mento a duas particulas distinctas em se dissolvendo n'agua.

Estas ultimas substancias, as que constituem anomalias cryoscopicas, são boas conductoras da electricidade, conduzem tanto melhor quanto mais accentuadas forem as anomalias e são chamadas *electrolytos*.

A acção da corrente electrica sobre estas substancias, assim dissolvidas, parece que decompõem suas molleculas em 2 partes.

O facto dos productos dessa decomposição serem attrahidos pelos electrodos, onde se depositam ou se desprendem, veio mostrar que possuiam, antes da separação, uma carga electrica, sem o que não se poderia comprehender a attração.

Serão elementos de carga positiva os que se accumularem no polo negativo e viceversa. Isto em virtude do conhecido principio de physica: as electricidades do mesmo nome repellem-se, as de nome contrario attrahem-se.

Chamou Foraday, *iontes* aos productos da decomposição, differenciando os aniontes dos cationtes, os primeiros carregados de electricidade negativa vão para o anodo (polo positivo), os segundos, carregados positivamente, vão ter ao catodo (polo negativo).

O phenomeno no seu conjuncto foi chamado *electrolyse*.

O facto da apparente divisão mollecular pela electricidade e o facto das animalias cryscopicas dos electrolytos que se explicariam por uma divisão analoga das molleculas dissolvidas, levaram Arrhenius a emittir, em 1887, a hypothese de que não só nos dois casos, o resultado dessa divisão era identico mas, que, na origem a divisão primordial era creada pela propria dissolução, sem intervenção da electricidade.

Os electrolytos, devido á dissolução, têm um maior ou menor numero de suas molleculas divididas em 2 partes.

Conforme a sua natureza o numero das molleculas desagregadas varia e augmenta com a diluição.

Os productos da desaggregação mollecular, os iontes,

antes da passagem da corrente electrica se acham dispersos no meio ambiente, ella sómente vem orientar estas entidades que não foram por si creadas.

Exemplifiquemos: de accordo com a theoria dos iontes (Arrhenius), que é assim ennunciada: "independentemente da passagem de qualquer corrente electrica, um dado electrolyto em solução é parcial ou totalmente decomposto em atomos ou agrupamento de atomos (radicaes), carregados de electricidade e que se denominam ions", o acido chlorhydrico HCl dissolvido contem, alem de molleculas HCl, forte proporção de iontes $\overset{+}{H}$ e $\overset{-}{Cl}$.

Tivemos occasião de dizer que a dissociação dos electrolytos varia com a concentração mollecular. A partir de certas diluições certos electrolytos são inteiramente dissociados.

Quanto mais diluida for a solução, maior será o numero de iontes, ao contrario se verificará nas soluções concentradas em que o numero de molleculas neutras augmenta em relação ao dos iontes.

Ha porém uma relação que permanece constante para a mesma temperatura; a relação entre o producto da parte dissociada e a parte não dissociada (lei da acção das massas de Guldeberg e Waag).

$$\frac{\overset{+}{H} \times \overset{-}{Cl}}{HCl} = K$$

Consoante a theoria dos iontes o concepção actual de acidos é tida como sendo "corpos que em solução aquosa contem excesso de iontes $\overset{+}{H}$" e bases "corpos que em solução aquosa contem excesso de iontes $\overset{-}{OH}$".

O caracter acido será tanto mais forte quanto mais rico em iontes $\overset{+}{H}$ livres for um volume determinado de solução.

O caracter basico se revelará pela predominancia dos iontes $\overset{-}{OH}$ livres.

Ao iniciarmos este capitulo tocamos nos termos acidez e basicidade *total* e *real.*

Convem agora entrar em esclarecimentos, porque é preciso não confundir estes dois estados.

Os electrolytos ao serem dissolvidos, isto já dissemos mais de uma vez, se dissociam de tal modo que parte de suas molleculas permanece isolada mas não dissociada, emquanto que outra se apresenta sob forma de iontes que resultam da dissociação.

Exemplo: o acido chlorhydrico HCl em solução aquosa á 18.° dissocia 80% de suas molleculas em iontes $\overset{+}{H}$ e $\overset{-}{Cl}$, os 20% restantes se acham sob a forma de molleculas intactas (HCl) sem se dissociar.

Pois bem chamamos acidez real ou actual a porção activa, a que se acha ionisada, no ex. os 80%, portanto a parte dissociada:

Acidez latente ou de reserva os 20% restantes, as molleculas não dissociadas.

Convem notar que si neutralisarmos as molleculas ionisadas com uma base, as molleculas não dissociadas poderão passar á activas, este facto devemos ter presente para comprehendermos o que é acidez total, representada pela somma da real mais a latente.

Pelo processo titulometrico a acidez total é a verificada.

O que vimos para um acido confirma-se tambem para os

alcalis; ex: com Na.OH a dissociação se fará em iontes Na^{+} e OH^{-}.

Neste caso chamaremos alcalinidade: real, latente e total.

Não é demais citarmos, como analogia classica, o seguinte exemplo: sabe-se que as forças de um estado constam de um exercito activo aquivalente á força actual; e um exercito de reserva que representa a força latente; o total representa a somma dos dois exercitos.

Ora, á medida que a guerra vae consumindo a força activa, chama-se a reserva para ir se constituindo força activa. Pois bem, a titulometria dos acidos e das bases nos dá idéa sómente da acidez ou basicidade total e nada ensina sobre as outras que tão intersessantes são ao biologo em geral.

Si quizermos neutralisar um acido por uma base, á medida que a solução desta vae sendo addicionada áquelle, vão sendo neutralisados os iontes livres ou activos de H, porém, ao mesmo tempo que estes desapparecem novos se formam por conta das molleculas não dissociadas do acido.

De modo que no fim da dosagem, quando chegassemos a neutralisação da solução, teriamos verificado a acidez total.

Ao biologo o que interessa não é a acidez total e sim a acidez ionica que imprime as qualidades ao liquido que se considera.

Para medil-a precisamos meios que não destruam a parte ionisada, mas que dêm conta exacta da parte que entra em reacção num momento dado.

Trata-se, em uma palavra, de fazer *ionimetria*.

E' por este processo, avaliando a riqueza em iontes livres, que chegaremos a conhecer a enérgia de um acido ou de uma base.

Para fazer ionimetria parte-se do seguinte: a agua, dissolvente universal, considerada durante muito tempo como

refractoria á passagem da corrente electrica, revelou-se fracamente iontisavel.

Nella os elementos $\overset{+}{H}$ e $\overset{-}{OH}$, responsaveis pela acidez ou alcalinidade respectivamente, entram em proporções taes que tornam sua reacção neutra. Comparando-se com a parte não dissociada, vêse que a parte iontizada da agua é minima. Num litro sómente um decimo-milionissimo da mollecula-gramma se dissocia.

Ora, o numero de molleculas ionisadas é excessivamente pequeno, emquanto que o numero de molleculas intactas, não dissociadas, é consideravel.

Isto posto, a formula de dissociação da agua que é:

$$\frac{\overset{+}{H} \times \overset{-}{OH}}{H^2\ O} = K \text{ poderá ser escripta}$$

$$\overset{+}{H} \times \overset{-}{OH} = K$$

Porque a parte H^2O intacta pode ser considerada como uma constante, em ivrtude da insignificancia da parte iontizada.

Esta constante foi estabelecida por methodos appropriados, de modo que o producto dos iontes $\overset{+}{H} \times \overset{-}{OH} = K$ para uma temperatura dada.

A cifra pela qual se representa esta constante de dissociação que é muito fraca igual á

$$\frac{1}{100000000000000} = \frac{1}{10^{14}} = 10^{-14}$$

A agua sendo o meio neutro por excellencia, a concentração $\overset{+}{H}$ será igual a concentração $\overset{-}{OH}$, temos: $C\ (\overset{+}{H}) = C\ (\overset{-}{HO})$

$$C\ (\overset{+}{H}) = \frac{1}{10000000} = \frac{1}{10^{7}} = 10^{-7}$$

$$C\,(\overset{-}{OH}) = \frac{1}{10000000} = \frac{1}{10^{7}} = 10^{-7}$$

Uma vez que o producto $\overset{+}{H} \times \overset{-}{OH}$ é uma constante, deduz-se que todo o augmento de um factor implica na diminuição do outro e consequentemente o conhecimento de um determina o conhecimento de outro.

A medida da concentração hydrogenio, sendo mais facilmente realisavel em pratica, é a que se faz quando se quer caracterisar a reacção acida, alcalina ou neutra.

Addicionando á agua um acido qualquer, elle se ionisa immediatamente, libertando os iontes $\overset{+}{H}$ que se juntam aos já contidos na agua e um novo equilibrio se estabelece de modo que o producto final fique igual a:

$$\frac{1}{10^{14}}$$

Segundo a concentração $\overset{+}{H}$ for maior ou menor do que $\frac{1}{10^{7}}$, teremos o meio alcalino ou acido.

Para simplificação da representação é que Soerensen, afim de não manejar com cifras tão pequenas propoz supprimir a fracção decimal, para conservar sómente, o expoente (p= ponens=expoente), substituindo á noção de $C\,(\overset{+}{H})$ ou concentração hydrogenio, a do pH seu inverso.

E' por isso que se difine o pH: o logarithmo do inverso da concentração hydrogenio.

Ora, si para o exemplo: $C\,(\overset{+}{H})\ \frac{1}{10^{4}}$, o inverso desta cifra e 10^{-4} o logarithmo e por conesguinte o pH=4

O pH é igual ao numero de zeros que figura no denominador da fracção, representando a diluição dos iontes $\overset{+}{H}$.

A cifra que exprime o pH é tanto mais elevada quanto maior for a diluição, e por tanto, quanto mais fraca for a acidez.

Uma solução normal em iontes $\overset{+}{H}$ será

$$C\,(\overset{+}{H}) = \frac{1}{1},\ pH = 0$$

Uma solução normal em iontes $\overset{-}{OH}$ será

$$C\,(\overset{+}{H}) = \frac{1}{100000000000000} = \frac{1}{10^{14}} = 10^{-14},\ pH = 14$$

O valor de pH é vizinho de zero para uma solução normal de HCl e vizinho de 14 para uma solução normal de Na OH.

Eis pois, a explicação ligeira das bases sobre as quaes assenta o symbolo pH, tão simples quanto a sua representação, mas tão complexo em sua significação.

Passemos no capitulo que segue aos processos colorimetricos usados para sua determinação.

CAPITULO II

METHODO COLORIMETRICO PARA DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE HYDROGENIO — pH

O methodo colorimetrico para determinação do expoente de hydrogenio, aperfeiçoado por Soerensen em seu trabalho fundamental sobre as reacções enzimaticas em 1909, foi iniciado em 1904 por Friedenthal e Salm na Allemanha.

Em principio o methodo colorimetrico consiste na comparação da solução a examinar a uma serie de solutos estalões de pH conhecido.

Os pH dos solutos estalões devem ser determinados pelo methodo electrometrico, só assim teremos padrões exactos para termo de comparação.

E' preciso, alem disso, uma serie de indicadores ou reactivos apropriados para cada segmento da escala, que vae de pH 0 a pH 14.

Estes indicadores são constituidos por soluções de corpos cuja mudança de coloração está ligada á riqueza em ions $\overset{+}{H}$ ou $\overset{-}{OH}$ da solução a examinar. Eis a base do methodo colorimetrico que tantos serviços presta na pratica.

Quando a solução de pH desconhecido fôr tratada pelo mesmo indicador que serviu para a formação do soluto estalão

e estas duas soluções apresentarem á vista uma coloração identica, admitte-se que têm o mesmo pH.

O estudo do methodo colorimetrico comporta tres partes:

1.ª Preparo das soluções estalões.

2.ª Preparo e escolha dos indicadores.

3.ª Avaliação do pH.

Solutos estalões

A escala colorimetrica poderá ser obtida por dois modos: um utilizando as propriedades de substancias que introduzidas nas soluções impedem as variações em concentração, quando a ellas se addicionam liquidos de concentração differente em H; outro não utilizando estas substancias.

Solutos padrões com tampão

Para obtermos uma escala de solutos padrões cujo pH variasse de 0 á 14 de uma maneira quasi constante, poderiamos pensar na utilização de soluções puras ou mais ou menos diluidas de HCL e NaOH ao N/1, N/10 e N/100, etc. cuja riqueza em iontes seria verificada pelo methodo electrometrico.

Entretanto, a conclusão que chegaram os experimentadores foi que com esse modo de proceder não só teriamos uma escala descontinua por faltarem os pH vizinhos da neutralidade, como tambem as soluções seriam muito instaveis.

Comprehende-se, com facilidade, que nas soluções acidas ou alcalinas muito diluidas não podemos contar com uma riqueza constante em iontes H, devido a alcalinidade do vidro e o gaz carbonico do ar.

Para remediar esses inconvenientes é que se lançou mão das substancias tampões, verdadeiros fixadores do equilibrio acido-basico.

Estas substancias, chamadas reguladoras por Ponselle,

foram empregadas pela primeira vez em 1900 por Fernbach e Hubert que as denominaram tampões.

As substancias tampões são de grande utilidade, quando se manejam liquidos cuja reacção é vizinha da neutralidade.

Estudos posteriores vieram mostrar que os liquidos organicos possuem tambem suas substancias reguladoras, por meio das quaes mantem seu pH quasi inalteravel.

De facto é notavel a resistencia que oppõe taes liquidos á variação do seu pH, propriedade esta indispensavel a conservação da vida.

Um exemplo frizante a esse respeito é o que se verifica com o sangue circulante; restricto é o limite de variação do seu pH; e isto se dá, graças a um mechanismo no qual desempenham papel saliente as substancias reguladoras.

Fallamos já varias vezes em soluções tampões, alludimos ao seu papel, aliás importante, todavia, não as definimos:

Soluções tampões ou reguladoras

As soluções tampões (Buffer dos Allemães) são soluções fracamente acidas ou alcalinas, contendo, no primeiro caso, um acido fraco em presença de um de seus saes de base forte, e no segundo uma base fraca em presença de um de seus saes de acido forte.

As soluções tampões pódem tambem ser obtidas pelo emprego da solução de uma substancia amphoterica, como a glycocolla que funcciona, seja como acido fraco, seja como base fraca si se ajuntam acidos ou bases fortes.

As propriedades das soluções tampões são explicadas pela lei de acção das massas.

Tomemos o exemplo que nos offerece a mistura de Walpole: acido aceptico (fraco) + acetado de sodio (sal de base

forte) e vejamos o que se produz pela presença simultanea delles.

Na solução acido acetico a applicação da lei da acção das massas nos dá a equação seguinte:

$$\frac{(CH^3\ CO^2)\ +\ (H)}{(CH^3\ CO^2\ H)} = K$$

A introducção na solução de um sal de base forte, (o acetato de sodio) o numero de iontes ($CH^3\ CO^2$) augmentou.

Mas o valor K é uma constante, + para que a constante permaneça, os iontes H se recombinam aos iontes ($CH^3\ CO^2$), emquanto que o denominador ($CH^3\ CO^2\ H$), (acido não dissociado) augmenta.

A concentração ionica depende da constante:

$$\frac{\text{acido acetico}}{\text{acetato de sodio}}$$

Si por meio da solução acetica tinhamos os pH comprehendidos entre 2 e 4, com a mistura acido acetica + acetado de sodio a escala será estendida de 4 a 6; o que acontecerá quando á mistura for addicionada: agua, alcali ou acido?

A acção da agua é, por assim dizer, quasi nulla, pois uma solução tampão pode ser diluida sem que se note grande variação no seu pH.

Acção dos alcalis e acidos — A solução tampão é tambem caracterizada pela fraca sensibilidade ao acrescimo de uma quantidade moderada de acido ou base forte que pouco faz variar sua acidez ou alcalinidade primitiva.

Comprehendida a acção das substancias tampões, vamos, no que se segue, tratar de preparo das soluções estalões, lembrando-nos que os pH vizinhos da neutralidade são obtidos graças ás propriedades das referidas substancias.

PREPARO DOS SOLUTOS ESTALÕES

Os solutos estalões devem ser feitas com o maior rigor technico, os productos chimicos empregados devem ser muito puros, pode-se mesmo, quando houver duvidas quanto á sua pureza, submettel-os a recrystallização, empregando todos os processos chimicos, para os tornar rigorosamente puros.

A agua destillada que se empregar deve ser neutra, e a vidraria tambem, usam-se o vidro Pyrex ou vidros velhos.

Qualquer erro que se cometta no preparo dos estalões repetir-se-á indefinitivamente em todas as medidas que elles forem termo de comparação.

Das varias misturas existentes para o preparo dos solutos padrões: a de Soerensen, a de Michaelis, a de Mac Ilvaine, a de Clarck e Lubs, etc, vamos descrever e estudar somente a ultima, por ser a mais usada na pratica.

As misturas de Clarck e Lubs servem para preparo da escala que é manejada diariamente nos laboratorios e fornece excellentes resultados.

Os solutos necessarios ao seu preparo são os seguintes:

I — Solução ao n/5 de chloreto de potassio: sejam 14 grms. 912 por litro.

II — Soluções ao n/5 de phtalato acido de potassio; sejam 40 grms. 828 por litro.

III — Solução n/5 de phosphato monopotassico: seja 27 grms. 232 por litro.

IV — Solução n/5 de chloreto de potassio e acido borico ou sejam (12 grms.4048 de acido borico e 14 grms. 912 de chloreto de potassio por litro.

V — Solução n/5 de soda (protegida cuidadosamente contra o CO^2).

VI — Solução n/5 de acido chlorhydrico.

A differança constante de o,2 pH entre duas misturas tampões successivas, apresenta vantagens praticas.

Os productos chimicos empregados por Clarck e Lubs são obtidos em estado de pureza, mais facilmente do que os utilidos por Soerensen em suas misturas.

A escala de estalões é estabelecida segundo os quadros que seguem:

MISTURA CHLORETO DE POTASSIO — ACIDO CHLORHYDRICO

Chloreto de potassio (Sol. I)	Acido chlohydrico (Sol. 6)	pH da mistura
50 cm.³	64,5 cm.³	1,2
50 "	41,5 "	1,4
50 "	26,3 "	1,6
50 "	16,6 "	1,8
50 "	10,6 "	2,0
50 "	6,7 "	2,2

MISTURA PHTALATO — ACIDO CHLOHYDRICO

Phtalato (Sol. 2)	Acido chlohydrico (Sol. 6)	pH da mistura
50 cm.³	46,70 cm.³	2,2
50 "	39,60 "	2,4
50 "	32,95 "	2,6
50 "	26,42 "	2,8
50 "	20,32 "	3,0
50 "	14,70 "	3,2
50 "	9,90 "	3,4
50 "	5,97 "	3,6
50 "	2,63 "	3,8

MISTURA PHTALATO — SODA

Phtalato (Sol. 2)	Soda (Sol. 5)	pH da mistura
50 cm.³	0,40 cm.³	4,0
50 "	3,70 "	4,2
50 "	7,50 "	4,4
50 "	12,15 "	4,6
50 "	17,70 "	4,8
50 "	23,85 "	5,0
50 "	29,95 "	5,2
50 "	35,45 "	5,4
50 "	39,85 "	5,6
50 "	43,00 "	5,8
50 "	45,45 "	6,0
50 "	47,00 "	6,2

MISTURA PHOSPHATO — SODA

Phosphato monopotassico (Sol. 3)	Soda (Sol. 5)	pH da mistura
50 cm.³	3,72 cm.³	5,8
50 "	5,70 "	6,0
50 "	8,60 "	6,2
50 "	12,60 "	6,4
50 "	17,80 "	6,6
50 "	23,65 "	6,8
50 "	29,63 "	7,0
50 "	35,00 "	7,2
50 "	39,50 "	7,4
50 "	42,80 "	7,6
50 "	45,20 "	7,8
50 "	46,80 "	8,0

MISTURA ACIDO BORICO — CHLORETO DE POTASSIO

50 "	3,70 "	4,2

Chloreto potassio - ac. borico (Sol. 4)	Soda (Sol. 5)	pH da mistura
50 cm.³	2,61 cm.³	7,8
50 "	3,97 "	8,0
50 "	5,90 "	8,2
50 "	8,50 "	8,4
50 "	12,00 "	8,6
50 "	16,30 "	8,8
50 "	21,30 "	9,0
50 "	26,70 "	9,2
50 "	32,00 "	9,4
50 "	36,85 "	9,6
50 "	40,80 "	9,8
50 "	43,90 "	10,0

NOTA. — Para todos os estalões de Clarck e Lubs complete-se, com agua destilada, o volume da mistura até 200 cc. porque os valores de pH só serão validos para taes diluições.

Como já assignalamos existem outras misturas, estabelecidas todas segundo o mesmo principio. Os autores modificam as combinações, afim de tornal-as mais convenientes ao fim a que se destinam.

INDICADORES

São substancias que nos põe ao corrente do estado de acidez ou alcalinidade duma solução.

Si em uma solução acida addicionam-se algumas gottas de tournesol neutro, vemos que ella adquire rapidamente uma coloração vermelha escura.

Na solução assim tratada e corada, fazemos cahir uma so-

lução de soda, o acido vae sendo aos poucos neutralizado, quando a neutralização for completa, a côr da solução virar-se-á á primitiva.

A phenolphtaleina tem qualidades semelhantes.

A primeira explicação do phenomeno foi dada de um modo bem simples: o indicador era uma base ou um acido cuja coloração variava da de seu sal.

Segundo Ostwald, os indicadores são acidos fracos ou bases fracas cuja mollecula não dissociada tem uma coloração differente da de seus iontes.

Esta definição foi modificada por Kolthoff e ennunciada do seguinte modo:

"Os indicadores são acidos ou bases cujos iontes tem uma côr e constituição differentes da forma normal."

Um indicador seria, pois, uma substancia que soffreu uma transformação profunda de constituição acompanhada de mudança de côr effectivada pela variação da concentração em iontes H do meio em que é dissolvido.

A viragem do teurnesol do vermelho ao azul não é brusca; começa na zona de acidez com pH = 6,6 e termina na zona alcalina com pH = 7,4.

Entre estes valores, operando e observando-se com attenção, nota-se uma serie de côres intermediarias correspondendo cada uma a um pH bem determinado e situado entre 6,6 e 7,4.

ESCOLHA DOS INDICADORES

Na escolha dos indicadores são necessarias as observações de certas condições:

1.º Obtenção facil no estado de pureza.

II.º Apresentar modificações de côr reversivel sob a influencia das menores variações de concentração em iontes H.

III.º Sensibilidade minima ás variações de coloração devidas á presença, nas soluções, de saes neutros ou proteinas.

Actualmente possuimos cerca de uma vintena de bons indicadores de origem vegetal (tournesol, tintura de violeta, etc.,) ou animal (tintura de cochonilha, etc.,) e cerca de trinta substancias organicas, obtidas artificialmente e cuja viragem se effectua entre pH = 1 e pH = 13.

Soerensen, após longos e pacientes trabalhos, apresentou, em 1909, uma serie de indicadores que quasi cobre a escala de pH.

Entretanto Clarck e Lubs deram uma outra serie cuja preparação é mais simples que a de Soerensen e é mais estavel.

Os indicadores de Clarck e Lubs, exepto e vermelho de methyla, são todos derivados da phenolphtaleina.

De um modo geral os indicadores são divididos em duas especies: uns chamados bichromicos porque tem duas côres differentes, conforme o pH do meio for acido ou alcalino; outros são chamados monochromicos porque são incolores ou antes, de uma côr só, conforme o pH.

Os bichromicos não passam bruscamente de uma côr a outra, mas gradativamente.

São amarellos em solução acida, vermelhos ou azues em solução alcalina.

Alem dos indicadores de Soerensen que mencionamos e dos de Clarck e Lubs que vamos passar em revista, existem outros.

INDICADORES de CLARCK e LUBS

DESIGNAÇÃO CHIMICA	Designação vulgar	Concentração	Viragem	pH	Na HO n/20 por 0,1
Thymolsulfonophtaleina	Azul de Thymol	0,04	Vermelho ao amarello	1,2—2,8	4,3 cm³
(viragem acida)	Azul de bromophenol	0,04	Amarello ao azul	3,0—4,6	3,0
Tetrabromophenolsulfonophtaleina	Vermelho de methyla	0,02	Vermelho ao amarello	4,4—6,0	7,4
Orthocarboxybenzenoazodimethylanilina	Purpura de bromocresol	0,04	Amarello ao purpura	5,2—6,8	3,7
Dibromoorthocresolsulfonophtaleina	Azul de bromothymol	0,04	" ao azul	6,0—7,6	3,2
Dibromothymolsulfonophtaleina	Vermelho de phenol	0,02	" ao vermelho	6,8—8,4	5,7
Phenolsulfonophtaleina	Vermelho de cresol	0,02	" ao "	7,2—8,8	5,3
Orthocresolsulfonophtaleina					
Thymolsulfonophtaleina	Azul de Thymol	0,04	Amarello ao azul	8,0—9,6	4,3
(viragem alcalina)	Cresolphtaleina	0,02			
Orthocresolphtaleina			Incolor-vermelho	8,2—9,4	Sol. alccolica 95 %

Este quadro-resumo nos põe ao corrente dos indicadores de Clarck e Lubs, melhor do que qualquer descripção. Elles satisfazem todas as exigencias das pesquizas microbiologicas.

PREPARO DOS INDICADORES

No preparo dos indicadores observam-se os mesmos cuidados technicos que se devem ter com os solutos estalões.

Os frascos para conter as soluções mães dos indicadores, com rolhas esmerilhadas, devem ser parafinados, ou então de vidro Pyrex, lavados com carbonato de sodio, depois com acido chlorhydrico e finalmente varias vezes com agua destillada.

A agua empregada deve ser redistillada e guardada ao abrigo do gaz carbonico do ar.

As soluções mães indicadoras de Clarck e Lubs são preparadas do seguinte modo:

Tritura-se 0,1 de pó secco com a quantidade de soda n/20 indicada em cc. em uma das columnas do quadro precedente; dilue-se depois á 25 ou 50 cc., segundo a concentração, indicada no mesmo quadro, for a 0,04 ou 0,02.

A solução assim obtida é empregada na razão de V gottas por 10 cc do liquido a examinar.

O estalão e o liquido a examinar devem ser addicionados da mesma quantidade de indicador.

CONSTRUCÇÃO DAS ESCALAS:

No que se relaciona com a construcção das escalas colorimetricas, é de regra utilisar as substancias indicadoras na mesma quantidade e diluição, para a escala padrão e para o liquido cujo pH se quer verificar.

Para construcção da escala tomam-se tubos de ensaio de calibre medio de 13 a 15 millimetros de diametro e de vidro

neutro; introduzem-se em cada um delles, 5 cc dos solutos estalões considerados, segundo as indicações acima (tabella de Clarck e Lubs); a cada um dos tubos addicionam-se 0,1 ou 0,2 de cc do soluto alcoolico indicador, este ultimo escolhido conforme o pH do soluto estalão.

Preparam-se assim series de tubos na zona util dos indicadores, para determinação do pH nos diversos meios.

Os tubos de cada serie, que devem ser uniformes, são fechados á lampada e o pH correspondente é escripto em cada um delles.

AVALIAÇÃO DO pH

De posse das soluções estalões e dos indicadores, o biologo ou chimico está apto a fazer suas avaliações.

Dois casos podem apresentar-se: primeiro o liquido a examinar é incolor, segundo o liquido é corado.

Seja um liquido incolor cuja reacção é desconhecida e que se empreguem os estalões e indicadores de Clarck e Lubs.

E' o caso mais simples.

Addicionam-se ao liquido a examinar, umas 5 gottas de indicador.

Ensaia-se deste modo, a reacção com os indicadores usados e que foram empregados na construcção da escala colorimetrica padrão, até encontrar igualdade de matizes que fixarão o pH.

A comparação se faz sem difficuldades operando sobre um fundo branco ou diante de um vidro uniformemente despolido.

Infelizmente as soluções a examinar apresentam, em geral, uma coloração que lhe é propria a ás vezes muito accentuada.

Essa coloração propria, quando se pretende fazer a medi-