

Análise estatística aplicada a comparação de métodos para determinação de pKa de indicador ácido-base por espectroscopia UV-Vis

Statistical analysis applied to comparison of methods for determining the pKa of acid-base indicator by UV-Vis spectroscopy

Joyce Laura da Silva Gonçalves¹, Paulo Cesar Leme¹

¹Universidade Federal de Mato Grosso

Resumo

O pKa define a espécie protolítica predominante presente em solução em função do pH. Isso impacta em diversas propriedades físico-químicas, especialmente nas mudanças visuais de coloração da solução para indicadores ácido-base. Tais mudanças podem ser acompanhadas microscopicamente por espectroscopia ultravioleta/visível. Este trabalho apresenta uma comparação estatística de abordagens gráficas e analítica para a determinação de pKa do indicador ácido-base verde de bromocresol (VB) a partir de seus espectros de absorção em função do pH. A metodologia consistiu na quantificação das espécies coexistentes em solução por quimiometria e a determinação de pKa por três métodos distintos: (I) interseção das curvas lineares, (II) interseção de eixo e (III) analítico. Os resultados mostraram que duas variáveis explicam 99% da variância contida nos dados do VB, indicando a coexistência de duas espécies em equilíbrio em uma única transição em função do pH. Os valores de pKa foram $4,22 \pm 0,05$; $4,75 \pm 0,12$ e $4,50 \pm 0,02$ pelos métodos I, II e III, respectivamente. A análise estatística indicou que o método I é significativamente diferente dos demais, o método II é o mais exato e o método III é o mais preciso. Ressalta-se que a estatística aliada à experimentação pode aprofundar a interpretação das análises e o conhecimento científico como um todo.

Palavras-chave: Química Analítica, Indicador de pH, Volumetria, Análise de componentes principais, Análise multivariada.

Abstract

The pKa defines the predominant protolytic species present in solution as a function of the pH. This impacts several physicochemical properties, especially the visual color changes of the solution for acid-base indicators. Such changes can be microscopically monitored by ultraviolet/visible spectroscopy. This paper presents a statistical comparison of graphical and analytical approaches of pKa determining for acid-base indicator bromocresol green (VB) through its absorption spectra as a function of pH. The methodology consisted of chemometric quantifying of the coexisting species in solution and determining pKa by three different methods: (I) intersection of linear curves, (II) intersection of axis and (III) analytical. The results showed that two variables explain 99% of the variance contained in the VB data, indicating the coexistence of two species in equilibrium and a single transition as a function of the pH. The pKa values were 4.22 ± 0.05 ; 4.75 ± 0.12 and 4.50 ± 0.02 by methods I, II and III, respectively. Statistical analysis indicated that method I was significantly different from the others, method II was the

most accurate and method III is the most precise. It should be noted that statistics put along with experimentation can improve the interpretation of analyzes and scientific knowledge across-the-board.

Keywords: Analytical Chemistry, pH indicator, Volumetric, Principal component analysis, Multivariate analysis.

Introdução

A volumetria é uma técnica baseada na medida do volume requerido de um reagente de concentração conhecida para reagir completamente com um analito [1]. Através de cálculos estequiométricos é possível determinar-se a concentração do analito em questão. É certamente, uma das técnicas mais difundidas em química devido a sua vasta aplicabilidade na determinação de concentração de ácidos, bases, oxidantes, redutores, íons metálicos, proteínas, entre outras espécies [2].

Na técnica clássica de volumetria de neutralização tal processo é estimulado visualmente pela mudança de coloração da solução em valores de pH específico a depender do tipo de ácido e/ou base empregado, indicando que o ponto final da titulação foi atingido. Para sua realização é necessário empregar uma substância que acuse visualmente o ponto final de uma titulação, chamada de indicador de pH ou ácido-base [3]. A ação desses indicadores depende de um equilíbrio químico dinâmico entre a sua forma protonada e desprotonada, descrita pela seguinte equação:



onde HIn representa o indicador na forma protonada, o íon In^- é sua base conjugada (forma desprotonada) e H_3O^+ é o íon hidrônio. Se o equilíbrio químico dinâmico estiver deslocado para a esquerda observa-se a cor da forma protonada em virtude da predominância desta espécie, enquanto que se estiver deslocado para a direita observa-se a cor da espécie desprotonada [2]. Quando a concentração do ácido e da base conjugada são iguais o pH é igual ao pKa. Ou seja, 50% do indicador está em sua forma protonada e 50% na forma desprotonada [4,5].

As propriedades físicas, químicas e fotofísicas dos compostos estão atreladas ao pH da solução que se relaciona as concentrações das espécies em equilíbrio e com o pKa. Por isso as determinações de pKa são consideradas relevantes em várias áreas do conhecimento tecnológico, em especial no estudo envolvendo compostos pouco solúveis [5-7], na atividade farmacológica [8], acumulação celular e atividade fotodinâmica [9] entre outras. Isso se deve, principalmente, ao fato do pKa de um composto influenciar qual espécie está predominantemente no meio em um determinado pH, o que impacta em propriedades como solubilidade, lipofilicidade, interação proteica e permeação da membrana celular [10].

A espectroscopia UV-Vis é tradicionalmente um dos métodos mais empregados na determinação de pKa de compostos devido a sua disponibilidade, precisão, simplicidade e reprodutibilidade [11,12]. Essa metodologia vem ganhando cada vez mais espaço nas análises químicas em virtude de atuar como elo entre o mundo microscópico das transições eletrônicas e macroscópico das cores que se pode visualizar materialmente. Esta técnica experimental aliada a diferentes abordagens matemáticas, analíticas e/ou computacionais podem aprofundar o conhecimento científico e tecnológico, em especial no âmbito acadêmico.

Dentre as abordagens supracitadas, os métodos estatísticos vêm, cada vez mais, embasando os diversos documentos acadêmicos e científicos. Os profissionais das diversas áreas científicas difundiram o uso desta ferramenta para respaldar suas pesquisas [13-17]. Segundo Passari e colaboradores (2011) “as aplicações da estatística se desenvolveram de tal forma que praticamente todas as áreas de pesquisa e produção se beneficiam da utilização de seus métodos” [18]. Em sua maioria, estas análises são realizadas de forma univariada. No entanto, somente experimentos multivariados possibilitam correlacionar estes fatores e evidenciar as interações significativas [19].

A análise de componentes principais (ACP) é uma das técnicas de reconhecimento de padrões mais difundidas entre as análises multivariadas [20]. Ela é baseada na busca de similaridade entre os dados resultando em um modelo matemático que representa graficamente as variáveis mais representativas do sistema, denominadas componentes principais. Segundo Pereira e colaboradores (2014), a ACP “descreve as inter-relações dentro de um conjunto de variáveis e reduz o número de variáveis sem perda significativa de informação, preservando a variância (quantidade informações original)” [21].

Em relação às análises estatísticas de comparação e validação de métodos, os testes de significância são os mais relevantes [22]. Ao se fazer um teste de significância, está se verificando a validade de uma hipótese nula. Assumindo a validade de tal hipótese, significa que não há qualquer outra diferença entre os métodos, exceto aquela atribuída a erros aleatórios [23,24].

Para a comparação entre pares de média, o intervalo de confiança a média é um desses testes que considera o desvio padrão, o número de repetições e um coeficiente derivado da distribuição t bicaudal [13] para inferir se a hipótese nula é aceita ou se deve ser rejeitada, caracterizando a existência ou não de diferença significativa entre os dados. Já para o teste t de Student pareado é calculado um valor entre duas médias, baseando-se nos parâmetros estatísticos supracitados que é então comparado a valores críticos. Se o valor calculado exceder o valor crítico, então a hipótese nula deve ser rejeitada, indicando que há diferença significativa entre os dados, ocasionada por outros fatores, além do erro aleatório [24].

Quando se deseja proceder à comparação entre mais de duas médias de populações pode-se empregar a análise de variância (ANOVA) [2]. Este teste é baseado na comparação múltipla de fatores ou tratamentos em diferentes níveis para inferir a veracidade da hipótese nula. Esta análise não identifica quais métodos diferem estatisticamente para os casos em que ela acusou diferenças significativas. Para classificar essas diferenças é necessário usar um teste adicional, como por exemplo, o teste de Tukey que é baseado no método da diferença menos significativa [2,22]. Ressalta-se que todos os testes de significâncias devem ser realizados considerando um nível descritivo ou significância de probabilidade, p , que atesta a probabilidade de se rejeitar uma hipótese nula verdadeira.

Isto posto, este trabalho apresenta uma proposta experimental para comparação estatística de diversas metodologias para a determinação de pKa de indicador ácido-base. Especificamente, analisou-se os espectros de UV-Vis para determinação quimiométrica do número de espécies coexistentes em função do pH, calculou-se o pKa do indicador empregando duas abordagens gráficas distintas e uma terceira abordagem analítica, aplicou-se testes estatísticos de significância no intuito de verificar a equivalência e/ou supremacia dos métodos estudados e classificou-se os métodos quanto sua precisão e exatidão.

2 Parte Experimental

2.1 Reagentes

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou-se o corante Verde de Bromocresol (VB: tetrabromometacresolsulfonoftaleína, Synth, $MM = 698,05 \text{ g mol}^{-1}$), cuja estrutura molecular está representada na Figura 1. Os demais compostos utilizados foram ácido clorídrico (Sigma-Aldrich), hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich), fosfato monobásico de sódio (Merck), acetato de sódio (Merck), cloreto de sódio (Merck) e água deionizada. Todos os reagentes foram de grau analítico e sem purificações prévias.

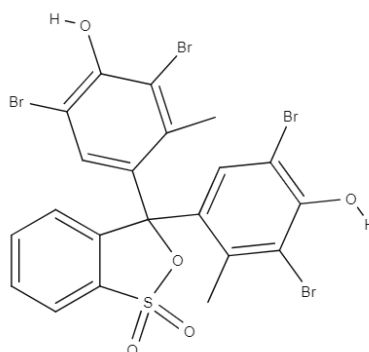


Figura 1: Estrutura molecular do indicador ácido-base verde de bromocresol.

2.2 Procedimento

Foram preparadas soluções de VB em solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ com concentração na ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, cuja concentração obedece a Lei de Beer-Lambert. Para a obtenção dos espectros de absorção realizou-se titulações dessas soluções em função do pH por meio de um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 25, utilizando-se cubeta de quartzo, com duas faces polidas, caminho ótico de 1,00 cm e varredura entre 300nm a 700nm. O pH foi variado na faixa de 0,5 a 13,5 utilizando-se alíquotas de soluções estoques de HCl e NaOH em várias concentrações, e tomando-se medidas a cerca de 0,5 unidade de pH. As mudanças de valores de pH das soluções foram controladas por meio do pHmetro de bancada QUIMIS, modelo Q400AS com um eletrodo de Ag/AgCl. Todos os experimentos foram conduzidos a 25°C .

2.3 Análise dos dados

A análise de componentes principais (ACP) foi aplicada com a ajuda do software livre Past 4.05 no intuito de se determinar o número de espécies presentes no equilíbrio químico em função do pH. Esta análise estatística multivariada gera um modelo sintetizando as componentes mais significativas do sistema de dados de entrada em que cada componente principal corresponde a uma reta tridimensional que expressa a máxima variância contida desses dados [20,21]. O conjunto espectral de UV-Vis do VB em função do pH foi analisado considerando cada componente principal como uma espécie protolítica. Para as metodologias de obtenção de pKa o perfil espectral foi atribuído a um comprimento de onda máximo de absorção para a espécie A^- e HA , respectivamente [25]. Considerou-se a banda centrada em 443nm para a espécie protonada e a banda centrada em 615nm para a espécie desprotonada. O pKa foi determinado através do comportamento espectral em função do pH empregando duas metodologias distintas: gráfica e analítica.

- a- Metodologia gráfica: (I) o pKa foi encontrado como sendo o ponto de interseção de duas curvas lineares provenientes de um gráfico da absorbância em função do pH, no comprimento de onda máximo de absorção de cada uma das espécies do equilíbrio [11];
(II) a obtenção do pKa foi proveniente da interseção do eixo x em um gráfico de $\log [(A_{HA}-A)/(A-A_{A-})]$ em função do pH, onde A_{HA} e A_{A-} é absorção da espécie protonada e desprotonada, respectivamente [26].
- b- Metodologia analítica (III): o pKa foi determinado segundo o método proposto por Albert e Serjeant (1984) [27], através das seguintes equações:

$$pK_a = pH + \log[(A_i - A_{HA})/(A_{A-} - A_i)] \text{ se } A_{A-} > A_{HA} \quad \text{Equação 2}$$

$$pK_a = pH + \log[(A_{HA} - A_i)/(A_i - A_{A-})] \text{ se } A_{A-} < A_{HA} \quad \text{Equação 3}$$

onde A_{HA} , A_{A-} e A_i representam a absorção da espécie protonada, desprotonada e da mistura, respectivamente.

A análise estatística foi baseada em testes de significância de intervalo de confiança para a média, teste t pareado e ANOVA seguida de Tuckey, todos com 95% de confiança [2, 22-24]. O procedimento de análise estatística já havia sido descrito detalhadamente na literatura [17].

Para análise de exatidão do método, foi empregado o cálculo do erro relativo [28], calculado segundo a equação 4.

$$Er = \frac{x_i - x_v}{x_v} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde Er representa o erro relativo, X_i representa o valor médio de pKa determinado pelo método proposto e X_v representa o valor verdadeiro descrito na literatura [29].

Já a determinação da precisão do método foi feita através do desvio padrão relativo do método, também conhecido como coeficiente de variação, calculado segundo a equação 5.

$$CV = \frac{s}{x} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde CV representa o coeficiente de variação (desvio padrão relativo), s representa o desvio padrão do pKa determinado pelo método proposto e x representa o valor médio de pKa determinado pelo método proposto [29].

3 Resultados e discussão

Os espectros de absorção do VB em função do pH estão apresentados na Figura 2. Em solução extremamente ácida foi observada uma única banda centrada em 443 nm. Com o aumento do pH houve uma diminuição nesta banda e um deslocamento hipsocrômico para cerca de 398 nm, além do surgimento de uma nova banda principal centrada em 615 nm e de outra secundária centrada em 308 nm. Em meio neutro e alcalino não foram identificadas mudanças espectrais adicionais. Estas observações estão em consonância com a literatura [30,31].

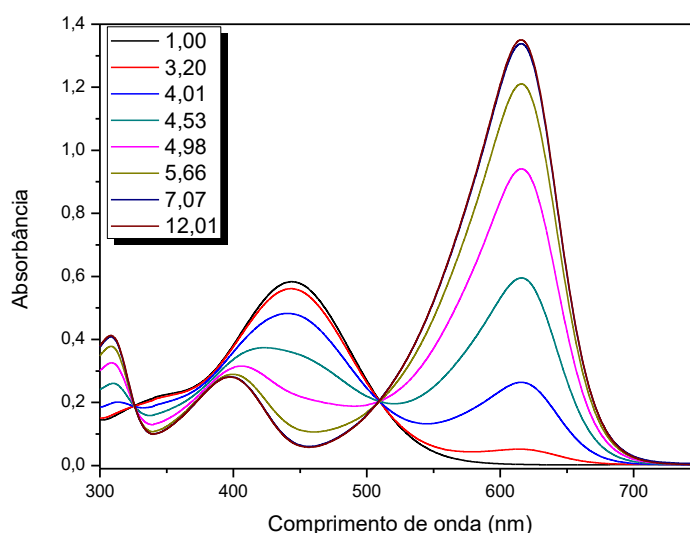


Figura 2: Espectros de absorção do VB em função do pH.

A análise de ACP mostrou que duas variáveis (PC1 e PC2) explicam 99,9% da variância contida nos dados, indicando assim a coexistência de duas espécies em equilíbrio na solução em função do pH.

Além disso, identificou-se visualmente um único ponto isobéstico em 508 nm, ratificando a coexistência de duas espécies em função do pH. Esses resultados estão de acordo com a estrutura química do corante e corroboram com estudos prévios [25,32,33].

Esta ferramenta quimiométrica vem sendo aplicada no intuito de elucidar os equilíbrios iônicos de protonação, em especial de sistemas complexos. Batistela e colaboradores (2011) usaram ACP na quantificação de espécies presentes em função do pH para diversos derivados de xantonas e observaram que a análise quimiométrica foi eficaz desde sistemas simples em que se fazem presente duas espécies, até sistemas complexos de até seis espécies coexistindo em equilíbrio. Para sistemas complexos, os autores descreveram um alto grau de dificuldade de aplicação do método comumente empregado- de derivação de primeira e segunda ordem, que foi facilmente sanado pelo método quimiométrico [34].

As duas espécies do corante VB caracterizadas pela ACP foram aqui denominadas protonada e desprotonada, cujo comprimento de onda máximo da absorção foi 443 e 615 nm, respectivamente. O equilíbrio químico para esta desprotonação pode ser descrito por:



Onde *HVB* é a forma protonada, *VB⁻* é sua base conjugada (desprotonada) e *H₃O⁺* é o íon hidrônio. Esse mesmo equilíbrio também foi proposto anteriormente por Auburn e colaboradores (1971) [35]. Essas mudanças nas transições eletrônicas em função do pH acarretaram na mudança de coloração do VB de amarelo em pH abaixo de 3 para azul em solução com pH acima de 5. Fato este, que faz desta molécula um excelente indicador de ponto final para volumetria de neutralização, em especial nas titulações de ácidos fortes como bases fracas. Em virtude do objetivo deste trabalho, a maioria das discussões vindouras estarão relacionadas predominantemente com as metodologias de determinação de pKa obtido por espectroscopia UV-Vis.

3.1 Determinação do pKa por métodos gráficos

O primeiro método gráfico empregado neste estudo estabeleceu uma relação entre a absorção da espécie protonada e desprotonada em função do pH (Figura 3). O pKa foi obtido por meio da resolução da equação matemática que determina o ponto de interseção das retas de ambas as espécies (metodologia I).

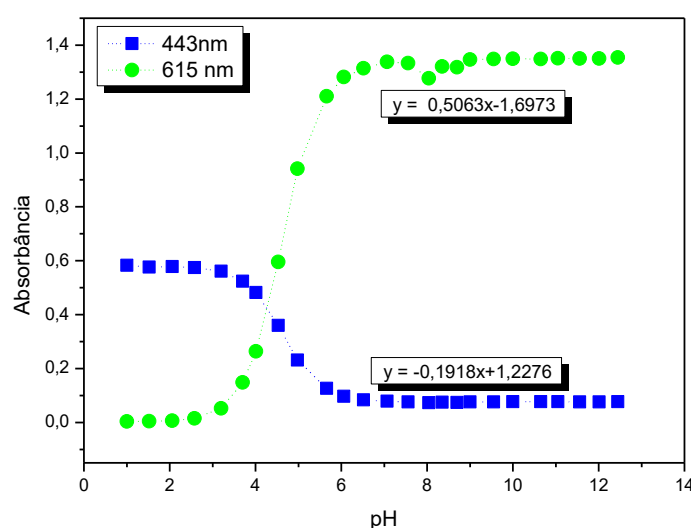


Figura 3: Absorção das espécies de VB protonada (443 nm) e desprotonada (615 nm) em função do pH.

Para isso determinou-se a equação da reta gerada pelo método dos mínimos quadrados para a relação linear entre a absorção da espécie protonada (443nm) em função do pH, empregando-se os espectros obtidos em pH abaixo de 6. O mesmo processamento de dados foi aplicado para a espécie desprotonada (615nm). Finalmente, a equação obtida para a espécies protonada foi igualada com a equação obtida para a espécie desprotonada (Equação 7), determinando-se o valor de x que corresponde ao pH exato em que coexiste 50% de cada espécie, isto é, ao valor de pKa do composto em questão, conforme Equação 8.

$$0,5063x - 1,6973 = -0,1918x + 1,2276 \quad \text{Equação 7}$$

$$x = \frac{2,9249}{0,6981} = 4,1898 \quad \text{Equação 8}$$

No segundo método gráfico (metodologia II), empregou-se o intercepto da regressão linear, dos pontos obtidos no espectro de absorção das espécies protonada e desprotonada com o eixo y aplicada em um gráfico de pH em função de $\log [(A_{HA}-A)/(A-A_{A-})]$ (Equação 9). A absorção da espécie protonada (A_{HA}) foi determinada como sendo a absorção em 443 nm em pH igual a 1, a absorção da espécie desprotonada (A_{A-}) foi a absorção em 615 nm em pH igual a 6 e A foram as absorções das espécies intermediárias (Figura 4). Para melhor visualização da reta, este método também restringiu a análise ao meio ácido, uma vez que, não foram observadas mudanças espectrais significativas em meio neutro e alcalino. O pKa foi obtido através da resolução da seguinte equação 10.

$$\log \left[\frac{(A_{HA} - A)}{(A - A_{A-})} \right] = 0 = 1,0057x + 4,6875 \quad \text{Equação 9}$$

$$pKa = x = 4,6609 \quad \text{Equação 10}$$

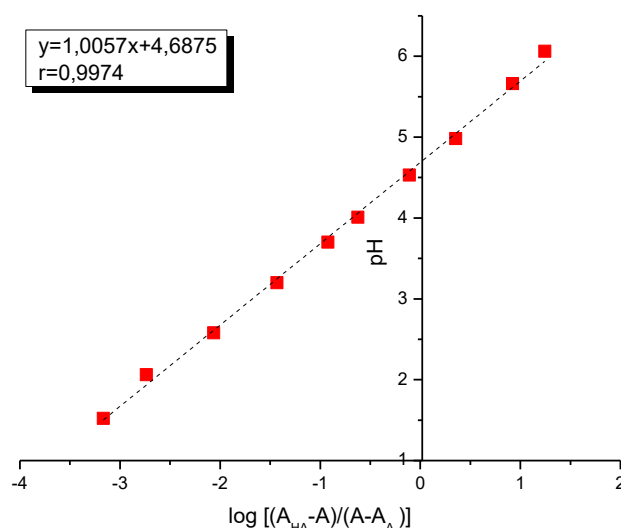


Figura 4: Determinação do pKa do VB através da representação gráfica.

Para o cálculo empregando-se o terceiro método (metodologia III) a equação 2 foi aplicada, considerando o pH de 4,01. Este pH foi escolhido em função de apresentar as bandas de absorção de ambas as espécies em cerca de 50%. Analogamente às metodologias anteriores, foram obtidos os

valores de pKa considerando o intervalo de espectros até pH 6. O valor de pKa obtido por esta metodologia foi $4,50 \pm 0,02$.

A síntese dos valores de pKa obtidos por todos os métodos analisados neste estudo estão descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação do pKa para o indicador de pH VB (n=3).

Metodologia	pKa	Intervalo de confiança para a media ($p < 0,05$)
I	$4,22 \pm 0,05$	$4,10 < \mu < 4,34$
II	$4,75 \pm 0,12$	$4,45 < \mu < 5,05$
III	$4,50 \pm 0,02$	$4,45 < \mu < 4,55$

Fonte: Autoria própria.

Vários testes de hipóteses foram aplicados sobre os três métodos empregados e, de maneira geral, todos eles apontaram diferenças significativas entre os métodos. O primeiro deles foi o intervalo de confiança para a média. Estatisticamente os intervalos de confiança para os valores de pKa do corante calculados pelos métodos II e III se sobrepuseram, fazendo com que a hipótese nula fosse aceita e, consequentemente não indicando a existência de diferenças significativas entre esses métodos. Todavia, tal análise rejeitou a hipótese nula para o primeiro método e o classificou como diferente dos demais métodos.

A Tabela 2 lista os principais resultados da aplicação dos testes t pareado e ANOVA ($p < 0,05$) como ferramenta estatística para verificar a equidade dos diferentes métodos aplicados na determinação de pKa.

Tabela 2: Comparação estatística pareada dos valores de pKa determinados pelos diferentes métodos.

Teste t pareado	Teste F	I e II	II e III	I e III	Valor crítico
	Teste t	5,67	2,84	7,49	4,30
		5,67	2,84	7,49	4,30
ANOVA		Teste F		23,56	9,55
		Valor de p		0,0146	0,05

Fonte: Autoria própria.

Para comparação empregando o teste t pareado, o valor determinado de pKa por cada método foi agrupado em pares, a saber: (i) I e II, (ii) II e III e (iii) I e III, sendo que o teste F evidenciou que os desvios-padrão de todas os métodos eram comparáveis e, consequentemente, eles poderiam ser rearranjados em uma variância global [24]. Essa evidência foi oriunda do fato do $F_{\text{crít}}$ ser maior que o F_{cal} , causando o aceite da hipótese nula (dados não mostrados).

Referente ao teste t pareado, a hipótese nula foi aceita, evidenciando que não há diferenças significativas entre os métodos II e III. No entanto, os demais pares de métodos apresentaram o valor de t_{cal} superior ao $t_{\text{crít}}$, rejeitando a hipótese nula nesses casos e, consequentemente, acusando a diferença significativa entre o método I dos demais métodos.

Em relação à análise de variância (ANOVA) utilizando um único fator, observou-se que o valor de F_{cal} que foi maior que o $F_{\text{crít}}$ rejeitando-se a hipótese nula e, classificando-se assim, os métodos como estatisticamente diferentes. O valor de p também foi menor que o limite de confiança estabelecido confirmando a suposição de que os métodos não são iguais. O teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou a existência de diferenças significativas apenas entre os métodos I e II, corroborando com os resultados do intervalo de confiança e elucidando a análise para o teste t pareado.

Em relação à análise estatística de indicadores ácido-base, Silva e colaboradores (2017) também empregaram o intervalo de confiança e o teste t pareado para comprovar que indicadores naturais podem substituir a fenolftaleína para indicar o ponto final de titulações volumétricas [36]. Shalaby e Mohamed (2020) também compararam através de teste t pareado os valores pKa de diversos

indicadores obtidos através de imagens digitais e compararam com os valores de pKa obtidos por espectroscopia por meio do programa computacional Datan [37]. Amador-Hernández e colaboradores (2014) também empregaram ANOVA para comparar o valor de pKa de indicadores ácido-base em função do método de obtenção e não encontraram diferenças significativas entre os valores de pKa obtidos pelo programa computacional SQUAD, que é comumente empregado para determinação de pKa e por três métodos quimiométrico distintos [25].

Considerando-se o valor de pKa para o VB de 4,9 descrito na literatura [29] determinou-se o erro relativo médio como sendo cerca de 14, 3 e 8% (negativamente) para os métodos I, II e III, respectivamente. Também foi determinado o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) em que se obtiveram os valores de 1,18; 2,53 e 0,44%. O erro relativo está atrelado à exatidão do método, enquanto o desvio padrão relativo está atrelado à precisão do método. Em ambos os casos, a propriedade em questão é inversamente proporcional à determinação estatística. Desta forma, o método que apresentou a maior precisão foi o método III e exatidão foi o método II.

Finalmente, a estatística respaldou a análise de que os três métodos empregados neste estudo podem ser considerados satisfatórios resultando em valores calculados de pKa próximo ao valor tabelado, resultando em um erro e desvio padrão relativos aceitáveis em todos os casos. Este trabalho é mais um exemplo de como a estatística pode dar subsídio às análises quantitativas não apenas da química, como também das diversas áreas das ciências, contribuindo significativamente para a construção do conhecimento acadêmico e científico.

4 Considerações Finais

A comparação estatística de diferentes métodos de obtenção de pKa baseado em espectroscopia UV-Vis foi o principal enfoque deste trabalho. Através dele foi avaliado a determinação espectrofotométrica de pKa de um indicador de pH sob o ponto de vista gráfico e analítico, concluindo que ambos podem ser empregados com eficácia e que resultam em valores similares aos previamente relatados na literatura.

A quimiometria auxiliou na elucidação do comportamento espectral deste indicador, acusando a existência de duas espécies em solução que foram explicadas por 99% da variância experimental da análise de componentes principais. Observou-se a mudança de cor de amarelo para azul por volta de pH 5 que foi caracterizada pelo deslocamento espectral batocrômico da banda principal de absorção de 443 para 615 nm e pela presença de um ponto isobéstico em 508 nm, confirmando a presença de duas espécies em solução.

Os valores de pKa para o referido indicador foram calculados a partir dos espectros de absorção na região do visível e obteve-se os valores $4,22 \pm 0,05$ e $4,75 \pm 0,12$ pelos métodos gráficos de intersecção de curvas e de intersecção de eixo, respectivamente e $4,50 \pm 0,02$ pelo método analítico. Os testes de intervalo de confiança para a média, teste t, ANOVA e Tukey ($p < 0,05$) confirmaram que o método gráfico de intersecção de curvas é diferente dos demais métodos estudados, todavia, o método gráfico de intersecção de eixo se mostrou igual ao método analítico. Este último foi classificado como o de maior exatidão, enquanto a maior precisão foi atingida pelo método de intersecção de eixo.

Desta forma, sugere-se o uso de ACP para quantificação de espécies existentes em função do pH em espectroscopia, principalmente em sistemas complexos em que a visualização dos pontos isobésticos seja dificultada e, conseqüentemente, a quantificação pela metodologia convencional torne-se confusa. Ressalta-se que esta metodologia pode ser desenvolvida em programas computacionais de código aberto, disponível *on-line* para *download* gratuito e que se mostrou promissora, mesmo submetendo-se poucos espectros de absorção ao tratamento quimiométrico.

5 Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar o seu agradecimento ao Laboratório de Estudos em Ciências de Materiais (LEMat), da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia e ao Prof. Dr. Daniel Garcez Santos Quattrociochi por suas significativas contribuições.

Referências

- [1] J. Terra, A. V. Rossi. Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais. *Química Nova*, 28 (2005) 166-171.
- [2] D. A. Skoog, D. M West, F. J. Holler, S. R Crouch. “Fundamentos de Química Analítica”, Cengage Learning, São Paulo, 2015.
- [3] N. M. S. de Vasconcelos. Fundamentos de Química Analítica Quantitativa. Fortaleza: EdUECE, 2019.
- [4] G. C. R. Medeiros. Determinação espectrofotométrica do pKa e desenvolvimento de dispersões sólidas da nova entidade química LPSF/FZ4: um promissor agente esquistossomicida. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- [5] T. H. Shayesteh, M. Radmehr, F. Khajavi, R. Mahjub, Application of chemometrics in determination of the acid dissociation constants (pKa) of several benzodiazepine derivatives as poorly soluble drugs in the presence of ionic surfactants. *Pharmaceutical Sciences*, 69 (2015) 44-50.
- [6] O. F. Shayesteh, S. M. Musavi, P. Mahjoub, Z. Ataie. Application of Chemometrics in determination of the effects of ionic and non-ionic surfactants on acid dissociation constant (pKa) of Meloxicam using spectrophotometric method. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 15 (2017) 1-7.
- [7] C. F. de Freitas, D. Vanzin, T. L. Braga, D. S. Pellosi, V. R. Batistela, W. Caetano, N. Hioka. Multivariate analysis of protolytic and tautomeric equilibria of Erythrosine B and its ester derivatives in ionic and non-ionic micelles. *Journal of Molecular Liquids*, 313 (2020) 1-11.
- [8] A. V. Thomaes, H. Wunderli-Allenspach, S. D. Kramer. Permeation of aromatic carboxylic acids across lipid bilayers: the pH-partition hypothesis revisited. *Biophysical Journal*, 89 (2005) 1802–1811.
- [9] M. N. O. Moritz, J. L. S. Gonçalves, I. A. P. Linares, J. R. Perussi, K. T. de Oliveira. Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 17 (2017) 39–47.
- [10] A. Zivkovic, J. J. Bandolik, A. J. Skerhut, C. Coesfeld, M. Raos. N. Zivkovic, V. Nikolic, H. Stark. Low field NMR determination of pKa values for hydrophilic drugs for students in medicinal chemistry. *Magnetochemistry*, 29 (2017) 1-8.
- [11] I. E. V. Salgado, C. Vargas-Hernández. Spectrophotometric determination of the pKa, isosbestic point and equation of absorbance vs. pH for a universal pH indicator. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5 (2014) 1290-1301.
- [12] J. H. Berkhout, A. Ram Hn. Recent advancements in spectrophotometric pKa determinations: a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53 (2019) 475-480.

- [13] R. Pfister, M. Janczyk. Confidence intervals for two sample means: Calculation, interpretation, and a few simple rules. *Advances in cognitive Psychology*, 9 (2013) 74-83.
- [14] A. D. P. Chiavegatto Filho. Uso de big data em saúde no Brasil: perspectivas para um futuro próximo. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 24 (2015) 325-332.
- [15] P. M da Silva. Metodologia estatística aplicada na análise da violência escolar: apuração e interpretação de dados na rede pública do estado de Goiás. *Revista on line de Política e Gestão Educacional*, 20 (2016) 322-336.
- [16] J. C. de Toledo, F. L. Lizarelli, M. A. A. Borrás, M. F. Martins. O uso da estatística em grandes e médias empresas de autopeças no estado de São Paulo, Brasil. *Innovar*, 28 (2018) 81-98.
- [17] J. L. S Gonçalves, W. S. O. Costa, G. C. P. Ribeiro, P. C Leme. Qual é o pH e a dureza da água que consumimos no vale do Araguaia? *Revista Panorâmica*, 3 (2020) 166-182.
- [18] L. M. Z. G. Passari, P. K. Soares, R. E. Bruns, I. S. Scarminio. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns. *Química Nova*, 34 (2011) 888-892.
- [19] B. Barros Neto, I. S. Scarmínio, R. E. Bruns. Como fazer experimentos- pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- [20] L. Valderrama, V. B. Paiva, P. H. Março, P. Valderrama. Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais. *Química Nova*, 39 (2016) 245-249.
- [21] P. C. S Pereira, C. F. de Freitas, C. S. Chaves, B. M Estevão, D. S. Pellosi, A. L. Tessaro, V. R. Batistela, I. S. Scarmínio, W. Caetano, N. Hioka. A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso de análise multivariada na determinação de pKa. *Química Nova*, 37 (2014) 1417-1425.
- [22] J. Mendham, R. C. Denney, J. D. Barnes, M. J. K, Thomas. *Voguel: Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- [23] J. N. Miller, J. C. Miller, R. D. Miller. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow: Pearson, 2016.
- [24] D. C. HARRIS. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC, 2013.
- [25] J. Amador-Hernández, A. Rojas- Hernández, E. M. Colunga-Urbina, I. M. de La Garza-Rodriguez, M. Velásquez-Manzanares, L. F Medina-Vallejo. New chemometric strategies in the spectrophotometric determination of pKa. *European Journal of Chemistry*, 5 (2014) 1-5.
- [26] G. S. Petterson. A simplified method for finding the pKa of an acid-base indicator by spectrophotometry. *Journal of Chemical Education*, 76 (1999) 395-398.
- [27] A. Albert, E. P. Serjeant. *The determination of ionization constants*. Nova Iorque: Chapman and Hall, 1984.
- [28] G. C. Moita, J. M. Moita Neto. *Estatística Aplicada a Química*. Teresina: EDUFPI, 2010.
- [29] J. Barbosa, Indicators acid-base, em “Encyclopedia of Analytical Science” pp.360-371, Elsevier, 2005. Disponível em “<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/acid-base-indicator>”. Acesso em 10/11/2011.

- [30] K. T. Lau, R. Shepherd, D. Diamond, D. Diamond. Solid state ph sensor based on light emitting diodes (led) as detector platform. *Sensors*, 6 (2006) 848-859.
- [31] X. Subirats, E. Fuguet, M. Rosés, E. Bosch, C. Ràlfols. Methods for pKa determination (I): potentiometry, spectrophotometry, and capillary electrophoresis, em “Elsevier Reference Module in Chemistry”, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2015.
- [32] H. Yamazaki, R. P. Sperline, H. Freiser. Spectrophotometric determination of pH and its application to determination of thermodynamic equilibrium constants. *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 2720-2725.
- [33] B. A. F Previdello, F. R de Carvalho, A. L. Tessaro, V. R. de Souza, N. Hioka. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos coloidais. *Química Nova*, 29 (2006) 600-606.
- [34] V.R. Batistela, D. S. Pelloso, F. D. Souza, W. F. Costa, S. M. O. Santin, V. R. Souza, W. Caetano, H. P. M. Oliveira, I. S. Scarminio, N. Hioka, pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solution by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79 (2011) 889-897.
- [35] J. J. Auborn, P. Warrick Jr, E. M. Eyring. Spectrophotometric dissociation field effect kinetics of aqueous acetic and bromocresol green. *The Journal of Physical Chemistry*, 75 (1971) 2488-2492.
- [36] A. F. S. Silva, L. M. Brito, J. L. S. Gonçalves. Extratos vegetais: uma alternativa à fenolftaleína no ensino de química analítica. *Revista Processos Químicos*, 12 (2018) 37-41.
- [37] A. A. Shalaby, A. A. Mohamed. Determination of acid dissociation constants of Alizarin Red S, Methyl Orange, Bromothymol Blue and Bromophenol Blue using a digital camera. *RSC Advances*, 10 (2020) 11311-11316.