

Alguns aspectos das titulações potenciométricas de tióis com electrodo de mercúrio-tiol

por R. E. PINTO^{⊕⊙}

Introdução

Nas titulações potenciométricas o final da reacção entre o titulante e o composto a dosear é determinado pelo ponto de inflexão da curva de titulação (1), a qual é uma curva que descreve o potencial (relativamente a um electrodo padrão) após cada adição de um determinado volume do titulante. A reacção que está na base do doseamento de tióis por este método é a que leva à formação de mercaptidos (de prata ou de mercúrio) pouco solúveis ou pelo menos de constante de dissociação muito pequena. Assim o titulante é o ião Ag^+ (prata) ou o ião Hg^{++} (mercúrio) e o electrodo é o respectivo metal.

Há cerca de dez anos Cecil (2) apresentou um electrodo de prata-tiol que mostra vantagens em relação ao electrodo de prata, visto haver reversibilidade em relação ao ião Ag^+ e ao ião RS^- (ião tiol). Um aspecto importante dessas vantagens é por exemplo o alargamento do domínio de pH em que a análise é possível. O mesmo autor construiu posteriormente (3) um electrodo de mercúrio-tiol aquecendo um filamento de ouro na chama semi-oxidante de um bico de Bunsen e mergulhando-o em mercúrio durante alguns segundos. Formou-se assim um electrodo de mercúrio que imerso numa solução de cisteína, para dar início à sua titulação, dá origem espontaneamente a um electrodo de mercúrio-tiol. A formação é observada pelo decréscimo de potencial até se atingir certa estabilidade.

⊕ 2.º Assistente da Secção de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

⊙ Bolsheiro da Fundação Calouste Gulbenkian na época em que a maior parte deste trabalho foi feito.

Parte experimental

Foi utilizada a aparelhagem experimental descrita ou mencionada por Cecil (2, 3, 4) com excepção do electrodo de mercúrio-tiol que foi ligeiramente modificado, passando a usar-se o filamento com uma extremidade esférica, obtida por fusão do fio de ouro, o que permitiu no caso das titulações da glutatona (1) curvas de melhor configuração para o seu doseamento. Foram também doseados vários outros tióis (cisteamina, cisteína, etc.). Essas curvas apresentam dois pontos de inflexão: um quando a razão molar de $Cl_2 Hg$ e de tiol é 1/2 e outro quando essa razão é igual à unidade (fig. 1). O primeiro corresponde ao mercaptido $(RS)_2 Hg$ e o segundo ao composto que Stricks e Kolthoff (5), no seu estudo polarográfico de compostos mercúricos da GSH , escrevem com a fórmula $(RS)_2 Hg_2$. O primeiro ponto de inflexão corresponde a um composto mais estável e por este motivo é o que se usa no doseamento dos tióis; assim o termo «ponto de inflexão» quererá sempre significar o primeiro ponto de inflexão, ou seja o ponto de equivalência.

As titulações de glutatona mostraram também que a inclinação da tangente no ponto de inflexão diminuía quando a quantidade de tiol a titular aumentava (fig. 2). Vão interpretar-se estes resultados através de uma expressão que relaciona a tangente no ponto de inflexão com a concentração da glutatona a titular.

(1) A glutatona (que representamos de futuro por GSH), é um tiol tripeptido constituído por ácido glutâmico, cisteína e glicina, ligados por esta ordem. É portanto o γ -glutamil-cisteinil-glicina. O mercaptido será designado também por $(GS)_2 Hg$.

Parte teórica

Os tióis simples e os mercaptidos provenientes destes tem constantes de dissociação bem definidas. Se existem na molécula funções (ácido carboxílico, amina, etc.), além da função tiol, a dissociação do grupo sulfidrilo ou do mercaptido depende do pH , por este determinar as espécies iónicas existentes (1). Na prática podem considerar-se três ou quatro constantes de dissociação, cada uma dentro de certo domínio de pH (5). Por outro lado se na molécula do mercaptano existe um grupo aminogénio não é possível saber qual das constantes de dissociação é a devida à função tiol ou à função amina. Uns autores escolhem para a função tiol o valor mais próximo do apresentado pelos tióis simples e outros autores inclinam-se, por razões experimentais, para o valor que aqueles atribuem à função amina (6, 7).

Para simplificar o estudo teórico da curva de titulação e da tangente no ponto de equivalência, vai-se abstrair dos factos apontados mas atender-se-á no final às limitações que daqui provem.

A formação do electrodo de mercúrio-tiol poderá ser interpretada atendendo às reacções que supomos darem-se na célula de titulação, que contém tiol e onde foi introduzido o electrodo de mercúrio.

i) O tiol está em equilíbrio com os seus iões, o que é descrito pela reacção:



cuja constante de dissociação é K_a .

(1) Usemos um tiol aminoácido (cisteína), para exemplificar. Nos casos limites teremos: a pH muito baixo a função amina está essencialmente na forma ($-NH_3^+$) e a função carboxilo na forma não dissociada ($-COOH$) e a pH alto a função amina está como ($-NH_2$) e o carboxilo apresenta alta percentagem de dissociação ($-COO^-$). Estas formas iónicas têm efeito de polarização sobre o grupo tiol ($-SH$) de modo que a constante de dissociação deste, num e noutro caso, é diferente.

ii) Como o electrodo de mercúrio está mergulhado nesta solução de tiol, os iões RS^- reagem com o electrodo. A reacção do electrodo é possivelmente

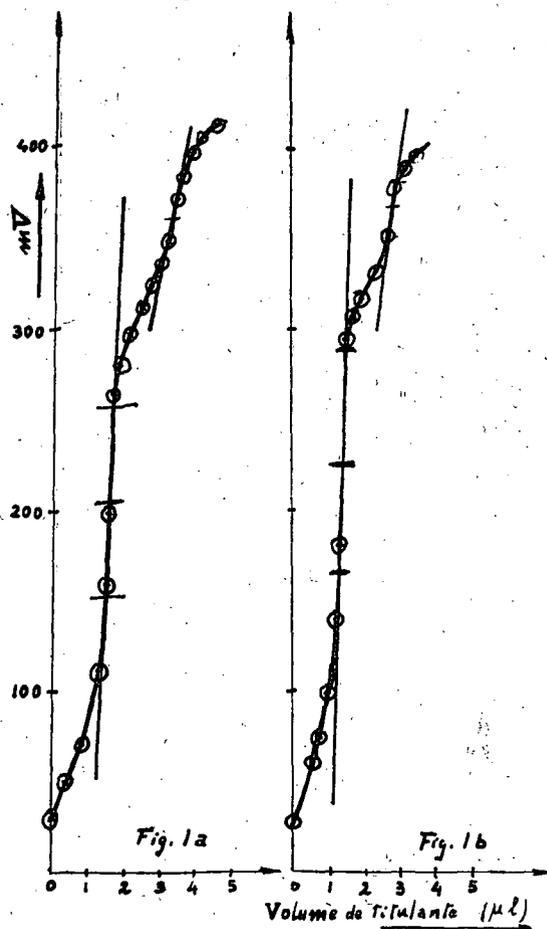
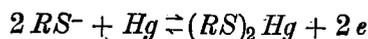


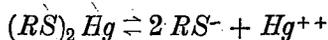
Fig. 1 — Representa a curva de titulação da cisteína $10^{-5} M$ (Fig. 1a) e da cisteína $8 \times 10^{-5} M$ (Fig. 1b). Titulante: $Cl_2 Hg$ $0,1 M$; pH 2,5; temperatura $20,5^\circ$.

cuja constante de equilíbrio (escrita em função das actividades) é:

$$K_1 = \frac{a_{(RS)_2 Hg}}{a_{RS}^2 \cdot a_{Hg}}$$

iii) O mercaptido que se dissolve fica em equilíbrio com os seus iões, o que se

descreve pela reacção :



cuja constante de dissociação é :

$$K_d = \frac{a_{RS^-}^2 \cdot a_{Hg^{++}}}{a_{(RS)_2 Hg}}$$

e que seria substituída pelo produto de solubilidade ($S' = a_{RS^-}^2 \cdot a_{Hg^{++}}$) se o mercaptido fosse pouco solúvel.

No seu conjunto as reacções *ii*) e *iii*) correspondem à reacção de dissolução do mercúrio.

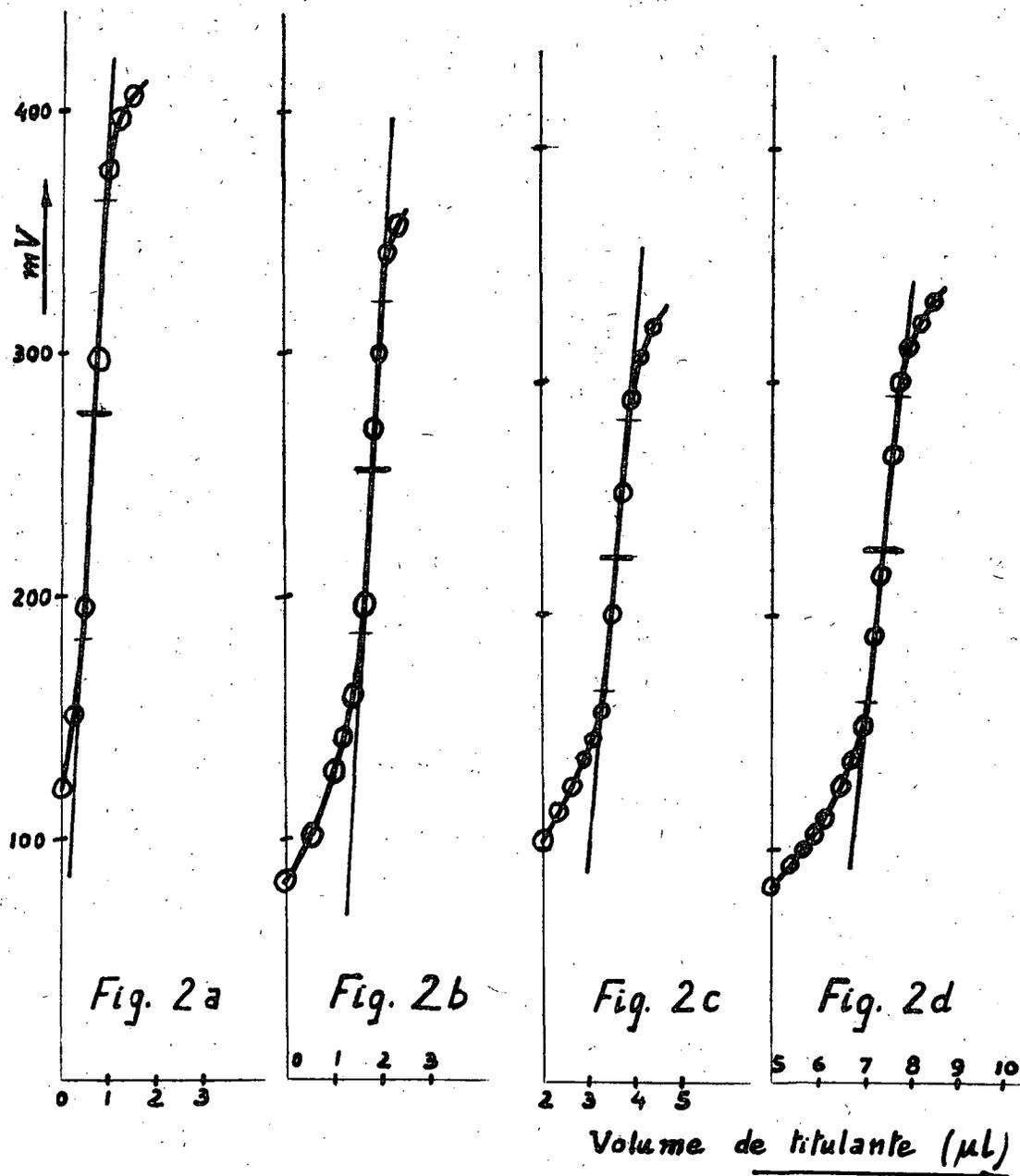
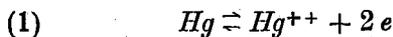


Fig. 2. Representa curvas de titulação da GSH de diferentes concentrações.

Titulante: $Cl_2 Hg$ 0,1 M; pH 2,5; temperatura 20,5°.

Fig. 2a: GSH $4,5 \times 10^{-5}$; Fig. 2b: GSH 10^{-4}

Fig. 2c: GSH 2×10^{-4} ; Fig. 2d: GSH $4,1 \times 10^{-4}$.



que se dá indirectamente pela reacção dos iões tiolato com o electrodo, associada à reacção de dissociação do mercaptido. O potencial do electrodo mercúrio-tiol deve assim poder expressar-se tanto em função da actividade de ião Hg^{++} como em função da actividade de ião RS^- .

A queda de potencial que se observa durante a formação do electrodo termina ao atingir-se o equilibrio químico. Após começar-se a titulação as reacções atrás mencionadas deslocam-se agora em sentido contrário ao da formação do electrodo de mercúrio-tiol. Existe contudo uma diferença grande entre a formação deste electrodo e a titulação, pois no primeiro caso o sistema está quimicamente isolado e no segundo há adição de iões Hg^{++} . Após o electrodo estar em equilibrio com a solução, o potencial do electrodo (8) é, atendendo a (1), representado em função da actividade de ião mercúrio livre por,

$$(2) \quad E = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln a_{Hg^{++}}.$$

Usando concentrações em vez de actividades, visto serem aquelas suficientemente pequenas para se poder utilizar esta substituição, vem:

$$(3) \quad E = E_0 + \frac{RT}{2F} [\ln Hg^{++}]$$

que descreve a curva de titulação desde que se conheça a concentração do ião mercúrio livre (no vaso de titulação), correspondente ao volume v de titulante adicionado, de concentração c .

A concentração, no vaso de titulação, de $Cl_2 Hg$ (titulante) usado em qualquer instante da titulação (se abstrairmos a reacção) será:

$$[Hg^{++}]_u = c \cdot \frac{v}{v+V}$$

em que V é volume do tiol a titular. Como v é muito pequeno em relação a V pode considerar-se:

$$(4) \quad [Hg^{++}]_u = \frac{c \cdot v}{V}.$$

Ora o $Cl_2 Hg$ reagiu e portanto essa concentração expressa a soma das concentrações do mercaptido formado e do ião livre

$$(5) \quad [Hg^{++}]_u = [(RS)_2 Hg] + [Hg^{++}].$$

Usando concentrações a constante de dissociação do tiol é:

$$(6) \quad K = \frac{[RS^-] \cdot [H^+]}{[RSH]}$$

e a constante de dissociação do mercaptido:

$$(7) \quad K' = \frac{[RS^-]^2 [Hg^{++}]}{[(RS)_2 Hg]}$$

A concentração total do mercaptano que existe inicialmente é:

$$(8) \quad C_i = [RSH]_i + [RS^-]_i$$

A concentração do tiol (que não está sob a forma de mercaptido) existente em cada instante, após o inicio da titulação é:

$$(9) \quad C = [RSH] + [RS^-]$$

e atendendo a (5) tem-se:

$$(10) \quad C_i = C + 2 [(RS)_2 Hg].$$

De (6) e (9) vem:

$$(11) \quad [RS^-] = \frac{C \cdot K}{K + [H^+]}$$

De (7) e (11) vem:

$$(12) \quad K' \cdot [(RS)_2 Hg] = \\ = C^2 \cdot \frac{K^2}{(K + [H^+])^2} \cdot [Hg^{++}].$$

De (10) e (12) obtém-se a equação do 3.º grau completa:

$$(13) \quad 4 K^2 [Hg^{++}]^3 + 4 K^2 (C_i - 2 [Hg^{++}]_u) \cdot [Hg^{++}]^2 + K^2 \{ C_i^2 + 4 [Hg^{++}]_u^2 - 4 C_i [Hg^{++}]_u + K' (K + [H^+])^2 [Hg^{++}] - [Hg^{++}]_u \cdot K' \cdot (K + [H^+])^2 \} = 0.$$

Esta equação associada a (4) dá a concentração do ião Hg^{++} livre, em qualquer instante da titulação, em função da concentração do mercaptano a titular e do volume do Cl_2 Hg gasto.

O conjunto das expressões (13), (4) e (3) descreve a própria titulação.

A experiência mostrou que a tangente no ponto de equivalência (ponto de inflexão) é função de C_i . Interessa portanto calcular a derivada do potencial em relação ao volume v gasto até ao instante t , da titulação, e determinar o seu valor no ponto de inflexão. De (3), (4) e (5) vem:

$$(14) \quad \frac{dE}{dv} = \frac{dE}{d[Hg^{++}]} \cdot \frac{d[Hg^{++}]}{d[Hg^{++}]_u} \cdot \frac{d[Hg^{++}]_u}{dv} = \frac{RT}{2F} \cdot \frac{1}{[Hg^{++}]} \cdot \frac{d[Hg^{++}]}{d[Hg^{++}]_u} \cdot \frac{c}{V}.$$

A derivada da concentração de ião mercúrio livre em ordem à concentração de ião mercúrio usado, no ponto de equivalência, pode determinar-se derivando a equação (13) como função implícita e atendendo às condições no ponto de equivalência onde é necessariamente:

$$(15) \quad (C_i)_{p. e.} = (2 [Hg^{++}]_u)_{p. e.}$$

A efectuação dos cálculos mostrou que:

$$(16) \quad \left(\frac{d[Hg^{++}]}{d[Hg^{++}]_u} \right)_{p. e.} = \frac{8 K^2 [Hg^{++}]_{p. e.}^2 + K' (K + [H^+])^2}{12 K^2 [Hg^{++}]_{p. e.}^2 + K^2 K' (K + [H^+])^2} = \frac{2}{3}$$

que é praticamente constante e igual a $\frac{2}{3}$,

por ser K' sempre muito pequeno mesmo em relação a K^2 (5).

Para se determinar o valor de $\left(\frac{dE}{dv} \right)_{p. e.}$ é necessário ainda determinar a concentração do ião mercúrio livre no ponto final da titulação (ponto de equivalência) o que vai fazer-se em seguida. De (13), atendendo a (15) vem:

$$(17) \quad [Hg^{++}]^3 + \frac{K' (K + [H^+])^2}{4} [Hg^{++}] - \frac{C_i K' (K + [H^+])^2}{8 K^2} = 0$$

que é uma equação cúbica reduzida da forma:

$$z^3 + pz + q = 0.$$

Como $p < 0$ o discriminante é positivo e existe uma solução real (o que teria de acontecer por razões de ordem física); resolvendo a equação pela fórmula de Tartaglia (9) tem-se:

$$(18) \quad [Hg^{++}]_{p. e.} = - \left(\frac{q}{2} \right)^{\frac{1}{3}} \cdot \left\{ \left[1 - \left(1 - \frac{32 \cdot K^6}{27 \cdot C_i^3} \cdot q \right)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{3}} + \left[1 + \left(1 - \frac{32 \cdot K^6}{27 \cdot C_i^3} \cdot q \right)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{3}} \right\}$$

substituindo q pelo seu valor e chamando A ao que existe dentro da chaveta, vem:

$$(19) \quad (Hg^{++})_{p. e.} = \left(\frac{C_i K' (K + [H^+])^2}{16 K^2} \right)^{\frac{1}{3}} \cdot A$$

que dá a concentração do ião mercúrio no ponto de equivalência. É evidente, por razões de ordem física, que A tem de ser positivo; vamos apenas mostrar que terá de ser inferior $A < \sqrt[3]{2}$, e praticamente igual a este valor.

A titulação termina quando a quantidade do ião mercúrio gasto é igual a metade da quantidade de tiol inicial, o que está expresso em (15), que associado a (5) e (10) dá:

$$[(RS)_2 Hg] + [Hg^{++}] = \frac{1}{2} (C + 2[(RS)_2 Hg])$$

logo, no ponto final da titulação é:

$$(20) \quad \frac{1}{2} (C)_{p. e.} = [Hg^{++}]_{p. e.}$$

que substituído em (12) dá:

$$(21) \quad [Hg^{++}]_{p. e.} = \left(\frac{K' \cdot [(RS)_2 Hg]_{p. e.} \cdot (K + [H^+])^2}{4 K^2} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Comparando esta expressão com (19) tem-se:

$$(22) \quad \frac{C_i}{16} \cdot A^3 = \frac{[(RS)_2 Hg]_{p. e.}}{4}$$

e como $\frac{C_i}{2}$ é maior do que a concentração do mercaptido no ponto de equivalência tem-se $A < \sqrt[3]{2}$. Só têm interesse analítico os tióis em que, no ponto de equivalência, é $C_i \approx 2 [(RS)_2 Hg]$ e portanto quando K' é muito pequeno. Logo tanto de (17), (18) ou de (22) se conclui que deverá ser $A \approx \sqrt[3]{2}$. Logo, aproximadamente:

$$(23) \quad [Hg^{++}]_{p. e.} = \left(\frac{C_i K' \cdot (K + [H^+])^2}{8 K^2} \right)^{\frac{1}{3}}$$

No caso de tióis dando mercaptidos mercúricos pouco solúveis, dever-se-ia usar o produto de solubilidade em vez da constante de dissociação K' , e viria

$$(24) \quad S = [RS^-]^2 \cdot [Hg^{++}]$$

o qual associado a (11) e atendendo a (20) dá

$$(25) \quad [Hg^{++}]_{p. e.} = \left(\frac{S}{4} \cdot \frac{(K + [H^+])^2}{K^2} \right)^{\frac{1}{3}}$$

o que mostra ser a concentração do ião mercúrio livre, no ponto de equivalência, independente da concentração do tiol a dosar.

Possivelmente este valor de Hg^{++} necessita ser rectificado, pois da interacção do ião Hg^{++} com o mercúrio metálico provirá ião mercurioso. Como não sabemos a constante de equilíbrio K_1 entre as duas formas iónicas, que é provavelmente diferente da que se conhece quando o electrodo é de mercúrio e não de mercúrio-tiol (10) abstraímos-nos desta reacção.

Está-se agora em condições de escrever a derivada do potencial no ponto de equivalência em ordem ao volume de titulante adicionado. De (14), (16) e (23) vem:

$$(26) \quad \left(\frac{dE}{2v} \right)_{p. e.} = \frac{2}{3} \cdot \frac{RT}{2F} \cdot \frac{c}{V} \cdot \frac{1}{[Hg^{++}]^{1/3}} = \frac{2}{3} \cdot \frac{RT}{2F} \cdot \frac{c}{V} \cdot \left(\frac{8 \cdot K^2}{C_i K' (K + [H^+])^2} \right)^{1/3}$$

Se o mercaptido for «insolúvel», será:

$$(27) \quad \left(\frac{dE}{dv} \right)_{p. e.} = \left(\frac{4 \cdot K^2}{S (K + [H^+])^2} \right)^{1/3}$$

Se considerarmos tióis de mercaptidos «solúveis», teremos que:

$$(28) \quad \left(\frac{dE}{dv} \right)_{p. e.} = f(C_i^{-1/3})$$

e no caso de tióis de mercaptidos pouco «solúveis» a tangente no ponto de equivalência da curva de titulação seria independente da concentração de tiol a titular. Conclui-se portanto que $(GS)_2 Hg$ deve ser solúvel nas condições da experiência.

A expressão (26) mostra que para um determinado tiol e certo pH é:

$$(29) \quad C_i^{1/3} \cdot \left(\frac{dE}{dv} \right)_{p. e.} = c^{te.}$$

Efectuando o cálculo, a partir das curvas da figura 2, vê-se que esta relação é verificada experimentalmente.

Chamando $\left(\frac{\Delta E}{\Delta v} \right)_{p. e.}$ ao valor experi-

mental da tangente, tem-se no caso estudado:

$$(30) C_i^{1/5} \cdot \left(\frac{\Delta E}{\Delta v} \right)_{p.e.} = 1,42 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^2.$$

Discussão

As expressões (26) e (27) tem apenas generalidade no caso dos tióis simples pois no caso de tióis com outras funções, tanto K como K' , ou S , tem determinados valores conforme o pH , portanto para um mesmo mercaptano haverá uma expressão correspondente a (26) e (27) para cada pH .

Por outro lado a equação (26) só foi verificada experimentalmente como função da concentração de tiol a dosear e não como função de pH , de K e K' (ou K e S), visto o nosso objectivo ser a interpretação da experiência, ou seja determinar $\left(\frac{dE}{dv} \right)_{p.e.}$

em função de C_i . Impõe-se contudo esta verificação como objecto de estudo futuro.

As equações (26) e (27) sugerem que a sua utilização para os tióis simples permitiria obter os valores de K e K' (ou K e S). O valor K é da ordem de 10^{-10} e portanto é desprezável em face da concentração hidrogeniônica; assim poder-se-ia obter a razão K'/K^2 (ou S/K^2) em meio ácido. Trabalhando em meio suficientemente básico, para se poder desprezar a concentração hidrogeniônica $[H^+]$ perante K , obter-se-ia K' . Quer dizer, as titulações potenciométricas de um tiol simples com electrodo de mercúrio-tiol permitiriam determinar as constantes de dissociação do tiol e do mercaptido (ou a constante de dissociação do mercaptano e o produto de solubilidade do mercaptido). Infelizmente o electrodo, tal como o usamos actualmente, tem um comportamento pobre em meio básico e portanto, de momento, o que se sugere acima não tem viabilidade, mas é razão forte para se tentar o aperfeiçoamento do electrodo.

Os tióis com outras funções ainda apresentam a dificuldade dos valores de K e K'

(ou de K e S) serem diferentes em meio ácido e básico. Contudo se for possível modificar o electrodo de maneira a dar, em meio básico, curvas potenciométricas de boa configuração, será talvez possível ter uma ideia da ordem de grandeza de K' e K abstraindo o pH do meio, e conhecer o valor de K' em meio básico.

Summary

The experimental observation shows that the sharpness of the potentiometric titration curves of glutathione decreases when the thiol concentration increases. The theoretical interpretation of this fact has been made. Limitations and possibilities of the result obtained have been discussed.

Agradecimento: O autor agradece à Fundação Calouste Gulbenkian a bolsa que lhe foi concedida de Outubro de 1961 a Outubro de 1962.

BIBLIOGRAFIA

1. Vogel, A. I., *A Text Book of Quantitative Inorganic Analysis*, 93-94. Editado por Longmans, 2.ª edição (1960)
2. Cecil, R. e McPhee, J. R., (1955) *Biochem. J.*, 50, 234.
3. Cecil, R. (1955) *Biochim. et Bioph. Acta*, 18, 155.
4. Cecil, R. (1950) *Biochem. J.*, 47, 572.
5. Stricks, W. e Kolthoff, M. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 5673.
6. Calvin, M. (1954) em «*Glutathione: A Symposium*» pg. 9. Editado por Colowick, S. e al., Academic Press Inc., New York.
7. Pirie, N. W. (1959) em «*Glutathione*» (*Biochem. Soc. Symposia*, n.º 17), pg. 26-27.
8. Moore, W. J., *Physical Chemistry*, pg. 473-483. Editado por Longmans, Green and Co, 2.ª edição (1956).
9. Vicente Gonçalves, J., *Curso de Algebra Superior*, 2.º volume, pg. 79 (1950).
10. Schwarzenbach, G. e Anderegg, G. (1954) *Helv. Chim. Acta*, 37, 1289.