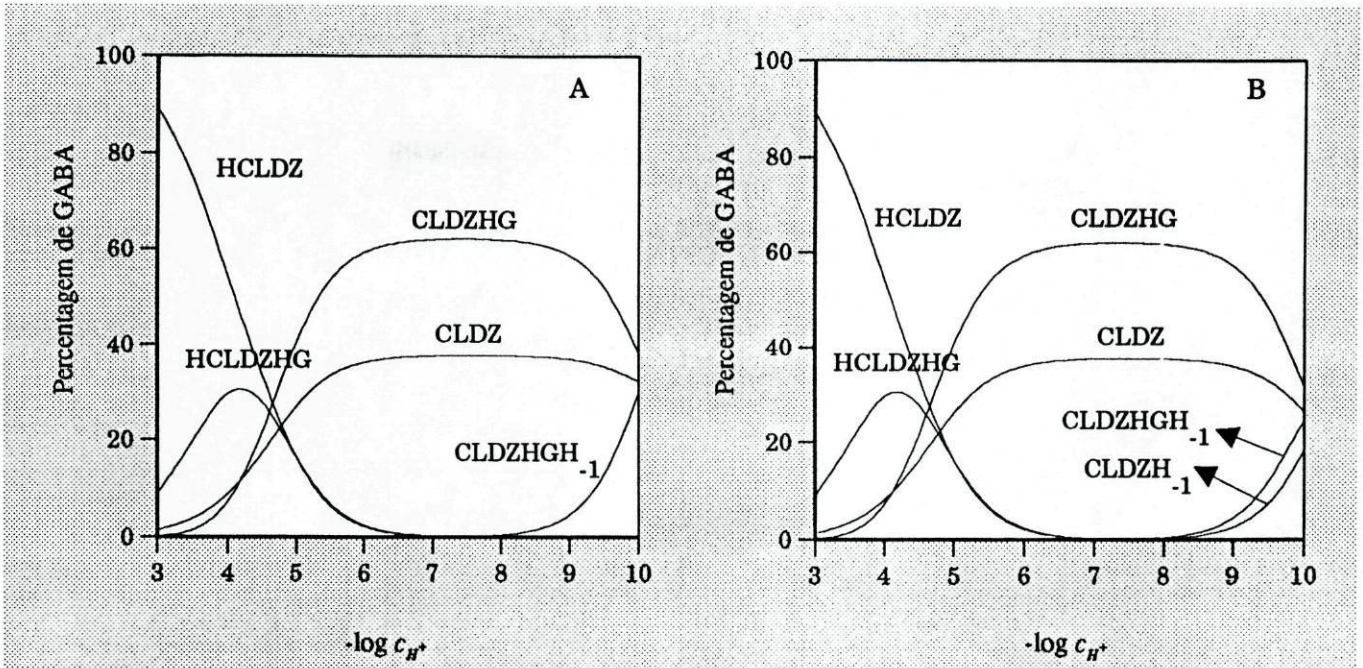


Figura 10.5 Diagrama de distribuição para o sistema GABA/*clorodiazepóxido*. A: 6 x 10^{-4} *M* de *clorodiazepóxido* e 2,5 x 10^{-3} *M* de GABA; B: mesmas condições mas considerando a segunda protólise do *clorodiazepóxido* determinada potenciometricamente

com log K_{ass}^{HClDZ} = log β_{111} + log $K_{a(ClDZ)}$. O equilíbrio definido pela equação 10.3 estaria associado à interacção do grupo amina do GABA com o grupo N-óxido do *clorodiazepóxido* (Figura 10.4B) ou,

- o equilíbrio definido pela equação 10.2 está associado a uma interacção do grupo amina do GABA com o N -óxido (em anexo) dando origem ao equilíbrio traduzido por

$$HClDZ^+ + H_2G \rightleftharpoons ClDZ(H_2G) + H^+ \qquad (10.11)$$

que seria caracterizado pela constante de associação

$$ClDZ + H_2G \rightleftharpoons ClDZ(H_2G) \qquad K_{ass}^{ClDZ} \qquad (10.12)$$

cujo valor seria então obtido pela seguinte expressão $\log K_{ass}^{ClDZ} = \log\beta_{111} + \log K_{a1(HG)}$. O equilíbrio traduzido pela equação 10.3 estaria, neste caso, associado à desprotonação do grupo carboxílico traduzida pela equação

$$ClDZ(H_2G) \rightleftharpoons ClDZ(HG) + H^+ \qquad K^H_{ClDZ(H_2G))} \qquad (10.13)$$

com $\log K^H_{ClDZ(H_2G)} = \log \beta_{110} - \log \beta_{111}$.

Em qualquer das hipóteses o equilíbrio traduzido pela equação 10.4 só poderá estar relacionado com a desprotonação do grupo amina do GABA pois este equilíbrio começa a formar-se a $-\log c_{H^+} \approx 7$ e não parece possível existir outro grupo que possa libertar protões.

2.2 Determinações espectrofotométricas (UV/VIS)

Todas as determinações foram efectuadas com concentrações de benzodiazepinas da ordem de grandeza das utilizadas para a determinação das constantes de acidez (ver Capírulo 9). As concentrações de GABA utilizadas variaram entre $1x10^{-4}$ a $1x10^{-3}M$. As soluções foram preparadas como se descreve no Capítulo 6 e a calibração do sistema potenciométrico para determinação da concentração de catião hidrogénio foi efectuada como se descreve no Capítulo 7. Foram executados mais de três ensaios independentes com cerca de 10-15 soluções diferentes varrendo toda a gama de $-\log c_{H^+}$ utilizada em potenciometria, pois embora não se soubesse qual a contribuição de cada espécie para a absorvância sabia-se qual a zona de $-\log c_{H^+}$ em que cada uma delas tinha uma concentração máxima. As absorvâncias foram registadas de 2 em 2 nm num total de 21 comprimentos de onda para o *clorodiazepóxido* e de 30 para o *medazepam*.

O GABA não absorve nas zonas de comprimento de onda estudados e os espectros obtidos para os sistemas GABA/BZP estudados não apresentam à primeira vista nenhuma alteração, pelo menos no que diz respeito ao número de bandas observadas e ao comprimento de onda máximos destas mesmas bandas, em relação aos espectros das benzodiazepinas puras. Estes factos tornaram difícil inferir locais de coordenação relacionados com as constantes de associação já determinadas por potenciometria.

O tratamento matemático dos dados obtidos foi efectuado para determinados comprimentos de onda com base na lei de Beer-Lambert definida de uma forma geral pela expressão:

$$A = \varepsilon_{HBZP+}|HBZP^+| + \varepsilon_{BZP}|BZP| + \varepsilon_{BZPHG}|BZPHG| +$$

$$+ \varepsilon_{HBZPHG}|HBZPHG| + \varepsilon_{BZPG}|BZPG| \qquad (10.14)$$

em que $HBZP^+$ e BZP representam, respectivamente, as benzodiazepinas na forma protonada e na forma neutra, BZPHG a espécie formada no equilíbrio descrito pela equação 10.3, HBZPHG a espécie formada no equilíbrio descrito pela equação 10.2 e BZPG a espécie formada no equilíbrio descrito pela equação 10.4. O programa SQUAD foi usado no tratamento matemático dos dados obtidos para todos os comprimentos de onda, simultaneamente. Os modelos utilizados foram vários, assumindo-se:

i A não ocorrência de associação.

ii A existência das constantes de acidez e do equilíbrio definido pela equação 10.2, considerando $A = \varepsilon_{HBZP^+}|HBZP| + \varepsilon_{BZP}|BZP| + \varepsilon_{HBZPHG}|HBZPHG|$.

iii A existência das constantes de acidez e do equilíbrio definido pela equação 10.3, considerando $A = \varepsilon_{HBZP^+}|HBZP| + \varepsilon_{BZP}|BZP| + \varepsilon_{BZPHG}|BZPHG|$.

iv A existência simultânea destes dois equilíbrios em que $A = \varepsilon_{HBZP^+}|HBZP| + \varepsilon_{BZP}|BZP| + \varepsilon_{BZPHG}|BZPHG| + \varepsilon_{HBZPHG}|HBZPHG|$, considerando vários casos possíveis, isto é, $\varepsilon_{BZPHG} = 0$ ou $\varepsilon_{HBZPHG} = 0$ ou $\varepsilon_{BZPHG} = \varepsilon_{HBZPHG}$ e mesmo $\varepsilon_{BZPHG} = \varepsilon_{HBZPHG} = 0$.

v No caso do clorodiazepóxido a existência simultânea dos três equilíbrios atrás referidos.

Em todos os casos foram também estudadas separadamente as zonas de - log c_{H^+} em que se esperava um máximo na concentração de uma dada espécie.

Dada a ordem de grandeza das constantes de associação determinadas potenciometricamente e as concentrações utilizadas por espectrofotometria, o facto de não se ter observado uma diferença marcante nos espectros experimentais fez logo prever uma certa dificuldade na determinação espectrofotometrica destas constantes e muito mais na possibilidade de inferir os locais de coordenação. Uma contribuição adicional para a dificuldade na determinação das constantes reside no facto de que as espécies formadas, além de existirem em concentrações baixas, podem ter absortividades molares, para determinados comprimentos de onda, interdependentes o que ainda provoca uma menor variação na absorvância total para variações nas concentrações totais das espécies presentes.[247]

Contudo, embora os resultados obtidos por espectrofotometria forneçam pouca informação estrutural sobre os sistemas em estudo podem permitir avaliar a exactidão das constantes de associação dos sistemas em estudo.

Medazepam

A análise dos espectros de *medazepam* na presença e na ausência de GABA para uma mesma concentração de *medazepam* e para um mesmo

Tabela 10.5 Constantes de associação determinadas por espectrofotometria para os sistemas GABA/*medazepam* e GABA/*clorodiazepóxido*

Tipo cálculo	$\log\beta_{111}$	$\log\beta_{110}$
	Medazepam	
SQUAD [a]	8,91 ± 0,06	3,40 ± 0,12
SQUAD [b]	8,90 ± 0,04	
SQUAD [c]	8,90 ± 0,04	2,77 ± 0,08
Lei de Beer [d] (λ=260 e λ=450 nm)	8,90 ± 0,04	
	Clorodiazepóxido	
SQUAD [a]	8,08 ± 0,02	3,01 ± 0,02
Lei de Beer (λ=310 nm)	7,70 ± 0,05[e]	2,81 ± 0,10[f]
Lei de Beer (λ=270 nm)	8,01 ± 0,01[e]	2,80 ± 0,10[f]

[a] equílibrio (iv); [b] Para valores de λ entre 230 e 250 nm e com -log c_{H^+} < 6,0; [c] Para valores de λ entre 230 e 250 nm e com 4 < -log c_{H^+} < 10; [d] Aplicação directa da Lei de Beer-Lambert até -log c_{H^+} < 5; [e] Aplicação directa da Lei de Beer-Lambert até -log c_{H^+} ≈ 5; [f] Aplicação directa da Lei de Beer-Lambert para -log c_{H^+} > 5

valor de -log c_{H^+} permitem concluir que há um aumento da absorvância global para o intervalo de comprimentos de onda de 230 - 250 nm e uma diminuição da absorvância global no intervalo de 400 - 500 nm principalmente para valores de -log c_{H^+} entre 3 e 6. Este resultado indica a existência de uma ou mais espécies, em solução, que absorvem ao mesmo comprimento de onda máximo da espécie MDZ e portanto fazem diminuir a absorvância global aos comprimentos de onda máximos da espécie HMDZ.

Como entre 400 e 500 nm a única espécie que absorve é HMDZ, calculou-se para estes comprimentos de onda as concentrações desta espécie para vários valores de -log c_{H^+} entre 3 e 5 e a partir das absortividades

molares anteriormente calculadas (Capítulo 9), considerando a existência apenas da espécie HMDZ(HG), pois para estes valores de -log c_{H^+} a concentração da espécie MDZ(HG) deve ser muito baixa, determinou-se a constante de associação da forma protonada (equação 10.2). O valor obtido (Tabela 10.5) para esta constante de associação é igual, a menos do erro experimental, à determinada por potenciometria e é igual para todos os comprimentos de onda utilizados na zona de -log c_{H^+} já mencionada. A mesma metodologia foi utilizada para comprimentos de onda de 260 e 280 nm assumindo $A = \varepsilon_{HBZP}$ |HBZP| + ε_{BZP} |BZP| e que HMDZ(HG) não absorvia a estes comprimentos de onda e obtiveram-se resultados concordantes com os obtidos para 400 a 500 nm e por potenciometria.

A utilização do programa SQUAD com todos os dados espectrais adquiridos desde 210 - 500 nm e -log c_{H^+} entre 2 e 11 permite concluir que dos modelos propostos (i - iv) o que fornece resultados mais aceitáveis em termos dos parâmetros estatísticos fornecidos por este programa (Capítulo 6) é o que engloba a formação das espécies HMDZ(HG) e MDZ(HG) considerando que estas duas espécies têm absortividades molares iguais para toda a gama de comprimentos de onda utilizados. Com este modelo os valores de constantes de associação obtidos (Tabela 10.5) são iguais aos determinados pela equação de Beer -Lambert e por potenciometria para o equilíbrio definido pela equação 10.2 mas são superiores aos determinados potenciometricamente para o equilíbrio associado à equação 10.3. A utilização de comprimentos de onda apenas entre 230 e 250, onde a absorvância vai ser dada pela expressão $A = \varepsilon_{HBZP}$ |HBZP| + ε_{BZP} |BZP| + ε_{HBZPHG} |HBZPHG| + ε_{BZPHG} |BZPHG|, no programa SQUAD permitiu concluir que nesta gama de comprimentos de onda e com valores de -log $c_{H^+} < 6{,}0$ não é possível calcular a constante associada à equação 10.3 e que o valor da constante definida por 10.2 é igual ao determinado pelos outros métodos. Este mesmo programa permite determinar para esta mesma zona de com-

primentos de onda, mas para valores de -log c_{H^+} entre 4 e 10, o valor da constante de associação definida pela equação 10.3, no entanto, este valor é inferior ao determinado potenciometricamente.

A utilização do modelo i permite o cálculo de uma constante de acidez aparente que é sempre inferior à determinada no Capítulo 9 e fornece para a espécie MDZ absortividades molares para os comprimentos de onda entre 230 a 250 superiores às obtidas no Capítulo 9 para toda a gama de -log c_{H^+} utilizada. Para comprimentos de onda 400 a 500 nm fornece para a espécie HMDZ absortividades molares inferiores às obtidas para -log c_{H^+} entre 3 e 6, o que confirma a existência de alguma interacção entre as espécies que existem em solução.

Clorodiazepóxido

A análise dos espectros electrónicos do *clorodiazepóxido* na presença e na ausência de GABA para uma mesma concentração de *clorodiazepóxido* e para um mesmo valor de -log c_{H^+} permitem concluir que para comprimentos de onda entre 210 e 290 há uma diminuição da absorvância ao comprimento de onda onde é máxima a absorção da espécie HClDZ e um aumento da absorvância ao comprimento de onda onde é máxima a absorção da espécie ClDZ. Isto permite afirmar que deve ocorrer a formação de pelo menos uma nova espécie que absorve ao comprimento de onda máximo da espécie ClDZ, ou seja a espécie não ionizada. Contudo, as variações nas absorvâncias em função de -log c_{H^+} são menores do que para o caso do *medazepam* o que torna mais difícil a determinação correcta das constantes de associação.

Cálculos efectuados perto do comprimento de onda de 310 nm e para valores de -log c_{H^+} até 5, onde existe uma diminuição da absorvância global, considerando que $A = \varepsilon_{HBZP}$ |HBZP| + ε_{BZP} |BZP| e que a espécie ClDZ(HG) não absorve permitiu a determinação da constante de associação (Tabela 10.5) do *clorodiazepóxido*/GABA correspondente à equação

10.2. O valor obtido é ligeiramente superior ao determinado potenciometricamente. A mesma metodologia foi aplicada para um comprimento de onda de 270 nm, tendo-se obtido valores superiores aos calculados a 310 nm.

O mesmo tipo de cálculo foi efectuado para 310 e 270 nm, mas considerando apenas a constante de associação definida pela equação 10.3, que a espécie associada não absorve e para valores de -log c_{H^+} superiores a 6. Os resultados obtidos (Tabela 10.5) foram ligeiramente inferiores aos determinados potenciometricamente.

Os resultados experimentais foram tratados globalmente com o programa SQUAD de acordo com os modelos propostos atrás (i -v) e verificou-se ser impossível detectar o equilíbrio definido pela equação 10.4. No entanto, os melhores resultados em termos dos parâmetros estatísticos fornecidos por este programa (Capítulo 6), foram obtidos para o modelo que engloba a formação das espécies ClDZ(HG) e ClDZ(G) considerando que estas duas espécies têm absortividades molares iguais para toda a gama de comprimentos de onda utilizados (Tabela 10.5). O tratamento matemático efectuado com este mesmo programa para valores de -log $c_{H^+} < 5$ só permite detectar a constante de associação definida pela equação 10.2, mas com piores parâmetros estatísticos e dando origem a um valor mais elevado para esta constante de associação. A determinação efectuada para valores de -log c_{H^+} superiores 5 fornece resultados idênticos aos obtidos para toda a gama de -log c_{H^+} utilizada neste trabalho.

3 Conclusões

As constantes de acidez obtidas para o GABA tanto potenciometricamente como por RMN são bastante concordantes entre si, e concordantes com os escassos valores descritos na literatura.[244, 245] Os resultados obtidos estão de acordo com o que se esperava tendo em conta que a maior distância en-

10.2. O valor obtido é ligeiramente superior ao determinado potenciometricamente. A mesma metodologia foi aplicada para um comprimento de onda de 270 nm, tendo-se obtido valores superiores aos calculados a 310 nm.

O mesmo tipo de cálculo foi efectuado para 310 e 270 nm, mas considerando apenas a constante de associação definida pela equação 10.3, que a espécie associada não absorve e para valores de -log c_{H^+} superiores a 6. Os resultados obtidos (Tabela 10.5) foram ligeiramente inferiores aos determinados potenciometricamente.

Os resultados experimentais foram tratados globalmente com o programa SQUAD de acordo com os modelos propostos atrás (i -v) e verificou-se ser impossível detectar o equilíbrio definido pela equação 10.4. No entanto, os melhores resultados em termos dos parâmetros estatísticos fornecidos por este programa (Capítulo 6), foram obtidos para o modelo que engloba a formação das espécies ClDZ(HG) e ClDZ(G) considerando que estas duas espécies têm absortividades molares iguais para toda a gama de comprimentos de onda utilizados (Tabela 10.5). O tratamento matemático efectuado com este mesmo programa para valores de -log $c_{H^+} < 5$ só permite detectar a constante de associação definida pela equação 10.2, mas com piores parâmetros estatísticos e dando origem a um valor mais elevado para esta constante de associação. A determinação efectuada para valores de -log c_{H^+} superiores 5 fornece resultados idênticos aos obtidos para toda a gama de -log c_{H^+} utilizada neste trabalho.

3 Conclusões

As constantes de acidez obtidas para o GABA tanto potenciometricamente como por RMN são bastante concordantes entre si, e concordantes com os escassos valores descritos na literatura.[244, 245] Os resultados obtidos estão de acordo com o que se esperava tendo em conta que a maior distância en-

tre os locais de protonação faz aumentar a basicidade dos grupos funcionais, como se pode constatar (Tabela 10.1) pelos valores das constantes de acidez propostas pela IUPAC[246] para outros aminoácidos. A glicina e a α-alanina têm praticamente o mesmo valor para as suas constantes de acidez mas a β-alanina já apresenta valores mais básicos para as suas constantes de acidez e para o GABA ainda há um maior aumento de basicidade. Os valores dos desvios químicos obtidos por RMN permitem confirmar que o pK_{a1} está relacionado com a protonação do grupo carboxílico e o pK_{a2} com o grupo amina.

A escolha do modelo que melhor descreve o sistema em estudo deve estar associada não apenas à qualidade dos parâmetros estatísticos fornecidos pelos programas de cálculo mas, sobretudo, às características químicas inerentes a esse sistema, avaliadas por comparação com modelos quimicamente semelhantes, já estudados. Para os modelos que pareçam plausíveis química e estatísticamente deve-se escolher o que tiver menor número de espécies.[95] Se mesmo assim não for possível escolher um só modelo será necessário recorrer a diferentes técnicas experimentais que permitam, devido a uma informação diversificada, escolher o modelo mais correcto.

Dada a diversidade de equilíbrios que podem estar associados às constantes de equilíbrio globais calculadas, apresenta-se na Tabela 10.6 todos os equilíbrios que poderão descrever o comportamento químico dos sistemas em estudo. As considerações que posteriormente se vão efectuar são baseadas nestes equilíbrios.

Neste trabalho o modelo potenciométrico mais correcto para o sistema *medazepam*/GABA foi sem dúvida o que engloba a formação das duas constantes de associação definidas pelas equações 10.2 e 10.3. Os parâmetros estatísticos aliados aos dois programas utilizados na determinação

Tabela 10.6 Constantes de associação globais e equilíbrios, possíveis, a elas associados para benzodiazepinas estudadas

	EQUILÍBRIOS	CONSTANTES	EQUAÇÃO
	Medazepam		
	$HG + MDZ + H^+ = HMDZ(HG)$	$\log\beta_{111} = 8,91$	10.2
	$HG + MDZ = MDZ(HG)$	$\log\beta_{110} = 2,90$	10.3
A)	$HMDZ + HG = HMDZ(HG)$	$\log K_{ass}^{HMDZ} = 2,73$	10.7
B)	$HMDZ(HG) = HMDZ(G)$	$\log K^{H}_{HMDZ(HG)} = -6,00$	10.9
	Clorodiazepóxido		
	$HG + ClDZ + H^+ = HClDZ(HG)$	$\log\beta_{111} = 7,51$	10.2
	$HG + ClDZ = HClDZ(HG)$	$\log\beta_{110} = 2,90$	10.3
	$HG + ClDZ = ClDZ(HG)$	$\log\beta_{11\text{-}1} = -7,21$	10.4
		Hipótese 1	
A1)	$HClDZ + HG = HClDZ(HG)$	$\log K_{ass}^{HClDZ} = 2,69$	10.10
B1)	$HG + ClDZ = HClDZ(HG)$	$\log\beta_{110} = 2,90$	10.3
C1)	$ClDZ(HG) = ClDZ(G)$	$\log K^{H}_{ClDZ(HG)} = -10.11$	
		Hipótese 2	
A2)	$ClDZ + H_2A = ClDZ(H_2A)$	$\log K_{ass}^{ClDZ} = 3,45$	10.12
B2)	$ClDZ(H_2A) = ClDZ(HG)$	$\log K^{H}_{ClDZ}(H_2G) = -4,61$	10.13

destas constantes melhoram significativamente pela introdução das duas constantes (para o SUPERQUAD o valor do parâmetro χ^2 passa sempre a ser da ordem dos 9,0 e para o BEST o de σ_{fit} passa da ordem das dezenas para a ordem das milésimas na maioria dos ensaios) e o erro aliado a cada uma das constantes, em cada programa é sempre inferior a 0,04.

O equilíbrio que pode estar associado ao equilíbrio descrito pela equação 10.2 (Tabela 10.6 (**A**)) prevê a existência de uma interacção entre dois grupos ionizados o que não é de estranhar dada a ordem de grandeza dos pK_a destas duas espécies em estudo, principalmente se se tiver em conta a existência de uma certa distância entre os dois grupos ionizados do GABA, e a possibilidade de existência de uma interacção iónica reforçada[4, 5] entre duas espécies ionizadas em solução. Este tipo de interacções foi recentemente verificado para os sistemas lisina/ácido succínico e lisina/ácido aspártico.[248] A introdução do equilíbrio de associação definido pela equação 10.3 estará, talvez, relacionado com a desprotonação do grupo amina do GABA, (Tabela 10.6 (**B**)), e o facto do valor desta constante de acidez revelar um carácter muito mais acídico para este grupo amina em relação ao grupo amina do GABA não associado, pode ser explicado pela formação de uma espécie neutra em solução, efeito de neutralização de carga, onde efeitos coulombicos (entalpia) e a diminuição da interacção entre a espécie ionizada e as moléculas do solvente (entropia) favorecem a sua formação.[112]

Para o sistema GABA/*clorodiazepóxido* os resultados potenciométricos obtidos, utilizando toda a gama de -log c_{H^+} varrida experimentalmente, mostram que o modelo estatisticamente mais correcto é sem sombra de dúvida o que engloba a formação das três espécies definidas pelos equilíbrios 10.2 a 10.4 (valores estatísticos idênticos aos acima referidos para o *medazepam*). Truncando os resultados experimentais para -log c_{H^+} < 6,5 só se obtinham os equilíbrios definidos pela equações 10.2 e 10.3 com o mesmo valor associado à constante de equilíbrio, mas com o erro aliado a cada constante muito menor. A aquisição de poucos pontos experimentais na zona de -log c_{H^+} entre 5 e 7 faziam diminuir significativamente o valor da constante de equilíbrio associada à equação 10.3. A simulação da curva experimental com valores de -log c_{H^+} desde 3 a 11 sem a introdução do

equilíbrio definido pela equação 10.4 mostrou uma diferença significativa entre os valores de -log c_{H^+} (exp) e -log c_{H^+} (calc), sendo este último sempre superior ao obtido experimentalmente. A introdução da segunda constante de acidez determinada potenciometricamente para o *clorodiazepóxido* não afecta significativamente os resultados aqui obtidos por isso raramente foi incluída nos modelos testados.

Considerando agora o sistema químico em estudo teremos duas hipótese sumariadas na Tabela 10.6. Verifica-se que em qualquer das hipóteses o equilíbrio associado à equação 10.4 é sem dúvida devido à desprotonação do grupo amina do GABA quando este se encontra associado ao *clorodiazepóxido* e mostra a existência de uma ligeira diminuição no carácter básico deste grupo quando associado (Tabela 10.6 (**C1**)).

A análise das duas hipóteses apresentadas para os equilíbrios associados a este sistema indica que a hipótese 1 é a mais provável. O diagrama de distribuição (Figura 10.5) mostra que a formação da espécie aassociada ao equilíbrio descrito pela equação 10.2 tem um máximo à volta de -log c_{H^+} de 4, e dado os valores dos pK_a das duas espécies em estudo é de prever que a percentagem de *clorodiazepóxido* ionizado seja superior à do GABA ionizado o que deve favorecer a formação do equilíbrio **A1** em relação ao equilíbrio definido como **A2**. Se ocorresse a formação da espécie associada a este último equilíbrio seria de prever que o valor da constante do equilíbrio **B2** fosse inferior ao calculado, isto é, o grupo carboxílico do GABA associado ao *clorodiazepóxido* deveria ter um carácter mais ácido do que o do GABA sózinho, pois a interacção N—O....NH_3^+ deveria atrair carga negativa do COO^- e facilitar a remoção do protão. Do mesmo modo, a formação de uma espécie neutra também favorece a remoção deste mesmo protão. Estas considerações favorecem a hipótese 1 como a mais provável.

Comparando os dois sistemas estudados, considerando a hipótese

1 para o sistema GABA/clorodiazepóxido como a mais plausível, tem-se que $K_A > K_{A1}$, como era de esperar dado que em **A** ocorre uma interacção iónica reforçada.[4, 5] No entanto a diferença não é significativa o que pode ser devido à existência a uma interacção entre o grupo $-NH_3^+$ do GABA e o grupo $-NHCH_3$ do *clorodiazepóxido* (Figura 4A) (vide Capítulo 1).

Os resultados obtidos por espectrofotometria são, em geral, menos precisos que os potenciométricos, dado que no primeiro caso é necessário preparar várias soluções independentes e do facto das absorvância dependerem não só das constantes de equilíbrio como também das absortividades molares das espécies que constituem um determinado modelo.

Para o sistema GABA/*medazepam* os resultados espectrofotometricos obtidos mostram um aumento de absorvância aos comprimentos de onda a que absorve a espécie MDZ, *medazepam* desprotonado, o que mostra a existência de pelo menos uma espécie que absorve aos comprimentos de onda da espécie MDZ e uma diminuição de absorvância aos comprimentos de onda a que absorve a espécie $HMDZ^+$, *medazepam* ionizado. Estas observações estão de acordo com o modelo proposto em potenciometria, isto é, as espécies associadas, apresentam ambas o grupo NH^+ do *medazepam* coordenado, logo é provavel que estas tenham um comportamento idêntico ao da espécie não ionizada. Contudo verifica-se que a aplicação directa da lei de Beer - Lambert só permite verificar a existência da espécie associada à equação 10.2 e que a utilização do programa SQUAD embora estatísticamente apresente os melhores resultados para o modelo que contém as duas constantes de associação definidas em potenciometria não permite a determinação de valores concordantes para o equilíbrio traduzido pela equação 10.3. Pode-se então concluir que espectrofotometricamente será difícil encontrar um valor preciso para a constante de associação deste último equilíbrio dada a pouca influência, nas condições experimentais usadas, que este tem na absorvância total do espectro, o que é de esperar pois

ele traduz a desprotonação de um grupo que se encontra relativamente afastado dos grupos cromóforos das benzodiazepinas.

Para o *clorodiazepóxido,* os resultados espectrofotométricos obtidos mostram, como já foi mencionado, uma diminuição da absorvância para comprimentos de onda perto do máximo da espécie HClDZ e um aumento da absorvância para comprimentos de onda perto do máximo da espécie ClDZ, o que permite afirmar que deve ocorrer a formação de uma ou mais espécies que absorvem ao comprimento de onda da espécie ClDZ, ou seja a espécie não ionizada, o que está de acordo com os modelos propostos potenciometricamente. Contudo, verifica-se que tanto a aplicação directa da lei de Beer-Lambert como a utilização do programa SQUAD apresentam resultados que indicam uma contribuição para a absorvância total idêntica para as duas espécies formadas e os valores obtidos para as constante de associação definida pela equação 10.3, são bastante precisos, o que parece implicar que este equilíbrio deve estar associado à espécie definida por **B1** e não à espécie definida por **B2.** De facto esta última está associada à libertação de um protão que se encontra relativamente afastado dos locais da molécula que absorvem aos comprimentos de onda mencionados e portanto influenciaria a absorvância global de uma maneira análoga à descrita para o equilíbrio de associação **B** do *medazepam.* A não detecção do equilíbrio traduzido pela equação 10.4 deve estar relacionada com este último aspecto focado, a concentração baixa da espécie formada e a sua baixa ou mesmo nula contribuição para a absorvância total não permitem a sua detecção espectrofotométrica, o que não acontece potenciometricamente pois está directamente relacionada com a libertação de catião hidrogénio. Os valores experimentais obtidos nos dois métodos utilizados, são relativamente concordantes para o equilíbrio definido para a equação 10.3, contudo ligeiramente diferentes para o equilíbrio definido por 10.2.

Em face dos resultados experimentais obtidos, para as várias constantes de associação consideradas, pelos dois métodos experimentais utilizados e tendo em conta as considerações atrás efectuadas pode concluir-se que:

Sistema GABA/*medazepam*

- os resultados potenciométricos garantem a formação das espécies definidas pelas equações 10.2 e 10.3
- os resultados potenciométricos e espectrofotométricos garantem a formação da espécie associada à equação 10.2 e o valor da sua constante de equilíbrio é idêntico a menos do erro experimental para os dois métodos utilizados o que permite afirmar que este é não só preciso como exacto,
- os resultados espectrofotométricos parecem indicar a formação da espécie associada à equação 10.3 mas não permitem verificar a exactidão do seu valor.

Sistema GABA/*clorodiazepóxido*

- os resultados potenciométricos garantem a formação das espécies definidas pelas equações 10.2 a 10.4
- os resultados potenciométricos e espectrofotométricos garantem a existência dos equilíbrios definidos pelas equações 10.2 e 10.3 e o valor da constante de equilíbrio da equação 10.3 é idêntico, a menos do erro experimental, para estes dois métodos utilizados o que garante a sua exactidão e permite considerar que a hipótese 1 seja a mais provável
- resultados potenciométricos e espectrofotométricos originam valores para a constante de associação definida por 10.2 ligeiramente diferentes, o que não permite afirmar qual o valor exacto desta constante.

Capítulo

11

Constantes de Formação Catião Metálico/GABA/ Benzodiazepina

Estudos biológicos efectuados sobre a actuação do GABA como neurotransmissor, e das benzodiazepinas como substâncias com acção terapêutica a nível do SNC (Capítulo 1), indicam a existência de uma relação entre a sua actividade e a presença de certos catiões metálicos divalentes.[21, 22] O GABA parece regular não só os canais de fluxo de aniões, tais como os de anião cloreto mas também os canais de fluxo de alguns catiões.[12, 16] As interacções de algumas benzodiazepinas com o seu receptor são alteradas pela presença de determinados catiões divalentes, isto é, a presença de certos catiões metálicos parece fazer aumentar a interacção benzodiazepina /receptor que por sua vez influencia as interacções do GABA com os receptores e modifica a sua acção.[12, 16, 18-20]

São poucos os estudos das interacções de catiões metálicos com o GABA e com as benzodiazepinas em solução aquosa. Este tipo de estudos pode permitir obter informações sobre a relação estrutura/actividade biológica que sirvam de orientação na preparação de novas drogas e até na elucidação dos seus mecanismos de acção. Assim, estudaram-se as interacções destas substâncias com os catiões cobre(II), zinco(II), cádmio(II) e

níquel(II).

Neste capítulo descreve-se o comportamento do GABA, em solução aquosa, com os referidos catiões e o comportamento das benzodiazepinas, *diazepam*, *medazepam* e *clorodiazepóxido*, também em solução aquosa, com os mesmos catiões metálicos. Como a maioria destes estudos foram efectuados apenas por potenciometria faz-se uma análise das constantes de formação globais em termos das constantes de formação que lhe poderão estar associadas, através da análise das intersecções que pareçam quimicamente viáveis com base na química de coordenação dos diferentes catiões metálicos estudados com ligandos com grupos dadores semelhantes. Finalmente descrevem-se os estudos efectuados para sistemas mistos GABA/ benzodiazepinas /catião metálico que foram realizados para verificar a existência, ou não, de um efeito sinérgico na interacção GABA/ benzodiazepinas mediada por catiões metálicos.

1 Constantes de formação metal/GABA

As determinações potenciométricas foram realizadas com o sistema de titulação descrito no Capítulo 7 e a calibração do sistema foi também efectuada como descrito nesse mesmo capítulo. O eléctrodo de referência foi Metrohm e os eléctrodos de vidro sensíveis ao catião hidrogénio foram Philips, Russell e Ingold.

Condições Gerais

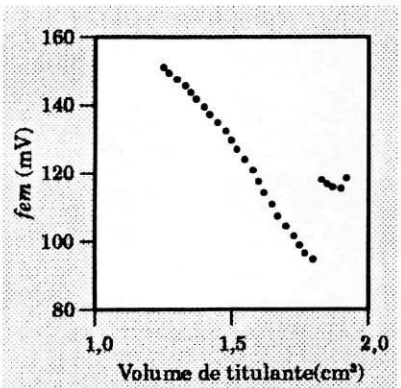
As constantes de formação do GABA com os catiões metálicos foram determinadas por titulação, sob atmosfera de azoto, de 20,00 cm^3 de HNO_3 0,1 *M* (I = 0,1 *M* NaCl; 25°C) na presença de $M(NO_3)_2$ e na presença de GABA, com NaOH≈ 0,02 *M*. As quantidades utilizadas são descritas posteriormente para cada sistema catião metálico / GABA estudado.

O cálculo das constantes de formação foram efectuados com o programa SUPERQUAD[89] e BEST,[87] com dados provenientes de mais de 20 titulações independentes, para cada catião metálico, cada uma com mais de 30 pontos experimentais e várias razões metal/ligando. Os equilíbrios de hidrólise dos diferentes catiões metálicos foram sempre considerados, o pK_{ag} (13,80) e as constantes de acidez do GABA utilizadas foram as determinadas neste trabalho (Capítulo 10).

Dada a diferença de comportamento do sistema GABA/catião cobre(II) em relação ao dos outros metais, este vai ser abordado separadamente e posteriormente far-se-á a análise dos restantes sistemas GABA/catião metálico.

GABA /COBRE(II)

As soluções preparadas contiveram sempre 1-2m*M* de HNO_3, 1-3 m*M* de catião cobre(II) e 1-5 m*M* de GABA. No entanto devido à precipitação de hidróxidos de cobre(II), bem visíveis nas curvas de titulação experimentais obtidas (ver anexo), a zona de -log c_{H^+} varrida foi de 2,8 a 6,8.



Exemplo de uma curva de titulação Cu/GABA em que ocorre precipitação dos hidróxidos de cobre

Os modelos testados com os dois programas acima mencionados englobaram os equilíbrios descritos pelas equações,

$$M + HG \rightleftharpoons MHG \qquad \beta_{110} \qquad (11.1)$$

$$M + HG \rightleftharpoons MHG + H^+ \qquad \beta_{11-1} \qquad (11.2)$$

$$M + HG \rightleftharpoons MHG + 2H^+ \qquad \beta_{11-2} \qquad (11.3)$$

$$M + 2HG \rightleftharpoons M(HG)_2 + 2H^+ \qquad \beta_{12-2} \qquad (11.4)$$

(em que os β têm o significado descrito no Capítulo 6), bem como as duas protólises do catião cobre (II) e os equilíbrios ácido/base do GABA. De referir que os equilíbrios definidos pela equações 11.1 a 11.4 , descrevem ape-

nas as possíveis constantes globais e não representam as espécies individuais que se formam.

Em qualquer uma das condições experimentais utilizadas os resultados obtidos não permitem determinar nenhuma constante de equilíbrio correspondente à equação 11.4, embora o excesso de ligando utilizado permitisse supor a sua existência. Também se verificou, que em nenhum caso, as constantes de protólise do catião cobre(II) influenciavam significativamente os resultados obtidos. Nas condições experimentais utilizadas determinaram-se sempre as constantes de equilíbrio definidas pelas equações 11.1 a 11.3 e embora para qualquer razão metal/ligando utilizada os valores de 11.1 e 11.3 se mantivessem constantes, o valor da constante associada à equação 11.2 só foi obtida para razões metal ligando superiores a 2:2, isto é concentrações iguais ou superiores a $2x10^{-3}$ *M*.

Uma análise das possíveis constantes de formação associadas às constantes globais descritas permite concluir que para a reacção definida na equação 11.1 representa a complexação do catião cobre(II) pelo GABA na sua forma de ião dipolar, isto é complexação do catião cobre(II) ao grupo carboxílico desprotonado do GABA. Os valores das constantes de equilíbrio obtidas são apresentadas na Tabela 11.1.

K_{CuHG} associados à eq. 11.2

Considerando HG como representando o GABA na forma de ião dipolar podem-se considerar dois equilíbrios diferentes associados ao equilíbrio traduzido pela equação 11.2 que são descritos como

$$Cu + HG \rightleftharpoons CuG + H^+ \qquad (11.5)$$

que engloba a formação da espécie CuG, através do equilíbrio traduzido pela equação

$$Cu + G \rightleftharpoons CuG \qquad K_{CuG}^{Cu} \qquad (11.6)$$

Tabela 11.1 **Constantes de equilíbrio globais e constantes de formação para os sistemas M^{2+} / GABA**

Metal	$\log \beta_{110}$	$\log \beta_{11-1}$	$\log K_{MG}^{M}$ [a]	$\log K_{M(OH)(HG)}^{MOH}$
Cu^{2+}	1,98+0,04	-4,82+0,05	5,62+0,07	2,63
Zn^{2+}	2,03+0,03	-6,00+0,05	4,44+0,08	2,76
Cd^{2+}	1,98+0,03	-7,54+0,07	2,90+0,10	2,45
Ni^{2+}	1,98+0,03	-6,70+0,05	3,74+0,06	3,05

a) os erros associados aos $\log K_{MG}^{M}$ são calculados como a soma dos erros das constantes que lhes dão origem. Para $\log K_{Cu(OH)(HG)}^{CuOH}$ não é possível calcular os erros pois as constantes de protonação dos catiões não são descritas com o erro a elas associado[ref].

cujo $\log K_{CuG}^{Cu} = \log \beta_{11-1} - \log K_{a_2(HG)}$, ou

$$\mathbf{Cu + HG \rightleftharpoons Cu(OH)(HG) + H^+} \qquad \mathbf{(11.7)}$$

que contem a formação da espécie Cu(OH)(HG) através do equilíbrio traduzido por

$$\mathbf{Cu(OH) + HG \rightleftharpoons Cu(OH)(HG)} \qquad K_{Cu(OH)(HG)}^{CuOH} \qquad \mathbf{(11.8)}$$

com $\log K_{Cu(OH)(HG)}^{CuOH} = \log \beta_{11-1} - \log K_{CuOH}^{Cu}$. A existência deste equilíbrio é proposta dado que na zona de - $\log c_{H^+}$ em que o equilíbrio descrito pela equação 11.2 existe, as espécies em maior abundância são o GABA na forma de ião dipolar, HG, e a espécie $Cu(OH)^+$. Os valores associados a estas constantes de formação encontram-se descritos na Tabela 11.1 conjuntamente com os obtidos para os outros catiões metálicos.

K_{CuHG} associados a 11.3

As constantes de equilíbrio parciais associadas ao equilíbrio traduzido pela equação 11.3 podem ser descritas como:

$$Cu + HG \rightleftharpoons Cu(OH)(G) + 2H^+ \qquad (11.9)$$

equilíbrio que englobaria a primeira protólise do catião cobre(II) e a sua complexação ao GABA desprotonado

$$Cu(OH) + G \rightleftharpoons Cu(OH)(G) \qquad K^{CuOH}_{Cu(OH)(G)} \qquad (11.10)$$

com $\log K^{CuOH}_{Cu(OH)(G)} = \log \beta_{11\text{-}1} - \log K_{a_2(HG)} - \log K^{Cu}_{CuOH}$ ou

$$Cu + HG \rightleftharpoons Cu(HG)(OH)_2 \qquad (11.11)$$

cuja constante de formação englobaria a segunda protólise do catião cobre (II) e

$$Cu(OH)_2 + HG \rightleftharpoons Cu(OH)_2(HG) \qquad K^{Cu(OH)_2}_{Cu(OH)_2(HG)} \qquad (11.12)$$

com $\log K^{Cu(OH)_2}_{Cu(OH)_2(HG)} = \log \beta_{11\text{-}2} - \log K^{Cu}_{Cu(OH)_2}$. Em anexo encontram-se os valores associados a estas constantes de formação.

Valores das constantes de equilíbrio associadas aos equilíbrios definidos pelas equações 11.10 e 11.12

$\log K^{CuOH}_{Cu(OH)(G)}$	$\log K^{Cu(OH)_2}_{Cu(OH)_2(HG)}$
6,84	2,62

Diagramas de distribuição

O diagrama de distribuição obtido mostra (Figura 11.1) que a formação da espécie CuHG é máxima (30%) para valores de -log c_{H^+} de 5 onde começa a formação da espécie $Cu(HG)H_{-1}$, cuja formação é máxima (11%) a -log c_{H^+} de 6,7 e a espécie $Cu(HG)H_{-2}$ começa a formar-se à volta de -log c_{H^+} de 5,8 e atinge 70% da concentração de cobre total a -log c_{H^+} de 6,6. O que se verifica na figura 11.1B, em que se introduziu, nos diagramas de ditribuição os equilíbrios de protólise do catião cobre(II), é que a sua zona de formação e a das espécies complexantes que se formaram são as mesmas.

GABA /Zn, Cd e Ni (II)

As soluções utilizadas contiveram 1-2m*M* de HNO_3 *M*, 1-5 m*M* de GABA e 1-10 m*M* de catião divalente. As zonas de -log c_{H^+} utilizadas foram 3,0 a

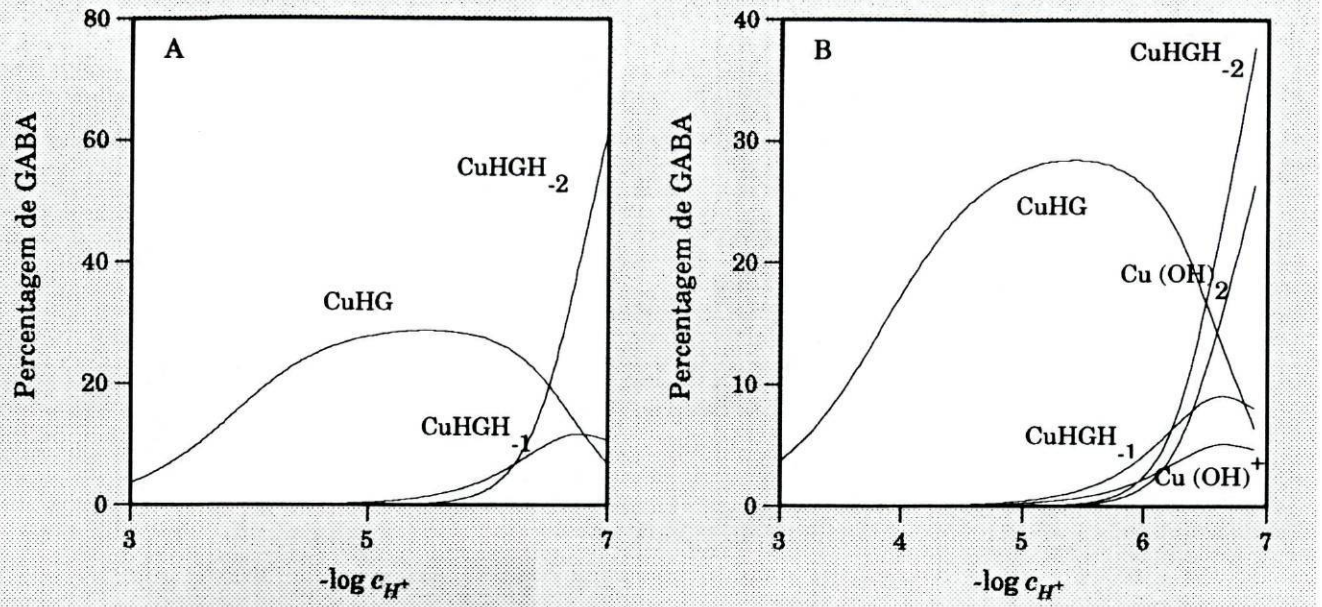


Figura 11.1 **Diagramas de distribuição do sistema cobre(II)/GABA: A— $2x10^{-3}M$ Cu^{2+} e $5x10^{-3}M$ GABA; B—$1x10^{-3}M$ Cu^{2+}e $2x10^{-3}M$ GABA incluindo os hidróxo complexos de Cu^{2+}**

7,8 para o catião zinco(II), 3,0 a 8,7 para o catião cádmio(II) e 3,0 a 9,0 para o catião níquel(II) devido à precipitação dos respectivos hidróxidos.

A comparação das curvas de titulação obtidas para o GABA e para o GABA/catião metálico mostram um aumento da concentração de catião hidrogénio livre em toda a gama de -log c_{H^+} estudada, o que indica a formação de espécies que coordenam nos locais de protonação. Assim sendo, os modelos testados englobaram os equilíbrios descritos pelas equações 11.1, 11.2 e 11.4.

Equilíbrios encontrados

Para todos os sistemas catião metálico/GABA verificou-se a formação das espécies MHG (equação 11.1), para razões metal/ligando iguais ou superio-

res a 2:2 e inferiores a 2:5, no entanto para o sistema catião cádmio(II)/ GABA a precisão foi baixa. Em nenhum dos casos foi possível obter a constante de formação descrita pela equação 11.4. Para o equilíbrio associado à equação 11.2 obteve-se sempre uma constante de equilíbrio global que pode estar associada à constante de formação que advem do equilíbrio traduzido pela equação

$$M + G \rightleftharpoons MG \qquad K^{M}_{MG} \qquad 11.13$$

em que $\log K^{M}_{MG} = \log \beta_{11-1} - \log K_{a_2(HG)}$, ou à constante de formação parcial que advem do equilíbrio traduzido por

$$M(OH) + HG \rightleftharpoons M(OH)HG \qquad K^{MOH}_{M(OH)(HG)} \qquad 11.14$$

em que $\log K^{MOH}_{M(OH)(HG)} = \log \beta_{11-1} - \log K^{M}_{MOH}$, pois tal como para o catião cobre(II), na zona de formação deste equilíbrio as espécies que existem em maior abundância são HG e $M(OH)^+$.

Os valores obtidos para estas constantes (Tabela 11.1) foram idênticos para o programa SUPERQUAD e BEST, no entanto os parâmetros estatísticos (Capítulo 6) associados a este último são superiores aos esperados, principalmente para razões metal/ligando superiores a 2:4. Estes valores devem estar relacionados com a função utilizada pelo programa BEST para a determinação de pesos que à partida iriam minimizar os erros das leituras efectuadas junto de pontos de equivalência (Capítulo 6), e não com um erro no modelo proposto para os sistemas em estudo, pois os resultados obtidos pelo programa SUPERQUAD, que também utiliza uma função peso, fornece resultados excelentes para todos os resultados experimentais com razão metal /ligando superior a 2:4.

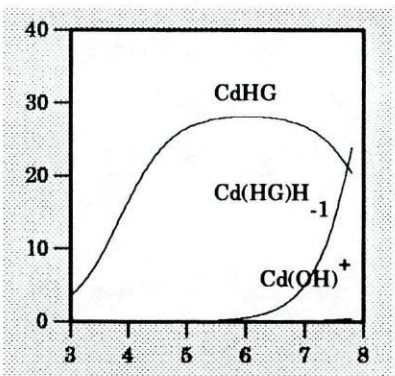


Diagrama de distribuição para o sistema Cd/GABA; $2x10^{-3}$M Cu^{2+}/ $5x10^{-3}$M GABA

Os diagramas de distribuição obtidos (Figura 11.2) mostram a formação da espécie M(HG) é máxima (30% para M/L 2/5) para valores de

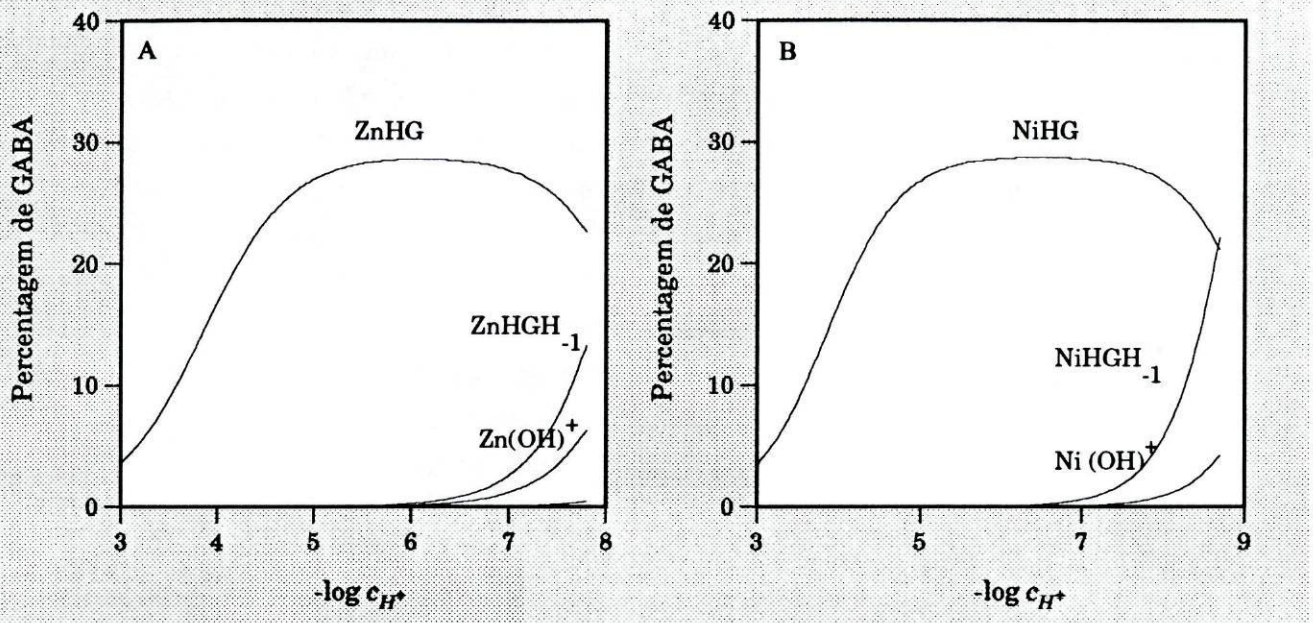


Figura 11.2 Diagramas de distribuição dos sistemas: A—Zinco(II)/GABA, $2x10^{-3}M$ Zn^{2+}/ $4x10^{-3}M$ GABA; B — Níquel(II)/GABA, $2x10^{-3}M$ Zn^{2+}/ $5x10^{-3}M$ GABA

-log c_{H^+} perto de 5 e de uma espécie $M(HG)H_{-1}$ para valores de -log c_{H^+} perto de 5,5 para o catião zinco(II) e cádmio (II) e valores de -log c_{H^+} perto de 6 para o catião níquel(II).

2 Constantes de formação metal/benzodiazepinas.

As determinações potenciométricas foram efectuadas como já descrito para as constantes de formação do GABA com catiões metálicos. As constantes de formação das benzodiazepinas com os catiões metálicos foram determinadas por titulação de 20,00 cm^3 de HNO_3 0,1 *M* (I = 0,1 *M* NaCl; 25°C) na presença de $M(NO_3)_2$ e na presença de benzodiazepina, com NaOH

Foram efectuados alguns estudos potenciométricos Cu(II)/benzodiazepinas com a utilização simultânea de um eléctrodo sensível a catião cobre(II) e de um eléctrodo sensível ao catião hidrogénio, mas a força iónica das soluções foi ajustada com $NaClO_4$ 0,1*M*, dada a interferência do anião cloreto no funcionamento dos eléctrodos sensíveis a catião cobre(II). Os resultados obtidos foram no entanto idênticos aos obtidos apenas com os eléctrodos sensíveis a catião hidrogénio

≈0,02 *M*, sob atmosfera de azoto. As quantidades utilizadas são descritas posteriormente para cada sistema catião metálico/benzodiazepina estudado. Os cálculos das constantes 1de formação foram efectuados com os dois programas já mencionados para o sistema GABA/catiões metálicos com dados provenientes de mais de 40 titulações independentes (dado as baixas concentrações utilizadas das benzodiazepinas), para a maioria dos catiões metálicos, cada uma com mais de 35 pontos experimentais e várias razões metal/ligando. Os equilíbrios de hidrólise dos diferentes catiões metálicos foram sempre considerados, o pK_{ag} utilizado foi de 13,80. As constantes de acidez das benzodiazepinas utilizadas foram as determinadas neste trabalho para soluções aquosas por potenciometria(Capítulo 9).

Diazepam

As constantes de formação foram calculadas a partir de dados obtidos da titulação de soluções com 1-2 m*M* de HNO_3 *M*, 0,5-0,8 m*M* de *diazepam* e 0,8-4 m*M* para o catião catião cobre(II), 1m*M*-10m*M* para o catião zinco(II), 1-20 m*M* para o catião cádmio(II) e 1-20 m*M* para o catião níquel(II). A zona de - log c_{H^+} utilizada para todos os catiões foi de 3 a 4,5 pois acima destes valores ocorria precipitação de *diazepam*. O modelo de cálculo utilizado envolveu o equilíbrio

$$\mathbf{M + DZP \rightleftharpoons M(DZP)} \qquad \beta_{110} \qquad \mathbf{11.15}$$

bem como as protólises dos diferentes catiões metálicos e as constantes de acidez do *diazepam*. As constantes obtidas para os diferentes catiões encontram-se sumariadas na Tabela 11.2 , no entanto não foi nunca possível determinar constantes de formação para o catião níquel, nas condições experimentais utilizadas. Na Figura 11.3 encontram-se os diagramas de distribuição obtidos para os diferentes sistemas M^{2+} / DZP. Embora a zona de -log c_{H^+} utilizada seja restrita, devido à precipitação de *diazepam*, ela é su-

Tabela 11.2 **Constantes de equilíbrio globais e constantes de formação a elas associadas para os sistemas M^{2+}/ benzodiazepina**

Metal	$Log\beta_{110}$	$log\beta_{11-1}$	$^{a}log\ K^{M(OH)}_{M(OH)BZP}$
	DIAZEPAM		
Cu^{2+}	2,19±0,02		
Zn^{2+}	1,82±0,04		
Cd^{2+}	1,40±0,05		
	MEDAZEPAM		
Cu^{2+}	2,91±0,03	-3,45±0,05	4,00
Zn^{2+}	2,19±0,05		
Cd^{2+}	1,25±0,08		
	CLORODIAZEPÓXIDO		
Cu^{2+}	1,87±0,04	-3,68±0,03	3,77
Zn^{2+}	1,25±0,06	-5,80±0,06	2,94

a) ver nota Tabela 11.1

perior à utilizada para a determinação da constante de acidez desta substância (Capítulo 9) o que à partida mostra a existência de uma interacção em solução. Pelos diagramas de distribuição também se pode verificar que a formação máxima dos complexos deve ocorrer para valores de - log c_{H^+} = 4,5 o que permite afirmar que os valores experimentais de - log c_{H^+} utilizados para a determinação das constantes de formação, englobam uma zona da curva de titulação em que a formação do complexo é significativa.

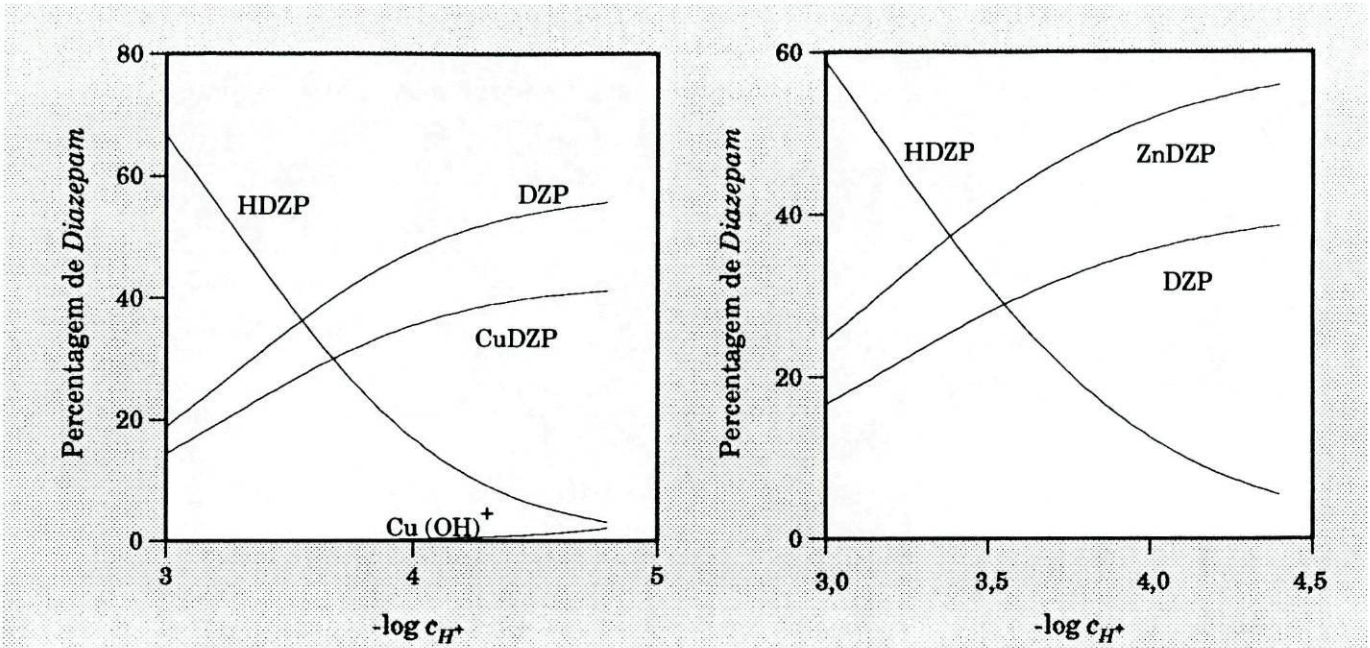


Figura 11.3 **Diagramas de distribuição dos sistemas: A— Cobre(II)/*diazepam*, $4x10^{-3}M$ Cu^{2}/ $6x10^{-4}M$ *diazepam*; B — Zinco(II)/*diazepam*, $1x10^{-3}M$ Zn^{2+}/ $7x10^{-4}M$ *diazepam***

$\beta_{110} = (K'_a - K_a) / (K_a * | M^{2+} |_t)$

$pKa' = 3.43 \pm 0,05 \quad \beta_{110} = 1,36 \pm 0,10$

Aplicação da equação 8.6 ao sistema Cd^{2+}/*diazepam*

A equação 8.6 foi também utilizada para determinar a constante de formação do catião cádmio com o *diazepam* e verificou-se que o valor obtido era idêntico ao determinado com os programas de cálculo utilizados, embora a sua precisão fosse menor.

Medazepam

As constantes de formação foram calculadas para dados obtidos da titulação de soluções com 1-2 m*M* de HNO_3 *M*, 0,5-1 m*M* de *medazepam* e 0,8-4 m*M* para o catião cobre(II), 1m*M*-10m*M* para o catião zinco(II), 1-20 m*M* para o catião cádmio(II) e 1-10 m*M* para o catião níquel(II). A zona de - log c_{H^+} utilizada para o catião cobre(II) e zinco(II) foi de 3 a 7 e para os catiões cádmio(II) e níquel(II) foi de 3 a 6,8, pois acima destes valores ocorria precipitação de *medazepam*.

Os modelos de cálculo utilizados envolveram os equilíbrios definidos por

$$M + MDZ \rightleftharpoons M(MDZ) \qquad \beta_{110} \qquad (11.16)$$

$$M + MDZ \rightleftharpoons M(MDZ) + H^+ \qquad \beta_{11-1} \qquad (11.17)$$

bem como as protólises dos diferentes catiões metálicos e as constantes de acidez do *medazepam*.

Para o catião cobre(II) verificou-se existência destes dois equilíbrios, mas para os restantes catiões só se verificou o equilíbrio definido pela equação 11.14.

O equilíbrio definido pela equação 11.15 corresponde ao equilíbrio traduzido por

$$Cu + MDZ \rightleftharpoons Cu(MDZ)(OH) + H^+ \qquad (11.18)$$

que engloba o equilíbrio traduzido por

$$Cu(OH) + MDZ \rightleftharpoons Cu(MDZ)(OH) \qquad K^{CuOH}_{Cu(OH)(MDZ)} \qquad (11.19)$$

cuja constante de formação é dada por $\log K^{CuOH}_{Cu(OH)(MDZ)} = \log \beta_{11-1} - \log K^{Cu}_{CuOH}$.

Esta constante de equilíbrio foi obtida para resultados experimentais em que a razão catião cobre(II)/MDZ foi sempre superior a 2,5:1 pois com os resultados obtidos nas outras condições experimentais não foi possível obter valores concordantes para esta constante.

Para os outros catiões (excepto para o catião níquel para o qual, tal como no caso do *diazepam*, não foi possível determinar nenhuma constante de formação) verificou-se apenas a existência da reacção definida pela equação 11.14 e os valores obtidos encontram-se sumariados na Tabela 11.2. Na Figura 11.4 estão representados os diagramas de distribuição

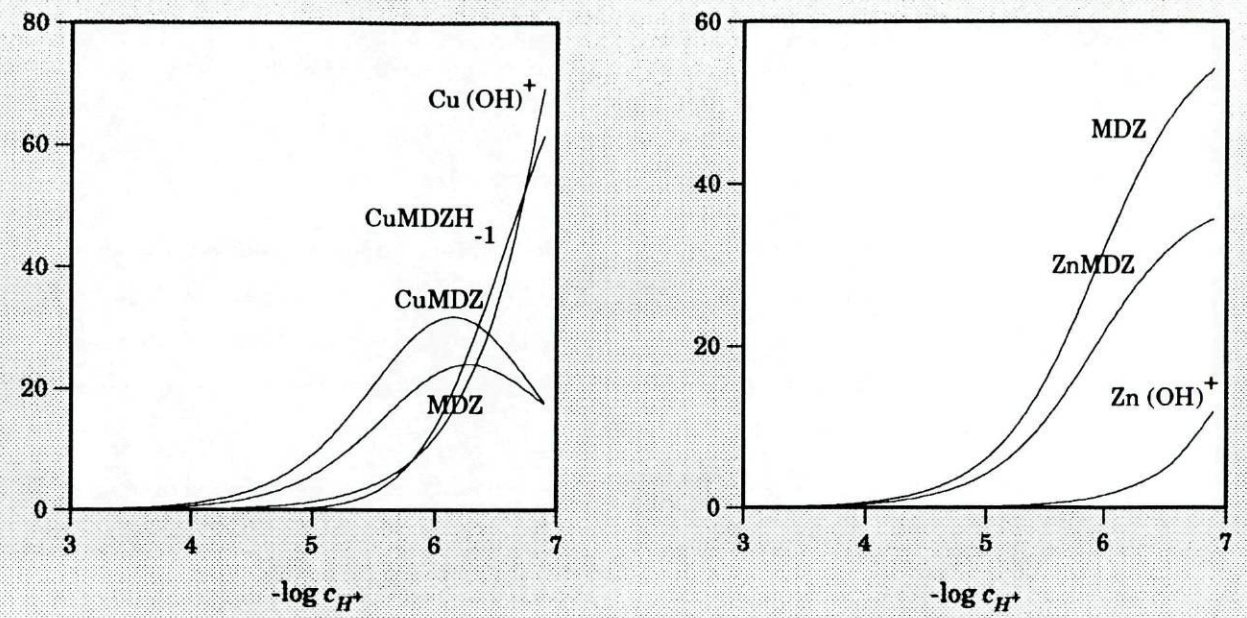


Figura 11.4 **Diagramas de distribuição dos sistemas: A— Cobre(II)/*medazepam*, 2x10^{-3}*M* Cu^{2+}/ 9x10^{-4}*M* *medazepam*; B— Zinco(II)/*medazepam*, 9x10^{-3}*M* Zn^{2+}/ 9x10^{-4}*M* *medazepam***

dos sistemas estudados. Em qualquer dos casos a formação dos complexos só começa a ocorrer para valores de - logc_{H^+} perto de 4 sendo a sua formação máxima à volta de - logc_{H^+} de 5,8. A formação do complexo $CuMDZH_{-1}$ para o sistema de catião cobre(II) começa a ocorrer para valores de -logc_{H^+} perto de 5.

Clorodiazepóxido

As constantes de formação foram calculadas para dados obtidos da titulação de soluções com 1-2 m*M* de HNO_3, 0,5-1,2 m*M* de *clorodiazepóxido* e 0,8 -4 m*M* para o catião catião cobre(II), 1mM - 10mM para o catião zinco(II), 1-20 mM para o catião cádmio(II) e 1-20 mM para o cati-

ão níquel(II). A zona de - log c_{H^+} utilizada foi de 3 a 6,5 para o catião cobre(II) e de 3 a 8 para os restantes catiões.

O modelo de cálculo utilizado foi igual ao do *medazepam*. Para o catião cobre(II) e zinco(II) verificou-se a existência dos equilíbrios traduzidos por

$$M + ClDZ \rightleftharpoons M(ClDZ) \qquad \beta_{110} \qquad (11.20)$$

$$M + ClDZ \rightleftharpoons M(ClDZ) + H^+ \qquad \beta_{11-1} \qquad (11.21)$$

em que este segundo corresponde a

$$M(OH) + ClDZ \rightleftharpoons M(ClDZ)(OH) \qquad K^{MOH}_{M(OH)(ClDZ)} \qquad 11.22$$

cuja constante de formação é dada por $\log K^{MOH}_{M(OH)(ClDZ)} = \log \beta_{11-1} - \log K^{M}_{MOH}$.

Para os restantes catiões não foi possível obter nenhuma constante de formação. Na Tabela 11.2 encontram-se os valores obtidos para as constantes globais e constantes de formação para estes sistemas.

3 Análise dos resultados obtidos para as espécies binárias

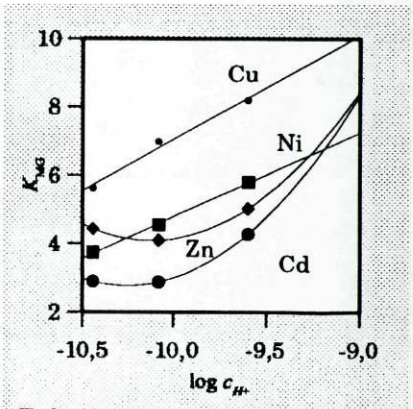
GABA

Tentou-se determinar espectrofotometricamente as constantes de formação para os sistema metal/GABA, contudo para nenhum sistema foi possível obter valores para estas constantes. Os espectros obtidos para o sistema catião cobre(II)/GABA em meio ácido e em meio alcalino foram sempre completamente sobreponíveis com os obtidos apenas para o catião cobre nas mesmas condições.

Com base nos resultados potenciométricos conclui-se que para todos os sistemas metal/GABA o modelo que melhor se ajusta aos resultados obtidos indica a formação da espécie MHG, para todos os sistemas, verifi-

cando-se que a sua inclusão melhora significativamente os valores dos parâmetros estatísticos calculados nos programas SUPERQUAD e BEST, embora a sua percentagem de formação não ultrapasse os 30% da quantidade total de GABA em solução. Este tipo de espécie não é detectada para a maioria dos aminoácidos naturais estudados[210, 246] o que está de acordo com a ordem de grandeza das suas constantes de acidez, (Capítulo 10, pK_{a1}) que são 1 a 1,5 unidades de pK inferiores às do GABA. Contudo, para o ácido 6–aminohexanóico, cujo pK_{a1} = 4,33 detectou-se a formação de CuHH (sendo HH o ácido 6–aminohexanóico na sua forma de ião dipolar) com uma constante de formação de 1,76.[210]

Dado só ser possível obter valores para as constantes de equilíbrio globais, não se pode afirmar inequivocamente se a formação das espécies $M(HG)H_{-1}$ está associada à formação da espécie MG, ou à formação da espécie M(HG)(OH).



Relação entre o pK_a do grupo amina do GABA, glicina e β–alanina e as constantes de formação das espécies MG.

Considerando a formação da espécie MG os valores obtidos para as constantes de formação para os sistemas M^{2+}/GABA obtidos neste trabalho são comparados, na tabela 11.3, com valores obtidos para a constante de formação de aminoácidos alifáticos (com cadeias menores entre os dois grupos com caracter ácido/base) com os mesmos catiões metálicos.[246] Verifica-se, não só para estes aminoácidos como para os aminoácidos no geral[210], que a tendência de coordenação do seu grupo amina costuma seguir a seguinte ordem $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+}$, que não é verificada nos resultados experimentais obtidos.

Considerando que a estabilidade dos complexos formados, MG, é ditada apenas pela basicidade do grupo amina é de esperar uma relação linear entre o pK_a deste grupo e as constantes de formação de um conjunto de complexos com ligandos estruturalmente relacionados.[118] A comparação dos resultados obtidos para as constantes de formação das espécies

Tabela 11.3 Constantes de formação MG, para o GABA[a], glicina[b] e β–alanina[b]

Aminoácido	NiG	CuG	ZnG	CdG
Glicina	5,80	8,20	5,03	4,28
β–alanina	4,55	6,98	4,10	2,88
GABA	3,74	5,62	4,44	2,90

a) Este trabalho; b) Referência 246

MG com as espécies correspondentes para a glicina e para β–alanina, mostram a existência de uma relação linear apenas para as constantes de formação obtidas para os catiões cobre(II) e níquel(II) (ver figura em anexo) e os valores obtidos para estas duas constantes de formação são da ordem de grandeza das descritas na literatura.[246]

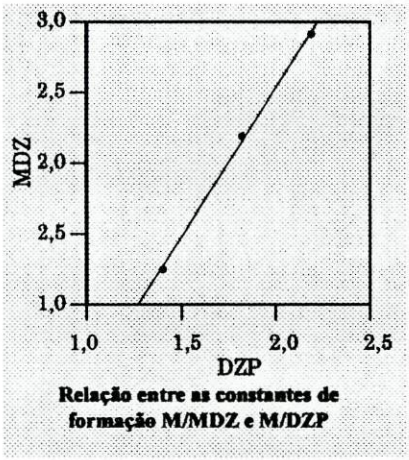
O diferente comportamento do sistema zinco(II)/GABA em relação ao que era esperado pelos resultados existentes para outros aminoácidos, pode provir da ordem de grandeza do valor da constante de formação do seu hidroxocomplexo o que pode provocar a formação de hidroxo-complexos Zn^{2+}/(OH)/GABA ou impedir a determinação correcta do valor da constante de formação da espécie ZnG. No entanto os resultados experimentais obtidos neste trabalho não permitem tirar nenhuma conclusão objectiva sobre estes equilíbrios.

Verifica-se que quanto mais ácido o catião metálico maior é a constante de formação da espécie $MHGH_{-1}$ o que torna improvável que no equilíbrio associado à reacção traduzida pela equação 11.2 esteja associada a formação de espécies M(OH)(HG). Em termos experimentais verificou-se que ocorria precipitação a $-\log c_{H^+} \approx 7,8$ para os sistemas Zn^{2+}, Cd^{2+}/GABA,

mas não para o sistema Ni^{2+}/GABA. Este facto evidencia que os valores obtidos para as constantes β_{11-1} para os dois primeiros sistemas mencionados estejam afectados de erro dada a zona de -log c_{H^+} que pode ser utilizada para a determinação destas constantes.

Benzodiazepinas

Para as constantes de formação do *diazepam* e do *medazepam*, MBZP, verifica-se uma relação linear entre elas o que mostra que a tendência de coordenação é a mesma nos dois casos embora as constantes de formação M/*diazepam* sejam sempre inferiores às constantes de formação M/*medazepam* o que está relacionado com os valores das correspondentes constantes de acidez, e está de acordo com a ordem de grandeza das constantes obtidas para aminas aromáticas.[249] A constante de formação CdDZP só foi obtida para soluções com concentração de metal 10 a 20 vezes superior à do *diazepam* o que permitiu a aplicação da equação 8.6 obtendo-se o valor de 1,36±0,10 para esta constante. Este valor é concordante com o obtido pelos programas SUPERQUAD e BEST, embora a sua dispersão seja maior, tal como já verificado na aplicação desta mesma fórmula ao sistema M/citidina (vide Capítulo 8).



Relação entre as constantes de formação M/MDZ e M/DZP

Para o *clorodiazepóxido* só se obtiveram constantes de formação MClDZ para os catiões cobre(II) e zinco(II) e estas são, como era de esperar, mais baixas do que as obtidas para as benzodiazepinas anteriores. Qualquer um dos catiões mencionados pode ser considerado um ácido de Lewis intermédio, enquanto o catião cádmio é considerado ácido de Lewis macio, assim sendo, a coordenação deste último a átomos coordenadores O, base de Lewis mais dura do que o atomo de azoto N, ácido de Lewis intermédio, será difícil o que justifica a não formação da espécie CdClDZ. Este mesmo carácter justifica a menor estabilidade dos complexos MClDZ em

relação ao complexos MMDZ e MDZP. O facto de se obter apenas a formação da espécie $ZnClDZH_{-1}$ advém da maior solubilidade do *clorodiazepóxido* em relação às outras benzodiazepinas o que permitiu o estudo dos equilíbrios em solução a valores de - log c_{H^+} mais alcalinos.

4 Constantes de formação Metal/GABA/benzodiazepinas

As determinações potenciométricas foram efectuadas de modo idêntico ao descrito para os sistema simples e as constantes de complexação dos sistemas ternários foram determinadas por titulação, sob atmosfera de azoto, de 20,00 cm^3 de HNO_3 0,1 *M* (I = 0,1 *M* NaCl; 25°C) na presença de $M(NO_3)_2$, GABA e benzodiazepina, com NaOH ≈ 0,02 *M*. O cálculo das constantes de formação foi efectuado também com os dois programas já mencionados, com dados provenientes de mais de 30 titulações para cada sistema catião metálico/GABA/benzodiazepina cada uma com mais de 35 pontos experimentais e várias razões metal/GABA. Em todos os cálculos foram considerados os equilíbrios de hidrólise dos catiões metálicos, as constantes de acidez das benzodiazepinas e do GABA determinadas neste trabalho (Capítulo 9, 10), as constantes de associação GABA/ benzodiazepinas (Capítulo 10) e as constantes de formação anteriormente descritas.

O modelo de cálculo utilizado envolveu, além dos equilíbrios já descritos, os equilíbrio traduzidos por

$$\mathbf{M + HG + BZP + H^+ \rightleftharpoons M(HG)(HBZP)} \qquad \beta_{1111} \qquad \textbf{(11.23)}$$

$$\mathbf{M + HG + BZP \rightleftharpoons M(HG)(BZP)} \qquad \beta_{1110} \qquad \textbf{(11.24)}$$

$$\mathbf{M + HG + BZP \rightleftharpoons M(HG)(BZP) + H^+} \qquad \beta_{111-1} \qquad \textbf{(11.25)}$$

As soluções preparadas contiveram sempre 1-2m*M* de HNO_3, 1-3 m*M* para

Tabela 11.4 **Constantes de formação globais e Δlog *K* obtidas para os sistemas ternários M^{2+}/GABA/BZP**

Metal	$\log \beta_{111\theta}$	Δlog *K*	$\log \beta_{111\text{-}1}$	Δlog *K*
		Medazepam		
Cu^{2+}	6,71±0,07	1,82±0,14		
Zn^{2+}			-2,05±0,10	1,75±0,26
		Clorodiazepóxido		
Cu^{2+}	5,60±0,08	1,75±0,16		
Zn^{2+}			-3,00±0,12	1,77±0,30

o catião cobre(II), 1-10 m*M* para o catião zinco(II), 1-20 m*M* para o catião cádmio(II), e 1-5 m*M* de GABA e 0,5-1,0 m*M* de *medazepam* ou *clorodiazepóxido*. A zona de - log c_{H^+} utilizada foi de 3,0 a 7,0 para o *medazepam*, pois acima destes valores ocorria precipitação de *medazepam* e de 3,0 a 10,0 para o *clorodiazepóxido* excluíndo com o catião cobre(II) pois ocorria precipitação neste último.

Para os sistemas GABA/BZP com catião cobre(II) obteve-se o equilíbrio descrito pela equação 11.24 e para o sistema GABA/BZP com catião zinco(II) obteve-se o equilíbrio descrito pela equação 11.25, não tendo sido possível, nas condições experimentais utilizadas, determinar nenhum equilíbrio associado ao sistema GABA/BZP com catião cádmio(II).

Tal como nos casos anteriores as constantes de formação obtidas são constantes de equilíbrio globais e a análise das constantes de formação que lhes poderão estar associadas não é linear. Contudo, considerando a existência dos complexos binários definidos pelos equilíbrios traduzidos

pelas equações 11.1, para o catião cobre(II)/GABA, e 11.13 para o catião zinco(II)/GABA e a existência das espécies M^{2+}/BZP, a formação dos complexos ternários, M^{2+}/GABA/BZP, pode ser quantificada com base em $\Delta \log K$ (Capítulo 5, equação 5.3) com

$$\Delta \log K = \log K^{Cu(BZP)}_{Cu(BZP)(HG)} - \log K^{Cu}_{Cu(HG)} \qquad (11.26)$$

para o catião cobre(II) e

$$\Delta \log K = \log K^{Zn(BZP)}_{Zn(BZP)(G)} - \log K^{Zn}_{Zn(G)} \qquad (11.27)$$

para o catião zinco(II), cujos valores estão sumariados na tabela 11.3, para ambas as benzodiazepinas estudadas. Os valores de ΔlogK obtidos neste trabalho são sempre positivos e bastante superiores aos valores tradicionais obtidos na literatura (ver capítulo 5). No entanto, Bhattacharya *et al*[146] estudaram as possíveis interacções entre vários dipéptidos e aminoácidos e obtiveram valores de $\Delta \log K$ para os sistemas que continham zinco(II)/aminoácidos aromáticos/dipéptidos da ordem de grandeza dos deste trabalho, o que atribuem à existência simultânea de mais do que uma interacção intramolecular entre os ligandos.

Os valores positivos de $\Delta \log K$ estão, normalmente, associados à existência de efeitos de retrodoacção p e/ou de interacções intermoleculares entre os ligandos, o que promove a formação dos complexos ternários em relação aos complexos binários. Contudo, mesmo admitindo a hipótese de vários efeitos cooperativos, simultâneos, entre os ligandos é difícel explicar os valores de $\Delta \log K$ anormalmente altos obtidos neste trabalho. A maioria dos estudos efectuados sobre a formação de complexos ternários, ligando$_1$/ M^{n+}/ligando$_2$, em que se exprime a estabilidade relativa destes complexos com base em $\Delta \log K$ incide sobre ligandos cuja interacção em solução é apenas promovida pela presença do catião metálico e que

não interactuam ou praticamente não interactuam, quando sózinhos em solução. Este facto não é aplicável aos ligandos aqui estudados, pois como se verificou no Capítulo 10, as interacções GABA/*medazepam* e GABA/*clorodiazepóxido* são bastante significativas e os valores obtidos para as constantes de associação destes sistemas são da ordem de grandeza dos valores obtidos para as constantes de formação M^{2+}/GABA ou M^{2+}/benzodiazepina.

Assim sendo, será de considerar além da hipótese de formação de complexos ternários GABA/M^{2+}/BZP, em que a interacção GABA/BZP é promovida pelo catião metálico, a formação de complexos M^{2+}/BZP—GABA em que as interacções BZP—GABA serão as descritas no Capítulo 10. Então, para os sistemas Cu^{2+}/GABA/BZP ter-se-à o equilíbrio traduzido por

$$\mathbf{Cu + BZP—HG = CuBZP—HG} \qquad K^{Cu}_{Cu(BZP-HG)} \qquad \mathbf{(11.28)}$$

associado ao equilíbrio traduzido pela reacção 11.23. Para os sistemas Zn^{2+}/GABA/BZP a reacção associada ao equilíbrio traduzido pela equação deve estar associada à formação de hidroxocomplexos de zinco(II) segundo a reacção traduzida pela equação

$$\mathbf{Zn(OH) + BZP—HG = Zn(OH)(BZP—HG)} \quad K^{Zn(OH)}_{Zn(OH)(BZP-HG)} \mathbf{(11.29)}$$

associado ao equilíbrio traduzido pela reacção 11.24.

A análise do diagrama de distribuição para o sistema Cu^{2+}/GABA/MDZ mostra que o equilíbrio global descrito pela equação 11.23 forma-se numa zona de - log c_{H+} entre 4,0 e 6,5, com um máximo a -log $c_{H+}\approx$ 6 (Figura 11. A). O diagrama de distribuição para o sistema Cu^{2+}/GABA/ClDZ mostra que o equilíbrio global descrito pela equação 11.23 ocorre numa zona de - log c_{H+} entre 3,5 e 6,5, com um máximo a - log $c_{H+}\approx$5,5 (Figura 11. B).

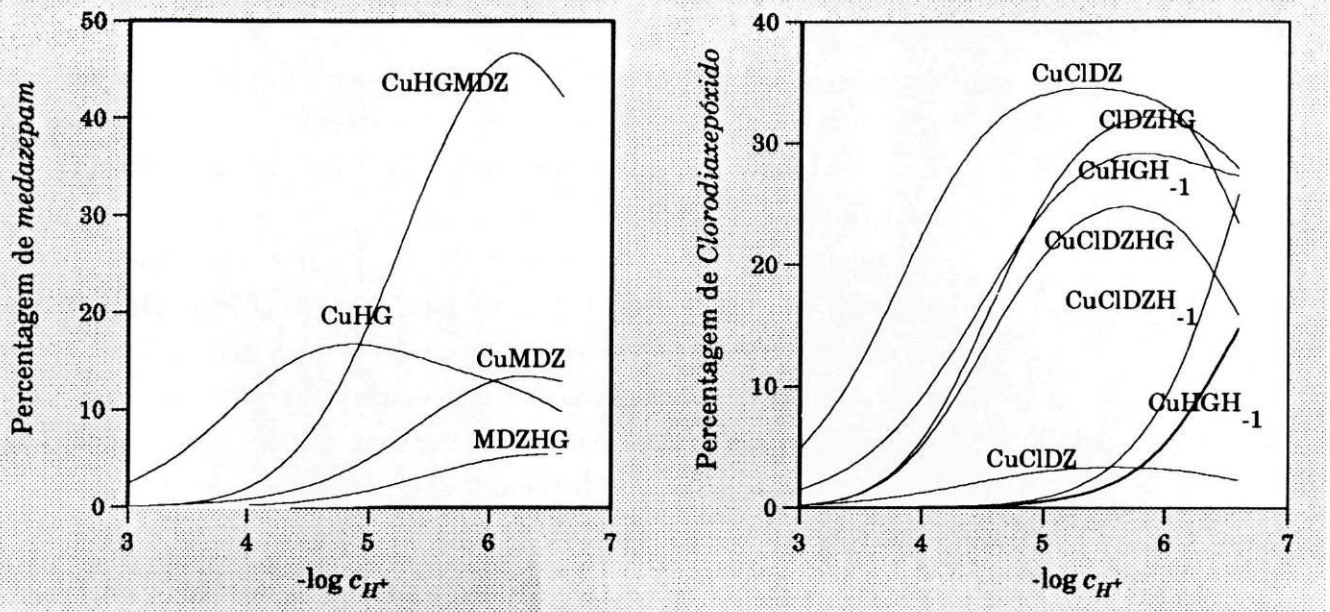


Figura 11.5 **Diagramas de distribuição dos sistemas: A— Cobre(II)/*medazepam*/*GABA*, $2x10^{-3}M$ Cu^{2+}/ $9x10^{-4}M$ *medazepam*/ $2x10^{-3}M$ *GABA*; B — Cobre(II)/*clorodiazepóxido*/ *GABA*, $2x10^{-3}M$ Cu^{2+}/ $9x10^{-4}M$ *clorodiazepóxido*/$2x10^{-3}M$ *GABA***

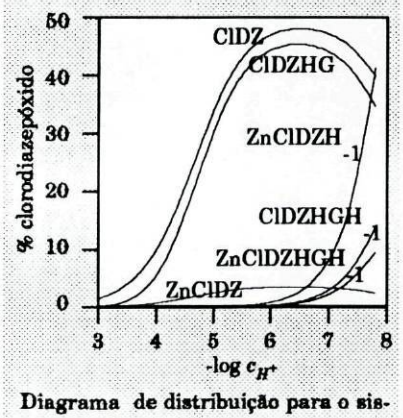
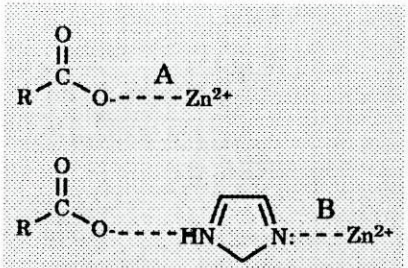


Diagrama de distribuição para o sistema Zn^{2+}/GABA/*clorodiazepóxido*

Para os sistemas Zn^{2+}/GABA/BZP as constantes do equilíbrio descrito pela equação 11.24 implicam uma percentagem de formação muito baixa e começam a ocorrer em ambos os sistemas numa zona de -log $c_{H+} \approx 6{,}0$. Em anexo encontra-se o diagrama de distribuição para o sistema Zn^{2+}/GABA/ClDZ. Os resultados obtidos para estes sistemas não parecem ser muito conclusivos e os equilíbrios descritos pela equação 11.24 associados a estes sistemas ocorrem numa zona de -log c_{H+} onde começa a ocorrer precipitação, pelo que não parece possível garantir a precisão dos valores das constantes obtidas.

Análise dos resultados obtidos

A obtenção de valores elevados para Δlog K foi verificada no estudo dos sitemas cádmio(II)/vitamina D_3/aminoácidos, no entanto a sua ocorrência foi explicada pela facto de os valores das constantes de equilíbrio dos complexos binários M(vitamina $D_3)_2$ ou M(aminoácido)$_2$, valores também obtidos pelos autores, serem indicativos da existência de ligações intramoleculares ligando/ligando.[250] Bhattacharya *et al*,[146] também obtiveram valores elevados para Δlog *K* e justificam-nos pela existência de várias interacões simultâneas entre os ligandos coordenados a um mesmo catião metálico. Mas um estudo efectuado sobre a interacção de carboxilatos com a histidina e o catião zinco(II) afirma que a interacção directa zinco(II)/carboxilato é muito menos frequente que a interacção indirecta zinco(II)/carboxilato através de uma interacção do catião zinco(II)/histidina/carboxilato (ver anexo) e que este tipo de interacções parece estar associado a muitas das interacções catião/proteínas.[251]



A: interacção directa carboxilato /zinco.
B: interacção indirecta carboxilato/zinco através da histidina

De acordo com estes dados e dado só ter sido efectuada a determinação potenciometrica das constantes de equilíbrio dos sistemas ternários não é possível concluir qual o tipo de interacção mais provável na formação dos complexos catião metálico/GABA/benzodiazepina estudados.

Considerações Finais

Do trabalho realizado há que realçar quatro aspectos distintos no que diz respeito às conclusões que se julgam ser mais significativas. O primeiro engloba a calibração do sistema de titulação potenciométrico utilizado e as conclusões que se puderam obter pela utilização do comutador de eléctrodos integrado neste sistema que permitiu a utilização simultânea de vários eléctrodos sensíveis ao catião hidrogénio. No segundo incluem-se os resultados provenientes da aplicação deste sistema de titulação potenciométrico ao estudo dos equilíbrios do sistema catião metálico/glicilglicina/citidina. No terceiro incluem-se os resultados obtidos na determinação das constantes de acidez das quatro benzodiazepinas estudadas e da metodologia desenvolvida para a determinação das suas constantes de acidez em solução aquosa por extrapolação dos valores determinados para diferentes misturas hidrometanólicas ricas em água. No último englobam-se os aspectos que dizem respeito ao estudo dos sistemas GABA/benzodiazepina e catião metálico/GABA/benzodiazepina.

CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

Como se sabe o modo de calibração do eléctrodo de vidro em estudos potenciométricos condiciona os valores das constantes de equilíbrio determinadas pelo que a calibração do sistema é um dos aspectos mais importantes neste tipo de estudos.

A utilização do método de Gran, para titulações ácido forte/base forte mostrou-se um método rápido e preciso de calibrar o sistema, obtendo-se uma enorme reprodutibilidade nos parâmetros de calibração durante um dia de trabalho consecutivo. A utilização de um comutador de eléctrodos associado ao sistema de titulação automático utilizado permitiu verificar, pela utilização simultânea de dois eléctrodos de vidro, que o comportamento destes, principalmente na zona alcalina, depende fortemente das características de fabrico do próprio eléctrodo. Foi possível concluir que na sua globalidade, os eléctrodos de vidro apresentam uma variação nítida na sua resposta na zona alcalina, ao longo de um curto espaço de tempo (dois meses) o que poderá afectar a precisão com que serão determinadas as constantes de equilíbrio nesta zona.

A comparação de resultados obtidos para parâmetros de calibração em solução aquosa e em soluções mistas água/metanol permitiu verificar que o declive da equação de Nernst se mantem inalterado nas diferentes soluções utilizadas e que a diferença entre as ordenadas na origem é proporcionais ao coeficiente de actividade que está associado à mudança de meio de água para água/metanol.

METAL/ CITIDINA/GLICILGLICINA

O estudo deste sistema foi efectuado para avaliar as características do sistema automático de titulação potenciométrica utilizado neste trabalho e para verificar a hipótese, levantada pot Li *et al*, sobre a ocorrência de um efeito sinérgico na interacção entre os ligandos citidina e glicilglicina mediada pelo catião zinco(II).

Os resultados obtidos para o valor da segunda protólise da glicilglicina (constante determinada na zona alcalina) por utilização de diferentes eléctrodos comerciais com diferentes tempos de utilização permitem afirmar que o seu valor é idêntico, a menos do erro experimental, desde que se utilizem sempre os parâmetros de calibração da zona alcalina. Isto é, se a concentração de base, a ordenada na origem e o declive da equação de Nernst, forem os obtidos para a calibração do eléctrodo de catião hidrogénio na zona alcalina, os valores dos pK_{a2} da glicilglicina são sempre concordantes, independentemente do eléctrodo utilizado ter um tempo de vida inferior ou superior a dois meses.

Os valores das constantes de equilíbrio determinadas, para estes sistemas, são bastante precisos e o modelo proposto com base apenas nos resultados potenciométricos está confirmado por resultados obtidos por RMN[110]. Este facto permite concluir que as condições experimentais utilizadas, que incluem o sistema de titulação, a sua calibração e o tratamento matemático dos resultados originam resultados válidos mesmo quando se estudam sistemas para os quais se obtêm valores de constantes de equilíbrio baixos, como no caso dos sistemas cádmio(II)/citidina e cádmio(II)/citidina/glicilglicina, que muitas vezes são considerados como duvidosos quando determinados apenas potenciometricamente.

A impossibilidade de obtenção da constante de formação do complexo ternário zinco(II)/citidina/glicilglicina, não permitiu tirar nenhuma conclusão sobre o efeito sinérgico deste catião na interacção citidina/glicilglicina, mas para o sistema cádmio(II)/citidina/glicilglicina é de prever a existência de uma ligeira cooperatividade entre os ligandos que formam este sistema.

CONSTANTES DE ACIDEZ

As diferentes metodologias utilizadas para a determinação das constantes de acidez das benzodiazepinas estudadas permitem concluir que é possivel determinar as constantes de acidez de substâncias praticamente insolúveis em água, mas solúveis em água/metanol, por aplicação da metodologia desenvolvida para a determinação de constantes de acidez em solução aquosa por extrapolação dos valores determinados para diferentes misturas hidrometanólicas ricas em água, desde que se verifiquem as seguintes condições experimentais:

- a calibração do eléctrodo deve ser efectuada antes de cada titulação, utilizando o método de Gran, por titulação de soluções, com força iónica ajustada (normalmente < 0,15 *M*) de ácido forte com base forte de concentrações conhecidas;
- as calibrações têm que ser efectuadas num meio com a mesma composição com que posteriormente se vai efectuar a determinação da constante de acidez garantindo-se que neste mesmo meio a dissociação do ácido forte e da base forte utilizadas é total e que a concentração do ácido forte é da ordem de 10^{-3} *M;*
- o comportamento dos eléctrodos deve ser controlado de modo a que sejam satisfeitas as condições gerais referidas em 7.3;
- o meio é água /metanol até 50%(v/v), onde é estável o eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio e onde os potenciais de junção são constantes.

Os valores das constantes de acidez das benzodiazepinas obtidos em meios hidrometanólicos ricos em água estão de acordo com o que era esperado para ácidos catiónicos. A comparação dos valores obtidos para $\Delta pK^{s,ag}_{(experimental)}$ com valores descritos na literatura para outros ácidos catiónicos ou neutros, permite concluir que, para soluções mistas água/

metanol até um máximo de 50% de metanol, oa valores são todos da mesma ordem de grandeza, em módulo, o que parece indicar que o processo de dissociação depende significativamente do tipo de solvatação do protão através das ligações de hidrogénio que rodeiam o dador e o aceitador deste mesmo protão.

METAL/BENZODIAZEPINAS/GABA

O estudo destes sistemas foi efectuado numa tentativa de verificar a possível existência de um efeito sinérgico nas interacções GABA/benzodiadepinas mediadas por catiões metálicos. Para tal, foi necessário verificar a existência de interacções não só entre os catiões metálicos e cada um dos ligandos individualmente, mas também entre os próprios ligandos.

Os resultados obtidos para os sistemas GABA/benzodiazepina permitiram verificar a existência de interacções relativamente fortes entre entre GABA/*medazepam* e entre GABA/*clorodiazepóxido*. Não foi no entanto possível provar a existência de interacções GABA/*diazepam*, dada a baixa solubilidade desta última benzodiazepina, que impediu o estudo potenciométrico destas interacções e dado não se ter verificado alteração dos espectros de UV/VIS do diazepam em presença de GABA.

Os resultados obtidos para os sistemas catião metálico/GABA/benzodiazepina evidenciam a existência de complexos ternários para os sistemas cobre(II)/GABA/*medazepam*, cobre(II)/GABA/*clorodiazepóxido*, zinco(II)/GABA/*medazepam*, zinco(II)/GABA/*clorodiazepóxido*. A quantificação da formação preferencial destes complexos foi efectuada através do cálculo de $\Delta \log K$ e os valores obtidos são bastante positivos e superiores à maior parte dos descritos na literatura.

Estes resultados permitem considerar não só a hipótese de a formação de complexos ternários GABA/catião metálico/benzodiazepina, ocor-

rer através de interacções GABA/benzodiazepina promovidas pelo catião metálico, mas também, de ocorrer a formação de complexos catião metálico/GABA—benzodiazepina em que as interacções GABA/benzodiazepina são as detectadas aquando dos estudos efectuados na ausência de catião metálico. De qualquer modo estes resultados permitiram verificar a existência de interações benzodiazepinas /GABA e que esta interacção é afectada pela presença de catiões metálicos.

Benzodiazepines / GABA

Bates, Determination of pH

Martell

Determination of Stability

A. Martell, R.J. Motekaitis, *Determination and Use of Stability Constants*, VCH, Nova Iorque, 1988

F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, Ellis Horwood , Chichester, 1980

R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., Wiley, Nova Iorque, 1973

H. Galter, *pH Measurement: Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation*, VCH, Weinheim, 1991

K.A. Connors, *Binding Constants*

A Bibliografia

H. Sigel

Metal Ions in Biological Systems

Bibliografia

[1] R. Way, *Bio-Inorganic Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester (1993)

[2] H. Sigel, A. Sigel, Metal Ions in Biological Systems. Interrelations among Metal Ions, Enzymes, and Gene Expression, Vol. 25, Marcel Dekker, Nova Iorque (1989)

[3] J.R. Prohaska, *Physiological Reviews*, **67**, 855 (1987)

[4] A. Korolkovas, *Essentials of Medicinal Chemistry*, 2ª ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque (1988)

[5] W.O. Foye, *Principles of Medicinal Chemistry*, 3ª ed., Lea & Febiger, Filadélfia (1989)

[6] T. Nogrady, *Medicinal Chemistry. A Biochemical Approach*, 2ª ed., Oxford University, Oxónia (1988)

[7] P.M. Dean, *Molecular Foundations of Drug-Receptor Interaction*, Cambridge University, Cambrígia (1989)

[8] B. Testa, J.M. Mayer, *Acta Pharm. Jugosl.*, **40**, 315 (1990)

[9] E. Frieden, *J. Chem. Educ.*, **52**, 754 (1975)

[10] D.W. Urry, S.Q. Peng, T.M. Parker, D.C. Gowda, R.D. Harris, *Angew. Chem. Int. Ed.*

Engl., **32**, 1440 (1993)

[11] R. Cornelis, f. Borguet, J. De Kimpe, *Anal. Chim. Acta*, **283**, 183 (1993)

[12] R.W. Olsen, J.C. Venter, *Receptor Biochemistry and Methodology: Benzodiazepine / GABA Receptors and Chloride Channels. Structural and Functional Properties*,Vol. 5, pp. 97-103, Alan R. Liss, Nova Iorque (1986)

[13] Z.L. Kruk, C.J. Pycock, *Neurotransmitters and Drugs*, 3ª ed., Chapman & Hall, Londres (1991)

[14] W.A. Payne, D.B. Hahn, R.R. Pinger, *Drugs: Issues for Today*, Mosby Year Book, S. Luís (1991)

[15] R.W. Olsen, J.C. Venter, *Receptor Biochemistry and Methodology: Benzodiazepine / GABA Receptors and Chloride Channels. Structural and Functional Properties*,Vol. 5, pp. 1-43, Alan R. Liss, Nova Iorque (1986)

[16] M. Farrant, T.T. Gibbs, D.H. Farb, *Neurochem. Research*, **15**, 175 (1990)

[17] S. Bach, *L. H. J. Med. Chem.*, 22, (1979)

[18] R.F. Squires, E. Saederup, *Mol. Pharmacology*, **22**, 327 (1983)

[19] R.W. Olsen, J.C. Venter, *Receptor Biochemistry and Methodology: Benzodiazepine / GABA Receptors and Chloride Channels. Structural and Functional Properties*,Vol. 5, pp. 209-224, Alan R. Liss, Nova Iorque (1986)

[20] M. Barriere, A. Piriou, C. Tallineau, M. Boulard, P. Mura, A. Guettier, O. Pourrat, *Toxicology Letters*, **19**, 287 (1983)

[21] S. Mizuno, N. Ogawa, A. Mori, *Neurochem. Research*, **7**, 1487 (1982)

[22] S. Mizuno, N. Ogawa, A. Mori, *Neurochem. Research*, **8**, 873 (1983)

[23] J.J.R.F. Silva, R,.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon, Oxónia (1991)

[24] A.M. Fiabane, D.R. Williams, *The Principles of Bio-Inorganic Chemistry*, The Chemical Society, Londres (1977)

[25] S. Otsuka, T. Yamanaka, *Metalloproteins-Chemical Properties and Biological Effects*, Cap. 9, Elsevier, Londres (1988)

[26] S.M. Turgeon, R.L. Albin, *Brain Research*, 30 (1992)

[27] J.R. Blair-West, D.A. Denton, A.P. Gibson, M.J. McKinley, *Brain Research*, **507**, 6 (1990)

[28] S. Eimerl, M. Schramm, *J. Neurochem*, **61**, 5518 (1993)

[29] K. Richfield, *Mol. Pharmacology*, **43**, 100 (1993)

[30] E.-I. Ochiai, *General Principles of the Biochemistry of the Elements*, Plenum, Nova Iorque (1987)

[31] F. Martínez, I. Vicente, F. García, R. Peñafiel, A. Cremades, *European J. Pharmacology*, **248**, 199 (1993)

[32] F. Gaizer, *Polyhedron*, **8**, 2065 (1989)

[33] B.D.-Le Reverend, C. Loucheux, *Inorg. Chim. Acta*, **136**, 173 (1987)

[34] M. Cusumano. A. Giannetto, P. Ficarra, S. Tommasini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1581 (1991)

[35] M.A. Cinellu, G. Minghetti, G. Banditelly, A.L. Bandini, B. Pelli, P. Traldi, *Inorg. Chim. Acta*, **161**, 57 (1989)

[36] M.A. Cinellu, M.L. Ganadu, G. Minghetti, F. Cariati, F. Demartin, M. Manassero, *Inorg. Chim. Acta*, **143**, 197 (1988)

[37] M.A. Cinellu, S. Stoccoro, G. Minghetti, A.L. Bandini, F. Demartin, *Inorg. Chim. Acta*, **168**, 33 (1990)

[38] C. Preti, G. Tosi, *J. Inorg, Nucl. Chem.*, **41**, 263 (1979)

[39] C. Preti, G. Tosi, *J. Coord. Chem.*, **6**, 81 (1976)

[40] G. Banditelli, A.L. Bandini, M.A. Cinellu, G. Minghetti, M. Scandola, P. Traldi, *Inorg. Chim. Acta*, **183**, 51 (1991)

[41] H. Miyamae, A. Obata, H. Kawazura, *Acta Cryst.*, **B38**, 272 (1982)

[42] M. Cusumano, A. Gianneto, D. Minniti, *Inorg. Chim. Acta*, **215**, 41 (1994)

[43] J.H. Mendez, C.G. Perez, M.I.G. Martin, *Anales de Química*, **80**, 390 (1984)

[44] K. Denbigh, *The Principles of Chemical Equilibrium*, 4ª ed., Cambridge University, Cambrígia (1981)

[45] P.R. Bergeton, E.R. Simons, *Biophysical Chemistry. Molecules to Membranes*, Springer-Verlag, Nova Iorque (1990)

[46] K.A. Connors, *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1987)

[47] H. Rossotti, *The Study of Ionic Equilibria. An Introduction*, pp. 10-13, Longman, Oxónia (1977)

[48] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 20-26, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[49] P.W. Atkins, *Physical Chemistry*, 2ª ed., Oxford University, Oxónia (1982)

[50] M.J. Blandamer, J. Burgess, *Transition Met. Chem*, **13**, 1 (1988)

[51] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., pp. 211-234, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1973)

[52] O. Popovych, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1**, 73 (1970)

[53] P.R. Bergeton, E.R. Simons, *Biophysical Chemistry. Molecules to Membranes*, pp. 123-130, Springer-Verlag, Nova Iorque (1990)

[54] K.A. Connors, *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, pp. 3-19, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1987)

[55] K.A. Connors, *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, pp. 42-46, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1987)

[56] F.J.C. Rossotti, H.S. Rossotti, R.J. Whewell, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **33**, 2051 (1971)

[57] H.S. Rossotti, *Talanta*, **21**, 809 (1974)

[58] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 52-72, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[59] H. Rossotti, *The Study of Ionic Equilibria. An Introduction*, pp. 67-73, Longman, Oxónia (1977)

[60] A.G. Gonzalez, D. Rosales, J.L.G. Ariza, A.G. Perez, *Talanta*, **35**, 249 (1988)

[61] D. York, *Can. J. Phys.*, **44**, 1074 (1966)

[62] K.A. Connors, *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, pp. 49-69, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1987)

[63] R.B. Loftfield, E.A. Eigner, *Science*, **164**, 305 (1969)

[64] H.A. Saroff, A.P. Minton, *Science*, **175**, 1253 (1972)

[65] H. Benesi, J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703 (1949)

[66] E.M. Perdue, C.R. Lytle, *Environ. Sci. Technol.*, **17**, 654 (1983)

[67] G. Scatchard, J.S. Coleman, A.L. Shen, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 12 (1957)

[68] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 74-106, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[69] W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*, pp. 470, Cambridge University, Cambrígia (1989)

[70] M. Meloun, J. Havel, E. Högfeldt, *Computation of Solution Equilibria: A Guide to Methods in*

Potentiometry, Extraction, and Spectrophotometry, pp. 82-114, Ellis Horwood, Chichester (1988)

[71] J.R. Miller, P.D. Taylor, *Talanta*, **36**, 879 (1989)

[72] K. Epert, H. Ederer, T.L. Isenhour, *Computer Applications in Chemistry*, VCH, Weinheim (1989)

[73] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Inorg. Chim. Acta*, **79**, 218 (1983)

[74] J.J.B. Baeza, G.R. Ramos, C.M. Fernandez, *Anal. Chim. Acta*, **223**, 419 (1989)

[75] E. Casassas, R. Tauler, M. Filella, *Anal. Chim. Acta*, **191**, 399 (1986)

[76] A.E. Martell, R.J. Morekaitis, *Determination and Use of Stability Constants*, pp.1-4, VCH, Nova Iorque (1988)

[77] D.G. Tuck, *Pure & Appl. Chem.*, **61**, 1161 (1989)

[78] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 118-131, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[79] H. Rossotti, *The Study of Ionic Equilibria. An Introduction*, pp. 83-98, Longman, Oxónia (1977)

[80] E.P. Serjeant, *Potentiometry and Potentiometric Titrations*, Vol. 69, pp. 3-30, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1984)

[81] J. Borenberg, B.E. Fischer, H. Sigel, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **42**, 785 (1980)

[82] L.G. Sillén, *Acta. Chem. Scand.*, **18**, 1085 (1964)

[83] D.D. Perrin, I.G. Sayce, *J. Chem. Soc.*, **A**, 82 (1976)

[84] I.G. Sayce, *Talanta*, **15**, 1397 (1968)

[85] F. Gaiser, M. Máté, *Acta. Chim. Acad. Sci. Hung.*, **103**, 355 (1963)

[86] D.J. Leggett, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum, Nova Iorque (1985)

[87] R.J. Motekaitis, A.E. Martell, *Can. J. Chem.*, **60**, 2403 (1982)

[88] A. Sabatini, A. Vacca, P. Gans, *Talanta*, **21**, 53, (1974)

[89] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1195 (1985)

[90] M. Meloun, M. Bartos, *Mikrochim. Acta*, **108**, 227 (1992)

[91] J. Polster, H. Lachmann, *Spectrometric Titrations. Analysis of Chemical Equilibria*, VCH, Weinheim (1989)

[92] J.D. Ingle, JR., S.R. Crouch, *Spectrochemical Analysis*, Prentice-Hall International, Nova Jersey (1988)

[93] J. Zhou, S.-F. Zou, W.-A. Liang, *Talanta*, **40**, 925 (1993)

[94] R.S. Drago, *Physical Methods in Chemistry*, W.B. Saunders, Filadélfia (1977)

[95] K.A. Connors, *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, pp. 141-161, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1987)

[96] A. Albert, E.P. Serjeant, *Ionization Constants of Acids and Bases*, Methuen, Londres (1962)

[97] J.P. Maroni, J.P. Calmon, *Bull. Soc. Chim. France*, 513 (1964)

[98] L.A. Flexser, L.P. Hammett, A. Dingwall, *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2103 (1935)

[99] M. Meloun, J. Havel, E. Högfèldt, *Computation of Solution Equilibria: A Guide to Methods in Potentiometry, Extraction, and Spectrophotometry*, pág. 73, Ellis Horwood, Chichester (1988)

[100] M. Meloun, J. Militky, *Mickrochim. Acta*, **112**, 155 (1993)

[101] M. Meloun, M. Javurek, *Talanta*, **32**, 973 (1985)

[102] W.A.E. McBryde, *Talanta*, **21**, 979 (1974)

[103] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 134-145, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[104] R.M. Alcock, F.R. Hartley, D.E. Rogers, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 115 (1978)

[105] M. Meloun, J. Havel, E. Högfeldt, *Computation of Solution Equilibria: A Guide to Methods in Potentiometry, Extraction, and Spectrophotometry*, pág. 224, Ellis Horwood, Chichester (1988)

[106] D.J. Leggett, W.A.E. McBryde, *Anal. Chem.*, **47**, 1065 (1975)

[107] M. Meloun, M. Javurek, J. Havel, *Talanta*, **33**, 513 (1986)

[108] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 149-153, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[109] M.J. Hynes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 311 (1993)

[110] B. Castro, J. Pereira, P. Gameiro, J.L.F.C. Lima, *J. Inorg. Biochem.*, **45**, 53 (1992)

[111] T,L, Sayer, D.L. Rabenstein, *Can. J. Chem.*, **54**, 3394 (1976)

[112] H. Sigel, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **14**, 394 (1975)

[113] Y. Kinjo, R. Tribolet, N.A. Corfù, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **28**, 1480 (1989)

[114] N. Saha, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4100 (1982)

[115] H. Kozlowski, A. Anouar T.K.-Jankowska, P. Decock, J.S.-Kozlowska, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, **207**, 223 (1993)

[116] L.D. Pettit, S. Pyburn, H. Kozlwski, B. D.-Le Reverend, F. Liman, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1471 (1989)

[117] H. Kozlowski, B. Radomska, G. Kupryszewski, B. Lammek, C. Livera, L.D. Pettit, S. Pyburn, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 173 (1989)

[118] R.B. Martin, R. Prados, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **36**, 1665 (1974)

[119] H. Sigel, *Metal Ions in Biological Systems. Mixed-Ligand Complexes*, Vol. 2, Marcel Dekker, Nova Iorque (1973)

[120] H. Sigel, K. Becker, D.B. McCormick, *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 655 (1967)

[121] V.S. Sharma, J. Schubert, *J. Chem. Educ.*, **46**, 506 (1969)

[122] E. Arenare, P. Paoletti, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 736 (1973)

[123] A.E. Martell, G.A. L'Heureux, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **28**, 481 (1966)

[124] H. Sigel, R. Caraco, B. Prijs, *Inorg. Chem.*, **13**, 462 (1974)

[125] G. Arena, R. Calì, V. Cucinotta, S. Musumeci, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1271 (1983)

[126] I. Pócsi, I. Fábián, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2231, (1988)

[127] H. Sigel, P.R. Huber, R.F. Pasternack, *Inorg. Chem.*, **10**, 2226 (1971)

[128] H. Sigel, P.R. Huber, R. Griesser, B. Prijs, *Inorg. Chem.*, **12**, 1198 (1973)

[129] R. Griesser, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **9**, 1238 (1970)

[130] E. Leporati, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 199 (1986)

[131] J. Urbanska, H. Kozlowski, B. Kurzak, *Polyhedron*, **11**, 149 (1992)

[132] B.E. Fischer, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **18**, 425 (1979)

[133] H. Sigel, B.E. Fischer, B. Prijs, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4489 (1977)

[134] P.J. Patel, P.K. Bhattacharya, *J. Coord. Chem.*, **13**, 113 (1984)

[135] H. Sigel, K.H. Scheller, R.M. Milburn, *Inorg. Chem.*, **23**, 1933 (1984)

[136] N. Saha, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4100 (1982)

[137] C. Yamauchi, A. Odani, *Inorg. Chim. Acta*, **100**, 165 (1985)

[138] H. Sigel, B.E. Fischer, E. Farkas, *Inorg. Chem.*, **22**, 925 (1983)

[139] R. Tribolet, H. Sigel, K. Trefzer, *Inorg. Chim. Acta*, **79**, 278 (1983)

[140] Y. Fukuda, P.R. Mitchell, H. Sigel, *Helv. Chim. Acta*, **61**, 638 (1978)

[141] H. Sigel, R.M.-Balakrishnan, U.K. Häring, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5137 (1985)

[142] M.S. Nair, K. Venkatachalapathi, M. Santappa, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 555 (1982)

[143] K. Prasad, M.S. Mohan, *J. Coord. Chem.*, **16**, 1 (1987)

[144] B.T. Khan, M. Raju, S.M. Zakeeruddin, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 67 (1988)

[145] P.R. Mitchell, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 1564 (1978)

[146] A.V. Vaidyan, P.K. Bhattacharya, *Can. J. Chem.*, **72**, 1107 (1994)

[147] C.F. Naumann, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2750 (1974)

[148] P.R. Mitchell, B. Prijs, H. Sigel, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 1723 (1979)

[149] J.B. Orenberg, B.E. Fischer, H. Sigel, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **42**, 785 (1980)

[150] H. Sigel, *Angew. Chem.*, **21**, 389 (1982)

[151] Y. Kinjo, L.-N. Ji, N.A. Corfù, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **31**, 5588 (1992)

[152] L.-n. Ji, N.A. Corfù, H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta*, **206**, 215 (1993)

[153] H.A. Plaska, *EDTA Titrations*, Pergamon, Londres (1959)

[154] P.J. Hore, in *Basic Techniques; Methods in Enzymology*, Vol. 176, pp. 64-77, N.J. Oppenheimer and T.L. James, Eds., Academic, Londres (1989)

[155] A. Martell, R.J. Motekaitis, *Determination and Use of Stability Constants*, pp. 171-181, VCH, Nova Iorque (1988)

[156] D.J. Leggett, S.L. Kelly, L.R. Shiue, Y.T. Wu, D. Chang, K.M. Kadish, *Talanta*, **30**, 579 (1983)

[157] A. Brainbanti, F. Dallavalle, G. Mori, B. Veroni, *Talanta*, **29**, 725 (1982)

[158] A. Brainbanti, G. Ostacoli, P. Paoletti, L.D. Pettit, S. Sammartano, *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 1721 (1987)

[159] A. Albert, E.P. Sargeant, *The Determination of Ionization Constants*, 2ª ed., Chapman & Hall, Londres (1971)

[160] V. Cerda, J. Maino, J.M. Estela, A. Salva, G. Ramis, *Talanta*, **35**, 667 (1988)

[161] A.P. Arnold, S.A. Daignault, D.L. Rabenstein, *Anal. Chem.*, **57**, 1112 (1985)

[162] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, *J. Autom. Chem.*, **13**, 119 (1991)

[163] E. Leporati, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1295 (1989)

[164] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., pp. 15-21, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1973)

[165] R.A. Durst, J.P. Cali, *Pure & Appl. Chem.*, **50**, 1485 (1978)

[166] A.K. Covington, R.G. Bates, R.A. Durst, *Pure & Appl. Chem.*, **55**, 1467 (1983)

[167] Commission on Electroanalytical Chemistry and Electrochemistry, *Pure & Appl. Chem.*, **56**, 533 (1984)

[168] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., pp. 86-104, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1973)

[169] H. Galter, *pH Measurement: Fundamentals, Methods, Applications, Intrumentation*, VCH, Weinheim (1991)

[170] M.T.S.D. Vasconcelos, A.A.S.C. Machado, *Rev. Port. Quím.*, **28**, 120 (1991)

[171] E. Leporati, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 421 (1993)

[172] H. Sigel, A.D. Zuberbühler, O. Yamauchi, *Anal. Chim. Acta*, **255**, 63 (1991)

[173] W.A.E. McBryde, *Analyst*, **94**, 337 (1969)

[174] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pehit, *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967)

[175] G. Anderegg, *Anal. Chim. Acta*, **282**, 485 (1993)

[176] C. C. Westcott, *pH Measurements*, pp. 55-60, Academic, Nova Iorque (1978)

[177] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., pp. 26-28, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1973)

[178] Interunion Commission on Biothermodynamics, *Recommendations for Measurement abd Presentation of Biochemical Equilibrium Data*, Vol. 251, The Journal of Biological Chemistry, Nova Iorque (1976)

[179] G. Gran, *Analyst*, **77**, 661 (1952)

[180] F.J.C. Rossotti, H. Rossotti, *J. Chem. Educ.*, **42**, 375 (1965)

[181] A. Braibanti, C. Bruschi, E. Fisicaro, M. Pasquali, *Talanta*, **33**, 471 (1986)

[182] Leporati, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 953 (1988)

[183] A. Martell, R.J. Motekaitis, *Determination and Use of Stability Constants*, pp. 4-31, VCH, Nova Iorque (1988)

[184] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., pp. 234-265, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1973)

[185] T. Mussini, A.K. Covington, P. Longhi, S. Rondinini, *Pure & Appl. Chem.*, **57**, 865 (1985)

[186] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2ª ed., pp. 245-249, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1973)

[187] S. Rondidini, P.R. Mussini, T, Mussini, *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 1549 (1987)

[188] H. Galter, *pH Measurement: Fundamentals, Methods, Applications, Intrumentation*, pp. 18-20, VCH, Weinheim (1991)

[189] O. Popovych, *Anal. Chem.*, **38**, 558 (1966)

[190] Y. Marcus, *Pure & Appl. Chem.*, **58**, 1721 (1986)

[191] E.P. Sergeant, *Potentiometry and Potentiometric Titrations*, pp. 409-415, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1984)

[192] H. Rossotti, *Talanta*, **21**, 809 (1974)

[193] E. Pines, G.R. Fleming, *J. Phys. Chem.*, **95**, 10448 (1991)

[194] O. Budevsky, T. Zikolova, J. Tencheva, *Talanta*, **35**, 899 (1988)

[195] E. Fisicafo, A. Braibanti, *Talanta*, **35**, 769 (1988)

[196] J. Tencheva, G. Velinov, O. Budevsky, *J. Electroanal. Chem.*, **68**, 65 (1976)

[197] A. Avdeef, J.E.A. Comer, S.J. Thomson, *Anal. Chem.*, **65**, 42 (1993)

[198] K.C. Tewari, J. Lee, N.C. Li, *Trans. Farad. Soc.*, **84**, 4464 (1962)

[199] T. Yokono, S. Shimokawa, J. Sohma, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3827 (1975)

[200] H. Sigel, *Metal-DNA Chemistry*, ACS Symposium Series 402, pág.159, T.D. Tullius, Ed., American Chemical Society, Washington (1989)

[201] H. Sigel, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **39**, 1903 (1977)

[202] H. Sigel, K.H. Carrell, R.M. Milburn, *Inorg. Chem.*, **23**, 1933 (1984)

[203] L.G. Marzilli, B. Castro, J. Caradonna, R.C. Stewart, C.P. Van Vuuren, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 916 (1980)

[204] N.C. Li, M.C. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5678 (1958)

[205] S.M. Wang, R.K. Gilpin, *Talanta*, **32**, 329 (1985)

[206] S.M. Wang, R.K. Gilpin, *Talanta*, **55**, 493 (1983)

[207] I. Samasundaram, M.K. Kommiya, M. Palaniandavar, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2083, (1991)

[208] L.G. Sillén, A.E. Martell, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, Special Publication 17, The Chemical Society, Londres (1964)

[209] R.M. Smith, A.E. Martell, *Critical Stability Constants*, Vol. 4, Plenum, Nova Iorque (1976)

[210] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. 5, Plenum, Nova Iorque (1982)

[211] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385, (1982)

[212] F. Rey, A. Varela, J.M. Antelo, F. Arce, *J. Chem. Eng. Data*, **34**, 35 (1989)

[213] A. Casale, C. De Stefano, S. Sammartano, P.G. Daniele, *Talanta*, **36**, 903 (1989)

[214] D.L. Rabenstein, S. Libich, *Inorg. Chem.*, **11**, 2960 (1972)

[215] A.D. Brown, M.P. Schweizer, P.O.P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3612 (1967)

[216] P. Cieplak, P.A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3734 (1988)

[217] P.O.P. Tso'o, I.S. Melvin, A.C. Olson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1289 (1963)

[218] S.B. Petersen, J.J. Led, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5069 (1968)

[219] K.H. Scheller, F. Hoffstetter, P.R. Mitchell, B. Prijs, H. Sigel *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 247 (1991)

[220] Y. Kinjo, L.-N. Ji, N.A. Corfù, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **31**, 5588 (1992)

[221] J.J. Christensen, H.H. Rytting, R.M. Izatt, *J. Chem. Soc.*, **B**, 1643 (1970)

[222] R.M. Izatt, J.J. Christensen, J.H. Rytting, *Chem. Rev.*, **71**, 439, (1971)

[223] S.-H. Kim, R.B. Martin, *Inorg. Chim. Acta*, **91**, 19 (1984)

[224] R.B. Martin, *Acc. Chem. Res.*, **18**, 32, (1985)

[225] L.-N. Ji, N.A.Corfù, H. Sigel, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1367, (1991)

[226] H.Sigel, *Metal Ions in Biological Systems. Mixed-Ligand Complexes*, Vol. 2, Marcel Dekker, Nova Iorque (1973)

[227] J. Barrett, W.F. Smyth, I.E. Davidson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **25**, 387 (1973)

[228] G.F. le Petit, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1094 (1976)

[229] B. Maupas, M.B. Fleury, *Analusis*, **10**, 187 (1982)

[230] L.B. Pfendt, D.M. Sladic, T.J. Janjic, G.V. Popovic, *Analyst*, **115**, 383 (1990)

[231] P. Seiler, I. Zimmermann, *Arzneim.-Forsh.*, **33**, 1519 (1983)

[232] B. Maupas, M.B. Fleury, *Analusis*, **10**, 187 (1982)

[233] J.M. Clifford, W.F. Smyth, *Analyst*, **99**, 241 (1974)

[234] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *J. Pharm. & Biom. Analysis*, **10**, 109 (1992)

[235] W.W. Han, G.J. Yakatan, D.D. Maness, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1198 (1976)

[236] W.W. Han, G.J. Yakatan, D.D. Maness, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 573 (1976)

[237] H. Schütz, *Benzodiazepines*, Springer-Verlag, Nova Iorque (1982)

[238] A.M.-Rubio, J.V.J.-Ortiz, A. Salvador, M. De La Guardia, *Microchem. J.*, **49**, 12 (1994)

[239] P. Lafargue, J. Meunier, Y. Lemontey, *J. Chromat.*, **62**, 423 (1971)

[240] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. 2, Plenum, Nova Iorque (1982)

[241] O. Popovych, *Anal. Chem.*, **46**, 2008 (1974)

[242] A. Fini, A. Roda, P. DeMaria, *Eur. J. Med. Chem.*, **17**, 467 (1982)

[243] M.J. Blandamer, J. Burguess, R. Roberttson, J.M.W. Scott, *Chem. Rev.*, **82**, 259 (1982)

[244] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants*, Plenum, Vol. 5, Nova Iorque (1982)

[245] M.S. Nair, K. Venkatachalapathi, M. Santappa, P.K. Murugan, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 55 (1982)

[246] I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Pure & Appl. Chem.*, **65**, 1029 (1993)

[247] F.R. Hartley, C. Burgess, R. Alcock, *Solution Equilibria*, pp. 108-111, Ellis Horwood, Chichester (1980)

[248] C. De Stefano, S. Sammartano, A. Gianguzza, *Talanta*, **40**, 629 (1993)

[249] R.M. Smith, A.E. Martell, *Critical Stability Constants*, Vol. 1, Plenum, Nova Iorque (1976)

[250] F. Zhang, Q. Liu, *J. Coord. Chem.*, **28**, 197 (1993)

[251] D.W. Christianson, R.S. Alexander, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6412 (1989)