

CARACTERIZAÇÃO ÁCIDO-BASE DA SUPERFÍCIE DE ESPÉCIES MISTAS DA ALGA *Spirulina* ATRAVÉS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA E MODELO DE DISTRIBUIÇÃO DE SÍTIOS DISCRETOS

Elizabeth C. de Lima e Jorge C. Masini

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - CP 26077 - 05599-970 - São Paulo - SP

Recebido em 15/9/98; aceito em 29/1/99

ACID BASE CHARACTERIZATION OF THE SURFACE OF MIXED SPECIES OF ALGAE *Spirulina* BY POTENTIOMETRIC TITRATION AND DISCRETE SITE DISTRIBUTION MODEL. Acid base properties of mixed species of the microalgae *Spirulina* were studied by potentiometric titration in medium of 0.01 and 0.10 mols L⁻¹ NaNO₃ at 25.0±0.10 C using modified Gran functions or nonlinear regression techniques for data fitting. The discrete site distribution model was used, permitting the characterization of five classes of ionizable sites in both ionic media. This fact suggests that the chemical heterogeneity of the ionizable sites on the cell surface plays a major role on the acid-base properties of the suspension in comparison to electrostatic effects due to charge-charge interactions. The total of ionizable sites were 1.75±0.10 and 1.86±0.20 mmolsg⁻¹ in ionic media of 0.01 and 0.10 mols L⁻¹ NaNO₃, respectively. A major contribution of carboxylic groups was observed with an average 34 and 22% of ionizable sites being titrated with conditional p^cK_a of 4.0 and 5.4, respectively. The remaining 44% of ionizable sites were divided in three classes with averaged conditional p^cK_a of 6.9, 8.7 and 10.12, which may be assigned respectively to imidazolic, aminic, and phenolic functionalities.

Keywords: algae surface; ionizable groups; potentiometric titrations; discrete site model.

INTRODUÇÃO

O acúmulo de metais pesados por biomassa oriunda de bactérias, fungos e algas em ambientes aquáticos tem sido atribuído a processos de complexação e/ou adsorção entre cátions metálicos e os sítios ionizáveis presentes na superfície destes biomateriais. O conhecimento da estequiometria e propriedades ácido-base dos grupos ionizáveis presentes na parte externa da parede celular dos biosorventes é essencial para que se possa prever as suas propriedades de ligação de prótons e metais e, conseqüentemente, a viabilidade de seu emprego em sistemas de purificação de águas, tratamento de efluentes e recuperação de ambientes degradados. Entre a diversidade da biomassa existente, as algas têm sido a fonte mais promissora quanto à capacidade de biosorção de metais pesados como cobre, cádmio, chumbo, níquel e zinco. O desempenho destes organismos como adsorventes depende de sua concentração (população), pH do meio, cinética de reação, entre outros fatores¹. A identificação e quantificação dos sítios ligantes destes biomateriais pode ainda contribuir para o desenvolvimento de novos adsorventes sintéticos.

A determinação e caracterização ácido-base dos sítios ionizáveis presentes em superfícies de algas, via titulação potenciométrica, é complicada pela presença de sítios de diferentes naturezas (SO₃H, COOH, -NH₂, Φ-OH), que conferem a chamada heterogeneidade química à superfície. A presença de cargas nestes grupos leva ao aparecimento de campo elétrico na superfície e, conseqüentemente, a efeitos eletrostáticos que afetam as suas propriedades ácido-base. No sentido de quantificar a estequiometria e as constantes de ionização condicionais dos grupos ionizáveis em misturas de ácidos ou materiais complexos como proteínas ou substâncias húmicas, os dados das titulações potenciométricas devem ser tratados por métodos numéricos baseados em regressão linear²⁻⁶ ou não linear^{7,8}, uma vez que a aplicação de métodos tradicionais de primeira e segunda derivadas não levam a resultados confiáveis, dada a ausência de pontos de inflexão nas curvas de titulação. A fim

de se avaliar a viabilidade destes métodos numéricos na caracterização ácido-base da superfície de algas, a microalga *Spirulina* foi utilizada como modelo para prover tais informações.

As *Spirulinas* são classificadas como seres procariotos, imóveis e não esporulados^{9,10}. Sua natureza procariota, seus pigmentos do tipo ficobiliprotéico e produção de oxigênio via fotossintética as diferencia das algas eucariotas e bactérias fotossintéticas. As *Spirulinas* vivem em meios líquidos ricos em sais minerais compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH 8 a 11. As regiões propícias para cultivo são as tropicais e subtropicais, quentes e ensolaradas. São utilizadas como fonte de alimento na dieta humana e ração animal, possuindo elevados teores protéicos e contendo todos os aminoácidos essenciais em proporções que satisfazem as recomendações da FAO (Food and Agriculture Organization). As *Spirulinas* são capazes de acumular germânio, que é importante devido à sua atividade hemolítica e indutora de interferon. Além disso possuem efeito hipocolesterolêmico, ou seja, seu consumo pode abaixar os níveis de colesterol no sangue, conforme foi descrito em literatura^{9,10}. Outro aspecto interessante ligado à *Spirulina* é o seu meio de cultura; que pode ser composto por efluentes rurais e urbanos ricos em nitrogênio e fósforo. Desta forma, a partir do cultivo recupera-se quase que a totalidade desses elementos, evitando a proliferação de algas indesejáveis e produzindo biomassa para consumo humano e animal^{9,10}.

No presente trabalho, suspensões de espécies mistas de *Spirulina* foram estudadas por titulação potenciométrica em meio iônico predominante de NaNO₃ 0,01 e 0,10 mols L⁻¹, à temperatura de 25,0 ± 0,1°C. Os dados foram tratados por métodos numéricos baseados em regressão linear (funções de Gran modificadas)²⁻⁶ e regressão não linear^{7,8}, adotando-se o modelo de distribuição de sítios discretos, ou seja, assumindo-se que o principal fator que governa a curva de titulação é a heterogeneidade química da superfície. Os efeitos de possíveis interações eletrostáticas foram avaliados comparando-se os resultados obtidos em diferentes condições de força iônica.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e Instrumentos

As medidas potenciométricas foram realizadas com um pH-metro Metrohm 654 com precisão de 0,1 mV, ou 0,001 unidades de pH, utilizando um eletrodo combinado de vidro Mettler Toledo HA 405-60-8b-S 7/20. O sistema de referência do eletrodo é Ag/AgCl, preenchido com solução saturada de KCl/AgCl. As adições de titulante foram realizadas através de uma microbureta Gilmont GS 4200 A com capacidade de 2,5 mL e precisão de 0,1 µL. A termostatização das soluções foi feita circulando-se água a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pela jaqueta externa da cela de titulação, utilizando-se banho termostático Ética 521 D.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico Merck e a mistura de espécies da alga *Spirulina*, lavada e liofilizada, foi adquirida junto à Sigma, lote N.º 29F40201.

Soluções de NaOH e HCl foram preparadas em concentrações próximas a 0,10 mols L⁻¹ contendo NaNO₃ 0,010 ou 0,10 mols L⁻¹. No sentido de minimizar a contaminação com carbonatos, a solução NaOH/NaNO₃ foi preparada por diluição de volume apropriado de solução estoque de NaOH 50% (m/v), previamente filtrada sob pressão reduzida. Estas soluções foram preparadas em balão volumétrico ao qual era adicionada uma massa de NaNO₃ de modo a produzir a solução de concentração 0,010 ou 0,10 mols L⁻¹ no referido sal. A diluição foi feita utilizando-se água desionizada previamente fervida. Após o preparo, a solução era rapidamente acondicionada em frasco de polietileno de paredes grossas contendo sistema de sifonamento para retirada de solução e tubo preenchido com cal sodada para permitir entrada de ar isento de CO₂ no interior do frasco. Esta solução foi padronizada antes do uso com hidrogenofalato de potássio seco em estufa à 110°C durante cerca de 1,5 hora, usando-se fenolftaleína 1,0% como indicador.

Procedimento

Calibração dos eletrodos para medida da concentração de íons H⁺

Os eletrodos foram calibrados em termos de concentração de acordo com a equação¹¹:

$$E = E^{\circ} + 59,16 \log[H^+] + J_H[H^+] + J_{OH}[OH] \text{ à } 25^\circ\text{C} \quad (1)$$

onde E é o potencial medido, E° é um termo que inclui o potencial padrão do eletrodo mais o termo de coeficiente de atividade de íons hidrogênio (mantido constante sob condições de força iônica constante), J_H e J_{OH} são termos de potencial de junção na região ácida e alcalina respectivamente. Os demais termos têm suas definições usuais. A determinação de E , E° , J_H e J_{OH} é feita a partir da titulação de um ácido padrão com uma base padrão nas mesmas condições de temperatura (25°C) e força iônica de acordo com o procedimento descrito por Pehrson et al¹¹.

Esta titulação de calibração foi feita diariamente adicionando-se 1,50 mL de solução de ácido clorídrico 0,10 mols L⁻¹ (em NaNO₃ 0,10 ou 0,010 mols L⁻¹) à cela de titulação contendo previamente 20,00 mL de solução de NaNO₃ 0,10 ou 0,010 mols L⁻¹. Em seguida os eletrodos e a ponteira da bureta foram mergulhados na solução, aguardando-se tempo de 15 minutos para termostatização. Após verificar-se que o potencial inicial permanecia estável, iniciou-se a titulação com adições de 0,05 mL de solução padrão de NaOH/NaNO₃, anotando-se o valor do potencial E após cada adição. Durante todo o procedimento a cela foi mantida fechada, tendo apenas uma pequena abertura por onde circulou-se nitrogênio livre de CO₂.

Titulações das suspensões de Spirulina

Suspensões de alga em concentração aproximada de 1 a 2 g L⁻¹ ($\pm 0,1$ mg L⁻¹) foram preparadas diretamente na cela de titulação em presença de 50,00 mL de NaNO₃ 0,010 ou 0,10 mols L⁻¹. Em seguida foram adicionados 1,50 mL de HCl 0,10 mols L⁻¹ contendo a mesma concentração NaNO₃ que a suspensão a ser titulada, promovendo-se a protonação dos grupos ionizáveis na superfície das algas e mantendo-se o meio iônico predominante em NaNO₃ 0,01 ou 0,10 mols L⁻¹. Mergulhou-se a ponteira da pipeta e o eletrodo na suspensão, fechando-se a cela e iniciando-se a circulação de nitrogênio. Após estabilização do potencial e termostatização, iniciou-se a titulação adicionando-se incrementos de 0,0100 mL da solução padrão de NaOH 0,10 mols L⁻¹ contendo NaNO₃ na mesma concentração que a suspensão titulada. Os incrementos de titulante foram feitos de modo a obter-se mudanças de potencial de aproximadamente 5,0 mV, anotando-se os potenciais para cada volume adicionado. Adotou-se como critério para serem efetuadas as medidas de potencial anotar-se o valor após sua variação ser inferior a 0,555 mV/min, que é um recurso disponível no pHmetro utilizado. Foram obtidos cerca de 120 pontos (volume de NaOH e potencial) por titulação, o que requereu cerca de 2 a 3 horas.

Metodologia de cálculo empregada

O tratamento dos dados obtidos foi realizado utilizando-se um conjunto de programas que envolve a segmentação e linearização da curva de titulação por funções de Gran modificadas^{2,8}, assim como um programa de ajuste multiparamétrico baseado em regressão não-linear^{7,8}. Nestes programas é necessário fornecer-se o p^oH, o logaritmo negativo concentração de íons hidrogênio, em cada ponto da titulação da amostra, assim como o volume de titulante adicionado e o volume de suspensão inicialmente presente na cela de titulação. A obtenção de p^oH foi feita a partir das medidas de potencial, E , dos parâmetros de eletrodo (J_H , J_{OH} , E°) e do meio (K_w) obtidos na titulação de calibração, usando-se a equação 1, conforme descrito na literatura^{2,11}.

As deduções sobre a obtenção das Funções de Gran Modificadas foram mostradas nos trabalhos de Seymour et al³, assim como por Aleixo e Godinho².

O programa de regressão não-linear usa a equação geral que descreve a titulação de uma mistura de um ácido forte com N ácidos fracos (sítios ligantes)^{7,8}:

$$f(V, H^+) = (V - V_{HA_0})C_B + \left\{ [H^+] - \frac{K_w}{H^+} \right\} (V_0 + V) - \sum_{n=1}^N \left\{ (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}) A_n C_B \right\} \quad (2)$$

onde V é o volume do titulante, e V_0 é o volume inicial presente na cela antes do início da titulação. V_{HA_0} e V_{HA_n} são respectivamente o volume de equivalência para o ácido forte e para o sítio ionizável HA_n . $[H^+]$ é a concentração do íon hidrogênio. K_w é a constante de ionização da água à 25°C em solução de NaNO₃; C_B é a concentração do titulante (mols L⁻¹). O termo A_n é definido por:

$$A_n = \frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]} \quad (3)$$

onde K_{HA_n} é a constante de ionização do sítio HA_n .

O logaritmo negativo de $[H^+]$, p^oH, é adotado como a

variável dependente e o volume de titulante, V, como variável independente. V_{HA_n} e K_{HA_n} são os parâmetros ajustáveis no cálculo, o qual é realizado minimizando-se o erro da soma, S:

$$S = \sum_{j=1}^m [p^c H_j(\text{med}) - p^c H_j(\text{calc})]^2 \quad (4)$$

onde m é o total de dados (V, p^cH) usado na análise de regressão e p^cH (med) refere-se ao pH experimental, enquanto p^cH (calc) é o pH calculado.

Os valores de p^cH (calc) foram calculados usando uma subrotina iterativa baseada no método de Newton-Raphson. Primeiramente, os valores de $[H^+]_{\text{calc}}$ são computados usando os valores iniciais estimados para V_{HA_n} e K_{HA_n} . Melhores aproximações para os valores de $[H^+]_{\text{calc}}$ no ponto experimental j são obtidos através de sucessivas iterações, k, de acordo com a equação:

$$[H^+]_{j,k+1} = [H^+]_{j,k} - \frac{f(V, [H^+]_{j,k})}{f'(V, [H^+]_{j,k})} \quad (5)$$

onde f' (V, $[H^+]_{j,k}$) é a primeira derivada da equação 2, dada pela seguinte expressão:

$$f'(V, H^+) = \left\{ 1 + \left(\frac{K_w}{[H^+]^2} \right) \right\} (V_0 + V) + \sum_{n=1}^N \left\{ (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}) C_B \frac{[K_{HA_n}]}{(K_{HA_n} + [H^+])^2} \right\} \quad (6)$$

A equação 5 é usada repetidamente até que ocorra a convergência a um valor limite, previamente definido por:

$$\left\{ \frac{[H^+]_{j,k+1} - [H^+]_{j,k}}{[H^+]_{j,k}} \right\} < 0,00001 \quad (7)$$

Quando a condição definida pela equação 7 é atendida, o valor de $[H^+]_{j,k+1}$ é convertido em p^cH_{j,k+1} e enviado para a subrotina de minimização para refinar os valores de V_{HA_n} e K_{HA_n} . Para realização dos cálculos, um comando restringindo $[H^+]_{\text{calc}} < 0$ foi introduzido no programa^{7,8}.

O número de classes de grupos tituláveis obtidos através de dados de titulações potenciométricas de polieletrólitos tratados pelos métodos aqui utilizados dependerá:

- 1- da presença de grupos ionizáveis de diferentes naturezas químicas (carboxílicos, fenólicos, amínicos, etc.).
- 2- de grupos de mesma natureza química que estejam sujeitos a interações intramoleculares (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, ou proximidade de grupos com alta eletronegatividade, etc.) que têm seus valores de pKa influenciados por tais interações^{5,8}.
- 3- da capacidade de resolução de misturas através do método numérico empregado. Tem-se demonstrado que quando dois grupos tituláveis com diferença nos valores de pKa menor ou igual a 0,5 unidade estão presentes na mistura¹⁴ ou macromolécula, os métodos estudados determinam os dois grupos como uma única classe HA_n cuja concentração corresponde à soma das concentrações individuais destes grupos, enquanto o pKa refere-se a um valor médio⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração dos sítios ionizáveis HA_n, expressa em mmols por grama de *Spirulina*, é mostrada na Tabela 1 juntamente com os valores de p^cK, o logaritmo negativo da constante de ionização condicional em termos de concentração. Os resultados obtidos tanto por regressão não linear como pelas funções de Gran modificadas foram similares, indicando que não existe vantagem clara de um método numérico sobre o outro no tratamento de dados do material estudado. A Figura 1 ilustra as curvas de titulação da *Spirulina* em força iônica 0,01 e 0,1, segmentadas e linearizadas pelas funções de Gran modificadas, assim como a curva ajustada por regressão não linear.

Foram caracterizadas cinco classes de grupos tituláveis, sendo que HA₁ e HA₂ foram tituladas em uma região de pH típica para grupamentos carboxílicos, os quais podem ser devidos a resíduos dos aminoácidos ácido aspártico e glutâmico constituintes do material proteico da parede celular. Grupos carboxílicos podem ainda ser provenientes de algínatos, que são cadeias poliméricas constituintes da parede celular de algas. A classe de sítios HA₃ pode ser atribuída a grupos imidazólicos dos resíduos de histidina do material proteico, uma vez que o valor de p^cK observado é característico para esta natureza de sítios ionizáveis. Os sítios HA₃ poderiam ainda ser atribuídos a grupos carboxílicos que estariam sendo titulados com p^cK anormalmente alto devido a interações eletrostáticas causadas pela criação do campo elétrico decorrente da desprotonação de outros grupos carboxílicos, ou ainda devido a interações locais causadas pela proximidade de outros grupos funcionais na parede celular. Esta possibilidade, porém, deve ser encarada como mais remota¹⁸. As classes HA₄ e HA₅ podem ser atribuídas a grupamentos

Tabela 1. Concentração e p^cK dos sítios ionizáveis determinados na superfície de *Spirulina* por titulação potenciométrica ácido-base em meio iônico de NaNO₃ 0,01 e 0,1 mol L⁻¹, à 25,0 ± 0,1°C.

Sítio Ionizável	Meio Iônico				
	NaNO ₃ 0,01 mol L ⁻¹			NaNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹	
	Concentração (mmol g ⁻¹)	p ^c K	Concentração (mmol g ⁻¹)	p ^c K	Δp ^c K
HA ₁	0,56±0,07	4,0 ₀ ±0,12	0,67±0,09	3,9 ₈ ±0,2 ₀	0,0±0,3
HA ₂	0,42±0,01	5,3 ₃ ±0,25	0,37±0,04	5,4 ₈ ±0,3 ₅	0,2±0,6
HA ₃	0,296±0,001	6,7 ₆ ±0,26	0,26±0,05	7,0 ₆ ±0,1 ₄	0,3±0,3
HA ₄	0,15±0,02	8,1 ₂ ±0,60	0,22±0,02	9,1 ₅ ±0,0 ₇	1,0±0,7
HA ₅	0,29±0,02	9,7 ₉ ±0,19	0,34±0,01	10,3 ₄ ±0,0 ₉	0,6±0,3
Total	1,7 ₂ ±0,12	-	1,8 ₆ ±0,1 ₈	-	-

- Resultados referem-se a média de três titulações para cada meio iônico.
- Δp^cK é a diferença entre o p^cK em força iônica 0,1 e 0,01.

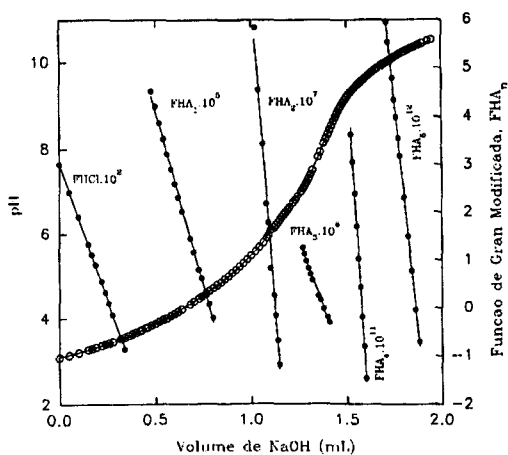


Figura 1. Curva de titulação de 51,50 mL de uma suspensão 2,06 g L⁻¹ de microalga *Spirulina* na presença de excesso de ácido forte (HCl) usando solução da NaOH 0,1243 mols L⁻¹ como titulante. Meio iônico predominante: NaNO₃ 0,10 mols L⁻¹. Curva experimental (-), funções de Gran modificadas (●), e curva ajustada por regressão não linear (○).

amínicos e fenólicos provenientes dos aminoácidos lisina e tirosina, respectivamente.

A importância de diferentes grupos funcionais na complexação de metais no ambiente aquático depende tanto da concentração destes grupos, como da concentração e natureza do metal. Os grupos carboxílicos contribuem com mais de 50% do total de sítios ionizáveis da *Spirulina*, o que explica em parte a importante contribuição de algas para complexação de metais presentes em elevadas concentrações em ambientes aquáticos. Em pHs próximos a neutralidade que são encontrados em águas naturais os grupos carboxílicos estariam disponíveis para processos de complexação (a competição com protons seria desprezível). Kiefer e colaboradores¹² demonstraram que a complexação de cobre com superfícies de algas verdes e diatomáceas não ocorre em grupos carboxílicos quando o metal está presente em baixas concentrações, mas sim em grupos contendo nitrogênio provenientes de histidina e lisina, que apresentam mais alta afinidade pelo metal. Estes sítios são, entretanto, rapidamente saturados pois estão presentes em pequenas quantidades, de modo que apenas regulam a concentração livre de metal se este estiver em baixas concentrações. Em pHs acima de 7 a hidrólise dos metais pesados e a consequente formação de hidróxidos insolúveis passa a ser o fator de maior importância para sua remoção da fase aquosa.

A soma das concentrações das classes de sítios ionizáveis HA₁ a HA₅ fornece a capacidade total de ligação de prótons, que foi determinada como sendo 1,75±0,10 e 1,86±0,20 mmols g⁻¹ em força iônica 0,01 e 0,10 respectivamente. Considerando-se que as duas médias referem-se a triplicatas de titulações, a comparação de seus valores e as respectivas estimativas de desvio padrão levam a um valor experimental de t = -0,85, que comparado ao valor tabelado de 2,78 (4 graus de liberdade e 95% de confiança)¹⁵ indica que não existe diferença estatisticamente significativa entre as concentrações determinadas nas duas condições de força iônica. O mesmo se observa quando o teste t é aplicado para cada uma das classes HA₁ a HA₅, o que sugere que não existem alterações conformacionais na superfície da alga com a mudança de meio iônico de 0,01 para 0,10 mols L⁻¹ (NaNO₃).

Quando a titulação foi realizada em presença de NaNO₃ 1,0 mol L⁻¹ observou-se que uma quantidade muito maior de solução titulante de NaOH foi necessária para completar a titulação. Uma vez que a massa de alga era aproximadamente a mesma utilizada nas titulações em meio iônico predominantemente de NaNO₃ 0,01 ou 0,10 mols L⁻¹, pôde-se concluir que estariam ocorrendo alterações conformacionais significativas em força

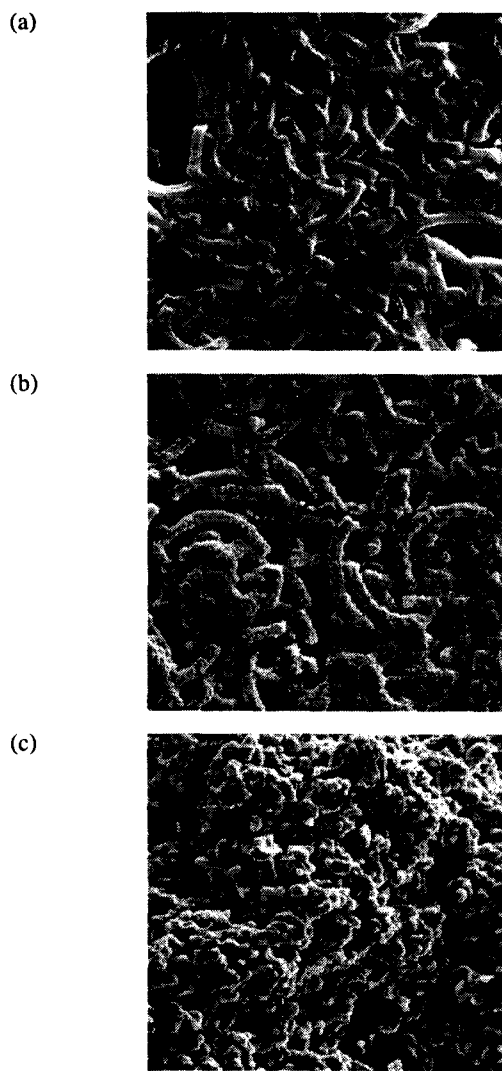


Figura 2. Imagens de microscopia de varredura eletrônica da microalga *Spirulina* em NaNO₃ 0,01 (a), 0,10 (b) e 1,0 (c) mol L⁻¹. (Escala para as três fotos).

iônica elevada, com possível ruptura da parede celular e titulação do material proteico do interior da célula. Esta suposição foi confirmada pelas fotografias de microscopia de varredura eletrônica que são mostradas na figura 2 e sugerem que a estrutura cilíndrica da alga é preservada em NaNO₃ 0,01 e 0,10 mol L⁻¹, mas não em NaNO₃ 1,0 mol L⁻¹.

Os cerca de 1,8 mmols g⁻¹ de grupos ionizáveis determinados para a *Spirulina* estão coerentes com valores de capacidade total de ligação de prótons obtidos para outros tipos de algas ou superfícies vegetais de meio aquático. Pode-se mencionar a determinação de 2 mmols g⁻¹ para fitoplancton marinho *Dunaliella tertiolecta*¹⁶, 1 a 2 mmols g⁻¹ para parede celular de alga *Vaucheria*¹⁷ e biomassa de plantas marinhas¹ e 2,6 mmols g⁻¹ para *Sargassum*¹³.

Kiefer e colaboradores¹² determinaram 0,97 mmols g⁻¹ para a diatomácea *Cyclotella cryptica* e 0,91 mmols g⁻¹ para a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Apesar dos valores similares encontrados para as duas espécies, as formas de curvas de titulação sugerem uma maior variedade de tipos de grupos tituláveis na superfície da alga verde em relação à diatomácea, que é discutido pelos autores, mas não é quantificado pelo modelo eletrostático empregado, que assume para as duas espécies de algas a presença de duas classes de sítios ionizáveis, sendo uma na região de pH < pHzpc e outro na região de pH

>pHzpc (pHzpc é o pH no ponto de carga zero). No modelo eletrostático as curvas de titulação são representadas de maneira genérica por¹⁹:

$$pH = pK_{inlHA_n} - \log[X_{HA_n}/(1-X_{HA_n})] + 0,434e\psi/kT \quad (8)$$

onde K_{inlHA_n} é a constante de dissociação intrínseca para um sítio titulável n. Esta é constante de dissociação na ausência de interações eletrostáticas. X_{HA_n} é o grau de dissociação do sítio n, e é a carga do próton, k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e ψ é o potencial elétrico na superfície da macromolécula. O termo $0,434e\psi/kT$ é relacionado ao trabalho envolvido para remover o próton de seu sítio ionizado contra as forças eletrostáticas exercidas por outros grupos carregados na macromolécula e é dependente da força iônica da solução, da densidade de carga sobre a macromolécula e da sua rigidez. Para macromoléculas que apresentam baixa acumulação de carga durante a titulação e têm estrutura rígida, a contribuição do termo $0,434e\psi/kT$ é pequena, principalmente em meios de força iônica elevada. Quando o modelo de distribuição de sítios discretos é adotado, o termo $0,434e\psi/kT$ é desprezado e a suspensão é tratada como se fosse composta por uma mistura de ácidos monoprotônicos. Isto certamente é uma aproximação, assim como é uma aproximação dos modelos eletrostáticos desprezar a heterogeneidade química na superfície das algas.

As constantes de ionização determinadas para as cinco classes de sítios ionizáveis sofrem pouca influência com a variação da força iônica do meio, sugerindo que a heterogeneidade química da superfície celular da spirulina é o fator principal que governa as curvas de titulação. A influência de interações eletrostáticas foi muito pouco pronunciada, de modo que o termo $0,434e\psi/kT$ pode ser desprezado nestas titulações. Isto pode ser explicado pela baixa densidade de carga acumulada na spirulina, bem como por sua estrutura rígida. O número total de sítios ionizáveis na *Spirulina* (1,8 mmols g⁻¹) é significativamente inferior ao existente em polieletrólitos como o ácido algínico e ácido poliacrílico, que apresentam respectivamente 5,7 e 13,9 mmols de grupos carboxílicos por grama. Além disso, estes polieletrólitos apresentam estrutura flexível e homogeneidade química dos sítios ionizáveis - todos os grupos são carboxílicos, localizados em ambientes idênticos na macromolécula - de modo que as interações eletrostáticas exercem influência marcante nas curvas de titulação. O ácido algínico é constituinte da parede celular, mas a contribuição de sua flexibilidade e consequente variação de volume nas titulações de suspensões de algas é diminuída por estar preso na matriz celulósica rígida da parede celular¹³.

CONCLUSÕES

Os métodos de cálculo, propostos inicialmente para determinação de ácidos em misturas, mostraram-se adequados para caracterização ácido base da superfície da alga *Spirulina*, adotando-se o modelo de distribuição de sítios discretos. A metodologia pode ser aplicada na caracterização de superfícies de

outras espécies vegetais, permitindo quantificar não só os grupos em maior concentração como os carboxílicos, mas também grupos de menor concentração como os imidazólicos e amínicos que apresentam alta afinidade por determinados metais pesados e exercem importante papel na complexação destes metais quando presentes em baixas concentrações.

Recomenda-se que as titulações ácido base sejam realizadas em pelo menos dois valores de força iônica constantes para avaliar-se a influência de interações eletrostáticas na interpretação dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Fourest, E.; Volesky, B.; *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 277.
2. Godinho, O. E. S.; Aleixo, L. M.; *Quím. Nova* **1987**, *10*, 2.
3. Seymour, M. D.; Clayton, J. W.; *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1429.
4. Aleixo, L. M.; Godinho, O. E. S.; Costa, W. F. da; *Anal. Chim. Acta.* **1992**, *257*, 35.
5. Masini, J. C.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *283*, 803.
6. Masini, J. C.; *Talanta* **1994**, *41*, 1383.
7. Masini, J. C.; Godinho, O. E. S.; Aleixo, L. M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, *360*, 104.
8. Masini, J. C.; Abate, G., de Lima, E. C.; Hahn, L. C.; Nakamura, M. S.; Lichtig, J.; Nagatomy, H. R.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *364*, 223.
9. Nakaya, N.; Homma, Y.; Goto, Y.; *Nutrition Reports International* **1988**, *37*, 1329.
10. Lacaz-Ruiz, R.; *VII Jornada de Bioquímica*, Universidade Estadual de Londrina 1988.
11. Pehrson, L.; Ingman, F.; Johansson, A.; *Talanta* **1976**, *23*, 769.
12. Kiefer, E.; Sigg, L.; Schosseler, P.; *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 759.
13. Schiewer, S.; Volesky, B.; *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 1683.
14. da Costa, W. F.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1989.
15. Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Limited, Chichester, W. Sussex 1988; p 53.
16. Gonzalez-Davila, M.; Santana-Cassiano, J. M.; Perez-Pena, J.; *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 289.
17. Crist, R. H.; Oberholser, K.; Shank, N.; Nguyen, M.; *Environ. Sci. Technol.* **1981**, *15*, 1212.
18. Choppin, G. R.; *J. Less-Common Met.* **1985**, *112*, 193.
19. Marinsky, J. A.; Reddy, M. M.; *Org. Geochem.* **1984**, *7*, 207.