

OROMAR MOREIRA

LIVRE DOCENTE DE QUÍMICA FISIOLÓGICA DA
UNIVERSIDADE DE MINAS GERAIS. ASSISTENTE
DE FÍSICA BIOLÓGICA DA UNIV. DO BRASIL.

**ESTUDOS
DE
OXIDO-REDUÇÃO**
(REDOX DE ALGUNS CORANTES VITAIS)

Tese para catedrático de Física Biológica da Faculdade
de Medicina da Universidade de Minas Gerais.

Trabalho da Cadeira de Física Biológica da Fa-
culdade de Medicina da Universidade do Brasil.



OF. GRÁFICAS DE "A NOITE" — RIO DE JANEIRO — 1938

OROMAR MOREIRA

LIVRE DOCENTE DE QUÍMICA FISIOLÓGICA DA
UNIVERSIDADE DE MINAS GERAIS. ASSISTENTE
DE FÍSICA BIOLÓGICA DA UNIV. DO BRASIL.

ESTUDOS
DE
OXIDO-REDUÇÃO
(REDOX DE ALGUNS CORANTES VITAIS)

Tese para catedrático de Física Biológica da Faculdade
de Medicina da Universidade de Minas Gerais.

Trabalho da Cadeira de Física Biológica da Fa-
culdade de Medicina da Universidade do Brasil.



Apresentando este trabalho à Congregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais para candidatarmo-nos ao concurso da cátedra de Física Biológica, não nos move absolutamente a pretensão de trazer uma contribuição original, e nem nos anima a idéia de termos estudado profundamente o assunto.

Ciência em plena evolução, como muitas outras, a Físico-química e sobretudo, a Físico-química Biológica, tem na sua história um grande número de fatos que se sucedem.

Ora, uma grande descoberta ou uma engenhosa teoria fazem a sua época; criam-se conceitos, exageram-se as importâncias. Depois, tudo passa e esta teoria ou esta descoberta vem ocupar lugar mais modesto na formação do edifício da ciência.

O assunto do presente trabalho é destes que na hora atual se acha em estudo e sobre que se fundam grandes esperanças de que o conhecimento mais perfeito de sua natureza venha trazer um grande passo na marcha para a compreensão disto que tem sido a eterna preocupação dos sábios de todas as épocas: a vida.

Tivemos no presente ano a fortuna de acompanhar bem de perto o curso de Física Biológica da Faculdade de Medicina da Universidade do Brasil. Aí nos foi dada a oportunidade de auxiliar

a instalação do laboratório que terá por fim o estudo das reações de oxido-redução em biologia.

Exercitámos bem e adquirimos a técnica da determinação do potencial de oxido-redução de um sistema, realizando, por nós mesmos, todos os passos iniciais necessários à construção e montagem do aparelho utilizado para tal fim.

E é este trabalho preliminar que, descrevendo a técnica de que nos servimos, viemos aquí trazer com a presente publicação.

Nosso programa era e continua sendo mais vasto. Pretendíamos aplicar a técnica adquirida ao estudo dos fenômenos vitais.

Mas, exiguidade de tempo e dificuldades de outra ordem, fizeram restringir de muito as nossas pretensões.

E com esta rápida explicação ficamos na certeza de que nenhuma originalidade trouxemos à luz, mas resta-nos também o grande consolo de que cooperamos, com nossa experiência e com a nossa exposição, para o conhecimento de um assunto de biologia cuja importância cresce cada vez mais.

Aproveitamos a oportunidade para deixar aquí expressa a nossa gratidão ao prof. Carlos Chagas Filho, cujo apoio material e científico em todos os momentos facilitou a realização desta tese. E a todos os seus assistentes e auxiliares cujo espírito de solidariedade fez criar um ambiente inteiramente cordial, os nossos melhores agradecimentos.

OROMAR MOREIRA.

Rio, Dezembro de 1938.

I N T R O D U Ç Ã O

Fenômenos de oxidação e redução

Considerações gerais

Cresce dia a dia, e de uma maneira surpreendentemente espantosa, o produto dos esforços humanos para a pesquisa de fatos que nos parecem tão íntimos mas que na verdade nos são ainda inteiramente obscuros.

A tendência de se considerar bôa parte de todas as manifestações vitais como fenômenos de oxidação e de redução não é, de certo, inteiramente nova.

Quasi nenhuma idéia é inteiramente original e quasi nenhum assunto é completamente novo em medicina e em ciência geral.

Esta se forma pela juxtaposição lógica e bem ordenada de novos fatos que estão em ligação direta com outros já plenamente determinados.

A vida, a primeira e grande causa das cogitações do cérebro humano desde épocas as mais longínquas, permanece ainda sem solução definitiva. É como a esfinge misteriosa a zombar daqueles

que procuram a sua explicação. Muito se tem trabalhado mas a solução final está longe de ser atingida e parece mesmo inatingível.

Mesmo assim não se tem trabalhado em vão. Muito se tem aprendido; a inteligência humana tem satisfeito muitas de suas necessidades e o bem estar geral da humanidade, melhorado de uma maneira notável.

O mecanismo íntimo da vida é difícil de ser explicado em seus detalhes. A “proteína-virus” descoberta por Stanley (6) em 1937 nas folhas do tabaco turco infetadas pela doença do mosaico, cristalizada, quimicamente analisada e capaz de reproduzir de novo na planta a doença quando nela injetada, é de certo modo um grande passo dado em busca da solução, mas infinitamente pequeno ainda para vencer a grande distância que nos separa do dia em que pudermos provocar a geração espontânea.

A vida é a modificação de energias. Nenhuma manifestação vital pôde ser apresentada sem ser o resultado de modificações dos vários estados e natureza da energia.

As sínteses e as decomposições da matéria viva se realizam de uma maneira reversível: absorvem ou desprendem energia.

É deste conjunto de fenômenos, orientados todos para uma diretriz bem definida, que resulta a vida.

Muitas vezes muda-se o conceito ou o modo de considerar tal ou qual fato, mas a ignorância continua. Assim, pensava-se outrora que a vida fosse a manifestação de uma força que se opunha às leis cósmicas. Hoje, ao contrário, acredita-se que o ser

vivo seja antes subordinado perfeitamente a estas leis e não vivendo em antagonismo com elas.

Lavoisier, no século passado, já assemelhava este ser vivo a uma vela que se queima. A descoberta do oxigênio, o estudo da respiração e a analogia com o corpo orgânico em combustão, consumindo oxigênio e desprendendo gás carbônico, levaram-no a uma tal concepção.

E desde aí já vinha a noção de oxidação e produção de energia para o desenvolvimento dos fenômenos da vida.

Armand Gautier pôde mais tarde estender esse pensamento quando demonstrou que não era apenas uma simples oxidação que se passava nos alvéolos pulmonares.

O fenômeno inverso, a redução, se realizava também em todos os tecidos.

A quantidade de oxigênio diariamente eliminada sob as formas de gás carbônico, uréia e outros produtos, era maior do que a parte introduzida através a respiração pulmonar. Só dos tecidos poderia vir este oxigênio. Junto destes deveria haver então uma redução.

E a vida não era apenas o fenômeno de combustão de Lavoisier, mas muito mais do que isto: um processo reversível de oxidação e redução.

Fenômenos de oxidação e redução

Não é somente o ferro que se enferruja, a madeira que se queima e todos os outros fenômenos que se passam com fixação de oxigênio que estão sob a rubrica de fenômenos de oxidação. A noção é muito mais generalizada e podemos dividir em três grupos o modo de se apresentar este único fenômeno:

- a) oxigenação;
- b) deshidrogenação;
- c) perda de eletron.

Convem lembrar preliminarmente que tudo é perda de eletron; mas esta exposição é apenas didática e mostra com mais clareza uma série de fatos, de início com aparência de diversidade, mas que se explicam todos pelo mesmo mecanismo.

a) *Oxigenação:*

O oxigênio do ar ou de qualquer outra fonte é simplesmente fixado por uma molécula qualquer — é o caso dos per-óxidos, da hemoglobina, da combustão do carbono etc.

Exemplo:



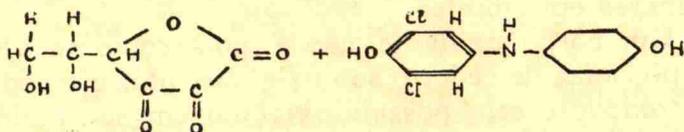
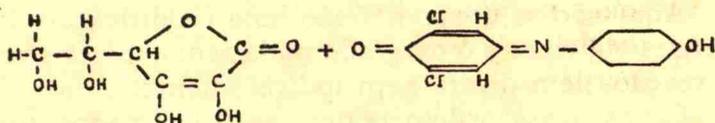
b) *Deshidrogenação:*

Outras vezes pôde acontecer, sobretudo em certos corantes ou em seus leucoderivados, que a ação do oxigênio faça-os mudar de côr.

Esta oxidação se dá entretanto sem que o oxigênio apareça na constituição estrutural de sua molécula.

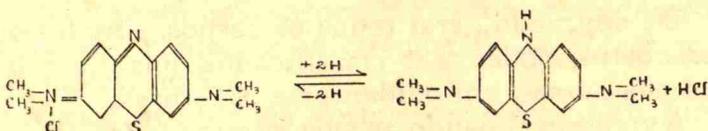
O que se passou foi a saída de dois átomos de hidrogênio da molécula, átomos estes que, juntamente com o oxigênio presente, foram constituir uma molécula de água. Este primeiro fenômeno de deshidrogenação está então ligado a um outro que se segue: formação de água.

Exemplo disto está na oxidação do 2:6 diclorofenolindofenol pelo ácido ascórbico.

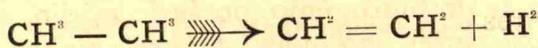


Reação do ácido ascórbico com o 2:6 diclorofenolindofenol.

É o que se passa, também, com o azul de metileno, cuja solução aquosa na forma reduzida é incolor. Possui a seguinte fórmula:



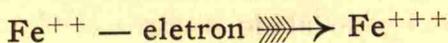
ou mais simplesmente, como no caso da oxidação da etana para etileno:



c) *Perda de eletron:*

Outras vezes póde acontecer, e este é o caso mais comum, que o sal de um metal divalente passe para trivalente, ou um trivalente passe para tetra ou pentavalente. Isto é, ha um aumento da valência do metal.

Citaremos como exemplo o caso do sal ferroso passando para sal férrico e que, de uma maneira geral, póde ser assim representado:



Aquí não se observa sinão uma modificação de cargas elétricas e o oxigênio nada tem que ver com a reação, nem direta nem indiretamente.

Casos desta ordem podem ser observados aos milhares em química.

Um corpo oxidante não é pois somente um corpo capaz de ceder o seu oxigênio, pois ele pôde ser oxidante sem possuir oxigênio em sua molécula. Ha um sentido muito mais geral.

Podemos dizer que ha fenômeno de oxidação todas as vezes que houver perda e eletron, carga negativa. Ao inverso, isto é, ao aumento de carga negativa por ganho de eletrons, é que se dá o nome de redução.

De um modo geral todos os corpos, simples ou compostos, podem ser classificados, uns em relação aos outros, em oxidantes e redutores.

Oxidantes: quando as suas propriedades são de um certo modo análogas às do oxigênio, cloro, fluor, etc.

Redutores: quando estas propriedades se assemelham às do hidrogênio, potássio, sódio, etc.

Os oxidantes são quasi sempre comburentes e eletronegativos; os redutores são combustíveis e eletropositivos.

Na ordem decrescente de suas propriedades oxidantes podemos dispôr assim os principais corpos simples:

F	}	oxidantes fortes
Cl		
O		
Br	}	oxidantes fracos
I		

S oxidante fraquíssimo

E os redutores:

K^+ }
 Na^+ } alcalinos

Ba^{++} }
 Ca^{++} } alcalino-terrosos

Mg Al
Zn Mn

$Cr^{++}(+++)$ $Fe^{++}(+++)$

Não é esta uma disposição absoluta. Póde muitas vezes, conforme as circunstâncias, sofrer certas modificações.

Quasi sempre os corpos oxidantes têm uma afinidade muito grande para os redutores e, a reação entre eles é tanto mais intensa quanto maior o seu grau ou capacidade de oxidação ou redução.

De um modo geral podemos escrever o esquema de tais reações:

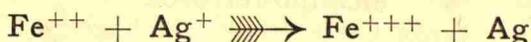
oxidante + redutor $\ggg \rightarrow$ corpo indiferente

Os oxidantes mais comuns da química mineral devem esta propriedade à capacidade de ceder o oxigênio quando se dissociam.

Outros, como os halogênios já não têm oxigênio e são capazes de retirar diretamente a carga negativa do corpo oxidavel



Alguns ainda, como os sais de prata ionizados em uma solução, podem ter em relação a outros, como por exemplo os de ferro, a capacidade de oxidação dependente da concentração. Quer dizer que o acréscimo ou a diminuição de eletricidade negativa, variando a sua carga em relação à do outro, póde torná-lo oxidante:



Em resumo: a oxidação não é simplesmente um fenômeno de fixação de oxigênio por determinado corpo, mas póde ser consequência também de uma deshidrogenação, da ionisação de um metal, do acréscimo de eletricidade positiva ou diminuição de eletricidade negativa ou, de um modo geral, da perda de um eletron.

Como Deriberé (8) podemos resumir todos estes fenômenos no seguinte quadro:

<i>Oxidação</i>	<i>Redução</i>
1) Fixação de oxigênio	1) Fixação de hidrogênio
2) Desprendimento de hidrogênio	2) Desprendimento de oxigênio
3) Fixação de halogênio	3) Perda de halogênio
4) Perda de eletron	4) Fixação de eletron
5) Adição de eletricidade positiva	5) Adição de eletricidade negativa
6) Perda de eletricidade negativa	6) Perda de eletricidade positiva

A concepção moderna que temos da constituição da matéria, dá-nos uma noção bastante concretizada deste fenômeno de perda de eletrão. Assim, um átomo qualquer, de acordo com a teoria de Bohr, ocupando uma determinada posição na escala de classificação de Mendeleeff, é considerado como sendo formado de vários eletrões. Estes possuem uma carga elétrica que se representa por $-n e$ e gravitam em torno de um núcleo central cuja carga elétrica, de sentido contrário é $+ n e$. A distribuição das órbitas destes eletrões se faz por camadas, tendo cada uma um número bem determinado de eletrões. A partir do centro para a periferia elas levam as denominações de K, L, M, etc. A camada externa é a que confere ao átomo várias de suas propriedades, tais sejam, valência, espectro luminoso, propriedades químicas.

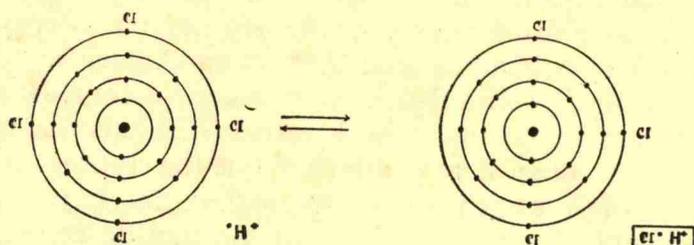
Da sua saturação de eletrões ou seja, do número completo ou não de eletrões que ela pôde conter, depende a estabilidade do átomo.

O tricloreto de titânio, por exemplo, pôde ser oxidado para tetracloreto, isto é, pôde ganhar uma valência, perdendo uma carga elétrica negativa. O tricloreto seria representado como se tivesse 3 eletrões na última camada (N) e 9 na penúltima.

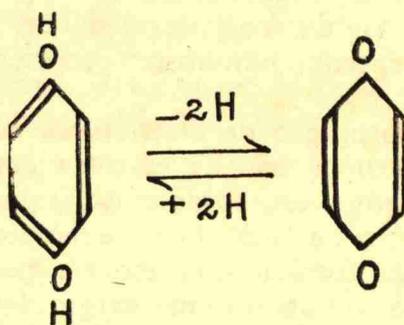
Mas nem sempre é o caso, porque, estando em uma solução aquosa, em que em virtude da ionização nós temos uma determinada quantidade de ions H^+ , ou seja, cargas elétricas positivas fornecidas pela água ao se ionisar, o eletrão do titânio não permanece na camada última de seus iguais, mas vai neutralizar uma carga positiva H^+ .

Diz-se então que à oxidação do corpo corres-

ponde um ganho de carga negativa por parte do meio.



Outro exemplo clássico de oxidação de um corpo orgânico é este fornecido pela hidroquinona:



Aquí o fenômeno póde ser decomposto em duas fases, por assim dizer:

Na primeira fase os dois átomos de hidrogênio da molécula se oxidam, perdendo cada um o seu elétron. Na segunda fase, segue-se a dissociação da hidroquinona em H^+ e quinona. Isto se o meio for alcalino.

FENÔMENOS BIOENERGÉTICOS

O estudo dos fenômenos de oxidação que se passam nos seres vivos foi durante muito tempo feito, quasi que exclusivamente na base da determinação de oxidações em que toma parte o oxigênio livre absorvido.

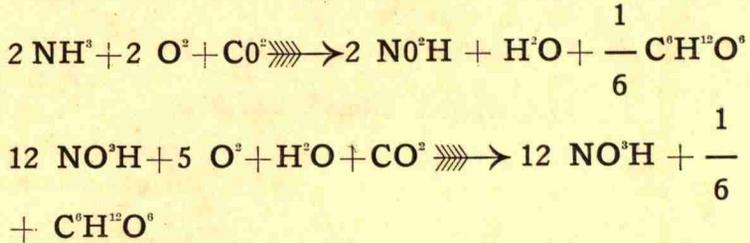
Foram os trabalhos de Pasteur sobre a fermentação, e mais recentemente os de Molliard (40) que chamaram a atenção dos biólogos para certa classe de fenômenos que se processam nos seres vivos sem, entretanto, a fixação do oxigênio livre da respiração.

No ponto de vista bioenergético, estes fenômenos têm especial importância porque é por meio deles que se póde fazer com que o conjunto de sínteses que aí se realizam correspondam, por reduções que são, à elevação do potencial químico ou seja, um aumento de energia livre.

Isto estaria em desacordo, é claro, com o segundo princípio da termodinâmica.

Assim então, a conjugação destes fenômenos de síntese com os de oxidação sem o oxigênio molecular, constituindo fenômenos de oxido-redução, faria com que o ciclo da energia vital fosse termodinamicamente possível.

É bem claro que muitas vezes o oxigênio molecular tem de entrar em cena para compensar um excesso grande de energia livre, como no caso das bactérias nitrificantes, segundo o esquema:



Em outros casos a fixação de oxigênio molecular produz tal diminuição da energia livre, que o fenômeno é irreversível.

O problema mais íntimo da bioenergética celular passa a ser, portanto, o estudo dos fenômenos de oxidação que se passam no interior das células.

Renè Wurmser (32) colocou este problema no seu ponto de vista exato: a constância da forma e regime de vida implicam um mecanismo regulador dos processos metabólicos intracelulares.

A hipótese cinética de Hering (32) que admite a igualdade das velocidades de assimilação e desassimilação, póde ser interpretada pela ação das diastases, cujo sentido de reação depende da concentração do substrato.

Esta hipótese póde ser substituída se adotarmos para as fases dos ciclos, condições de reversibilidade, o que vem a ser apenas, admitir que sejam idênticas as vias de síntese e de degradação e que as velocidades sejam muito grandes em relação aos processos irreversíveis.

Basta, para simplificar o mecanismo, admitir que haja nestas, várias fases, estados intermediá-

rios comuns aos vários ciclos, e teremos assim um sistema em tamponamento termodinâmico; quer dizer, um sistema em que um processo de aumento de energia livre é logo compensado por um outro processo em direção oposta.

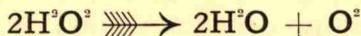
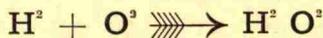
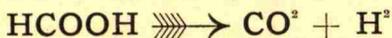
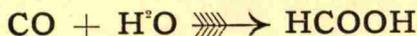
Assim, nos seres vivos, os fenômenos de oxidação-redução passar-se-iam sempre com uma compensação perfeita de sua variação entrópica.

Resta saber agora qual será o elemento capaz de servir de conjugação entre os vários sistemas oxido-redutores em evolução.

Trabalhos mais recentes, nesse sentido, vieram mostrar que a teoria mais aceitável é a de Wieland.

Póde admitir-se então, que o elemento que vem servir de tampão é o hidrogênio mobilizado pela desidrase, segundo a teoria de Wieland, que é a seguinte.

O mecanismo essencial da oxidação dos tecidos é a mobilização do hidrogênio. Assim, por exemplo, é o caso do monóxido de carbono. A sua oxidação póde realizar-se de acordo com a seguinte marcha de transformações:



Outro exemplo bastante interessante e que se acha baseado em fundamentos experimentais, é o do ácido láctico oxidado em ácido pirúvico.

Tem-se mostrado que na ausência de oxigênio,

várias bactérias podem operar esta transformação à custa de enzimas específicos chamados desidrogenases ou, mais simplesmente, desidrases.

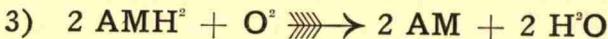
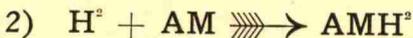
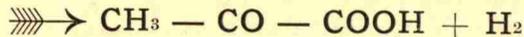
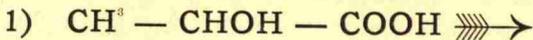
Esta transformação póde facilmente ser observada quando se ajunta azul de metileno ao meio.

O hidrogênio desprendido vai reduzir este corante, fazendo-o passar da forma oxidada à leuco-derivada.

Adicionando agora oxigênio molecular, a forma oxidada é de novo recuperada e aparece a coloração azul; os dois átomos de hidrogênio se vão unir ao oxigênio, formando uma molécula de água.

Esta concepção de Wieland da mobilização do hidrogênio é completada pela hipótese de Warburg do transporte do oxigênio.

De fato, as reações que se passam obedecem mui provavelmente à seguinte sequência:



O papel que aquí faz o azul de metileno é nos tecidos representado pelo fermento respiratório de Warburg (26).

Torna-se então necessária para realização completa do fenômeno a existência de corpos eletro-negativos.

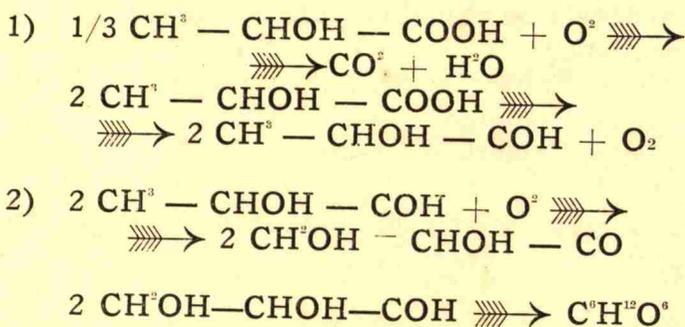
Estes são constituídos na sua maioria por pigmentos e correspondem aos transportadores de oxigênio da teoria de Warburg.

Dentre eles estão, como principais representantes, o citocromo de Keilin e a citoflavina de Warburg e Christian.

Uma das provas que temos disto é a modificação da concentração do hidrogênio no meio celular, trazendo como consequência diferentes tipos de reações de oxido-redução.

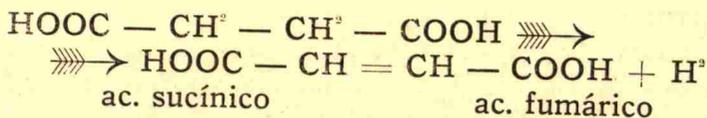
Vejam agora um exemplo de reação de oxido-redução correspondendo a uma variação perfeita de energia livre: a formação de uma hexose no organismo, a partir do ácido láctico. Este é um fato por demais provado para não mais merecer nenhuma dúvida.

As fases pelas quais passa este ácido para chegar ao glucide são provavelmente as seguintes:



Exemplo não menos interessante é dado pela oxidação do ácido succínico em ácido fumárico e que os trabalhos de Borsook e Schott determinaram com precisão (3).

Nesta reação:



devemos levar em conta não só a energia livre de formação de um sólido, mas ainda as energias de dissolução e de ionisação.

a) a energia livre de formação de um sólido, calculada por meio dos calores específicos e dos calores de reação, deu para estes dois corpos os seguintes resultados:

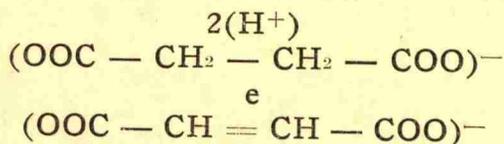
ácido sucínico — — 178.800 calorias
ácido fumárico — — 156.720 calorias

b) como energia de dissolução denominamos o trabalho desenvolvido para se fazer passar uma molécula de uma solução saturada a uma concentração cuja atividade seja igual a 1.

No caso dos ácidos acima referidos foram achados, por meio de medidas crioscópicas, os seguintes resultados:

ácido sucínico — + 288 calorias
ácido fumárico — + 1.820 calorias

c) a energia livre correspondente à ionisação desses ácidos em seus ions



respetivamente, calculada por intermédio das constantes de dissociação, forneceu os números abaixo:

ácido sucínico — + 13.420 calorias
ácido fumárico — + 10.270 calorias

Somando-se respectivamente todas estas energias de cada um dos corpos estudados e procurando-se a diferença entre elas, vamos verificar, no computo final, que os processos de transformação trouxeram uma variação de energia livre.

<i>Energia livre</i>	<i>Ácido succínico</i>	<i>Ácido fumárico</i>
Solidificação	—178.800 cal	—156.720 cal
Dissolução	+ 288 "	+ 1.820 "
Ionisação	+ 13.420 "	+ 10.270 "
TOTAL	—165.092 cal	—144.630 cal

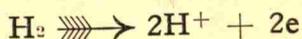
$$\text{Dif.} = (-144.630) - (-165.092) = +20.460 \text{ cal}$$

20.460 calorias foi a variação de energia correspondente à reação de oxidação do ácido succínico para ácido fumárico.

CORPOS ELETROATIVOS

Pelo que já vimos, a teoria de Wieland dá ao hidrogênio uma importância capital no mecanismo destes fenômenos de oxidação e redução.

Para que haja um equilíbrio final entre os constituintes das diversas reações é necessário que o hidrogênio esteja também em estado de equilíbrio com os seus ions que se dissociaram:



É por meio desta ionização do hidrogênio que se realizam as trocas de diversas energias nos meios biológicos.

Wurmser propôs o nome de *eletroatividade* para denominar os corpos que se oxidam ou que se reduzem reciprocamente, mudando as suas cargas elétricas.

O que se pôde verificar entretanto, nos meios celulares, é a existência de uma grande parte de substâncias orgânicas que interferem ativamente no metabolismo da célula e que não têm essa capacidade de ganhar ou perder facilmente eletrons. Mas nem por isso as oxidações deixam de se realizar.

Tais fenômenos se passam graças à ação de agentes catalisadores a que Thunberg chamou de *deshidrases*.

Estes enzimas vão agir sobre corpos eletroativos intermediários e tomar então a carga elétrica, estabelecendo um novo equilíbrio eletro-químico necessário à realização de tal ou qual reação.

Estes corpos intermediários podem receber ou ceder o hidrogênio com relativa facilidade. Têm sido às vezes considerados como agentes da respiração celular porque, por um mecanismo indireto podem levar o oxigênio à célula.

Papel mais importante entretanto, e mais geral, é o de poderem manter o equilíbrio do hidrogênio com seus ions, graças às suas propriedades eletroativas.

Tais corpos intermediários de reações existem bastante espalhados em todas as células e podemos, para maior clareza de exposição, dividi-los em 4 grupos:

- 1) Pigmentos;
- 2) Derivados do benzeno;
- 3) Derivados dos glúcides;
- 4) Compostos sulfidrilados.

Pigmentos:

Bem grande é a série destes que já foi estudada. Os dois representantes mais importantes deste grupo são o *citocromo* de Keilin e a *citoflavina* de Warburg e Christian (26).

Citocromo foi o nome dado por Keilin a um composto da hematina que Mc Munn já havia encontrado, por pesquisa espectroscópica, no tecido muscular. É um pigmento muito espalhado nas bactérias, levedos e nas células dos animais supe-

riores faltando, entretanto, nos seres de vida anaeróbia. Sua concentração é diretamente proporcional à atividade fisiológica da célula.

Existem três variedades com pequena diferença de constituição química e o espectro de suas formas oxidada e reduzida é claramente definido, para permitir a comprovação, nas células, das oxidações e reduções pelas quais ela está constantemente passando.

Citoflavina foi encontrada por Richard Kuhn na clara do ovo, no levedo, no leite e tomada a princípio como uma grande fonte de vitamina B₂.

Warburg e Christian puderam mais tarde (26) demonstrar que ela é a própria vitamina B₂.

Outros pigmentos até agora estudados como capazes de executar, nas reações dos seres vivos, um papel de corpos eletroativos intermediários, são os seguintes:

Hemoglobina
Hemocianina
Piocianina
Hermidina
Clororafina
etc.

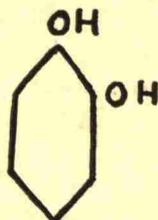
Derivados benzênicos:

Entre eles citam-se, como representantes principais, os seguintes compostos:

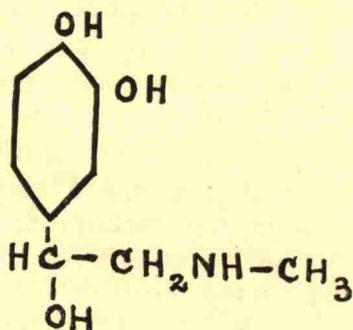
- 1) *Hidroquinona* que é o *para-dí-hidroxi-benzeno* e cuja fórmula oxidada é bastante instável.



- 2) *Pirocatecol* que é o *orto-di-hidroxi-benzeno* cuja fórmula oxidada já goza de grande estabilidade.



- 3) *Adrenalina* que é um catecol com um grupo *hidroxi-etilmetilamina*.



Derivados glucídicos:

Até agora, as principais substâncias deste grupo já estudadas são a *redoxina*, a *reduçona* e o *ácido ascórbico*.

A *redoxina*, cujo estudo foi realizado por Wurmser (32) caracteriza-se ao espectro de absorção por uma franja de absorção situada no 2.780 A° em uma solução com pH 7,0.

Parece formar-se espontaneamente em todas as soluções de glucides redutores e deve ser encontrada nos meios celulares. —

A *reduçona*, que von Euler descobriu é a fórmula enólica do aldeído tartronico



e teve o seu espectro de absorção e o seu potencial de oxido-redução determinados por Wurmser, Mayer e Crepy em 1936 (33).

O ácido ascórbico, descoberto por Szent-Gyorgyi (24) é a vitamina C.

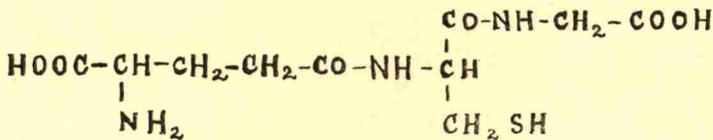
Sua capacidade de oxido-redução muito se assemelha à dos outros derivados glucídicos que acabamos de enumerar.

Sua fórmula de constituição já foi mostrada no primeiro capítulo deste trabalho.

Derivados sulfidrilados:

O conhecimento da ação que possam ter estes compostos nos processos de mudança de energia nos meios biológicos está longe de ser completo. A este grupo pertencem a *cisteína* e os compostos que a encerram na sua constituição molecular.

A sua importância biológica começou a ser suspeitada quando Hopkins (17) descobriu em 1921 a *glutathione*, tripéptide que encerra a glicina, o ácido glutâmico e a cisteína e que se acha bastante espalhada na constituição de todos os seres vivos.



Esta é a sua fórmula de constituição quando na forma reduzida. Quando oxidada, o radical —SH seria substituído por —S—S—.

Foi Meyerhof quem observou em primeiro lugar a atividade respiratória dos radicais sulfidrilados.

Thunberg, em 1925, pôde verificar que a cisteína é auto-oxidável.

A forma oxidada da glutathiona é prontamente reduzida pelos tecidos e as pesquisas realizadas nesse sentido levam a supor que esta redução traga como consequência a oxidação das gorduras não saturadas e dos amino-ácidos.

TEORIA DAS PILHAS

Para facilidade do desenvolvimento do raciocínio no estudo do potencial de oxidação e redução que devemos fazer no próximo capítulo, julgamos útil recordar aqui, rapidamente, a teoria das pilhas.

A força eletromotora de uma pilha, ou seja, o seu potencial quando medido em circuito aberto, tem como valor uma expressão matemática que pôde ser deduzida dos princípios da termodinâmica ou da teoria cinética. Esta última serviu de meio pelo qual Nernst deduziu a equação que leva o seu nome.

Sabe-se que quando um metal é colocado em um líquido, água por exemplo, aparece uma diferença de potencial entre ele e o mesmo líquido. A explicação desse fato é dada pela hipótese de que o metal, ao ser mergulhado no líquido, cede a estes ions metálicos carregados positivamente. A quantidade de eletricidade levada por estes ions pôde ser grande e, então, o metal torna-se carregado negativamente em relação ao líquido solvente.

Podemos observar que esta diferença de cargas ou de potencial, será tanto maior quanto maior for a concentração de ions metálicos dissolvidos no líquido.

Esta capacidade de emitir ions e que Nernst denominou *pressão de dissolução* é limitada; naturalmente depois de um certo ponto, devido á atração eletrostática dos ions emitidos e dos que permanecem no metal, é atingido o limite. De fato, se aumentarmos a concentração de cations no líquido, chega-se a um ponto em que a atração eletrostática dos ions negativamente carregados da placa metálica sobre os de carga positiva, nas proximidades dessa placa, vem criar uma barreira à passagem de novas cargas.

O potencial criado por este mecanismo vai depender da concentração eletrolítica do líquido ou seja, da pressão osmótica dos ions desse líquido.

Se passarmos agora ao caso de um metal que seja introduzido em uma solução de um de seus sais, podemos ter três casos diferentes, segundo o grau de solubilidade destes sais.

1.º — A solubilidade é muito pequena e a solução nunca atingirá uma concentração tal que possa impedir a passagem de ions do metal para o líquido.

O metal emitirá então seus ions positivos indefinidamente, tornando-se sempre negativo em relação à solução.

Tal é o que se passa com o zinco e com o magnésio. E esta é a explicação porque quasi que em todas as pilhas o eletródio de zinco corresponde ao pólo negativo.

2.º — A concentração do líquido póde ser muito grande graças a um forte grau de solubilidade de seus sais. A pressão osmótica desta solução é capaz, não somente de evitar a passagem de ions do metal para o líquido, como ainda agir em sentido contrário.

Ela vence a atração eletrostática entre ions do metal e o líquido, produzindo o depósito de ions positivos no metal. Este terá então um potencial positivo, como acontece com o mercúrio, o cobre, a prata etc.

3.º — O terceiro caso que se póde dar é aquele em que a pressão de dissolução do metal seja exactamente equilibrada pela pressão osmótica da solução.

Neste caso haverá sempre equilíbrio de cargas eléctricas e o potencial será sempre nulo.

Desta série de fatos nós podemos tirar uma explicação prática, tal como a de se poder determinar a concentração iônica de uma solução por meio da medida do potencial de um sistema formado.

Baseado nas leis de Van t'Hoff, que estabelecem a analogia das soluções com os gases perfectos, Nernst estabeleceu a equação que regula este fenómeno.

O metal que se introduz no líquido possui, vamos supôr, uma pressão de dissolução igual a P . Esta dissolução vai cessar quando a pressão osmótica p do líquido for igual a P .

A pressão osmótica tem, segundo Van t'Hoff, o seu valor representado por uma equação análoga à dos gases:

$$pV = nRT$$

E, quando fazemos passar um ion-grama da solução para o metal e vice-versa, estamos realizando um trabalho que tem a mesma expressão que

aquele necessário para fazer a passagem de um gás de uma pressão p à outra P , e vice-versa.

$$E = RT \log e \frac{P}{p}$$

Nas soluções, cada ion-grama realiza o trabalho de um faraday, e temos então a seguinte equação:

$$E = \frac{RT}{nF} \log e \frac{P}{p}$$

sendo E o trabalho realizado, potencial elétrico ou força eletromotora; R a constante dos gases perfeitos (8,32 volt-coulombs); T a temperatura absoluta; n a valência do ion e F o faraday (96.500 coulombs).

Vê-se pois que, se conhecermos o valor de P , torna-se fácil determinarmos o de p ou seja, a concentração iônica de uma solução.

Na prática isto se realiza comparando-se o potencial de uma pilha assim constituída com o de uma outra, padrão, cuja concentração iônica seja previamente conhecida. Unindo estas duas pilhas vamos obter uma diferença de potencial que póde assim ser representada:

$$E - E_0 = \frac{RT}{nF} \log e C_1 - \frac{RT}{nF} \log e C_2$$

ou

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} 2,303 (\log_{10} C_1 - \log_{10} C_2)$$

ou ainda:

$$E = E_0 + \frac{2,303 \times RT}{nF} \log_{10} \frac{C_1}{C_2}$$

em que

E é o potencial do eletrodo da solução cuja concentração C_1 é conhecida e E_0 é o potencial do eletrodo da solução desconhecida, cuja concentração é C_2 .

Este é o caso mais simples, constituído pelas chamadas “pilhas de concentração”.

Comumente utilizamos os eletrodos de segunda natureza que são representados por um metal mergulhado numa solução saturada de um dos seus sais, na presença desse sal no estado sólido.

Ao se unir um desses potenciais a um outro de referência com o qual deve ser comparado, formamos um circuito fechado e, se a mobilidade de ions de um e outro lado for diferente, teremos uma diferença de potencial devida, simplesmente, à junção de líquido para líquido.

Habitualmente se evita este inconveniente, fazendo-se ligar as duas pilhas por uma ponte constituída por solução saturada de cloreto de potássio.

A diferença de potencial entre líquido e líquido terá, aquí, então, o seguinte valor:

$$E = - \frac{u - v}{u + v} \cdot \frac{RT}{nF} \log \frac{C_1}{C_2}$$

onde:

u — Velocidade do anion Cl^-

v — Velocidade do cation K^+

Se a solução for saturada, u e v têm o mesmo valor; o primeiro termo então se anulará e não haverá diferença de potencial.

POTENCIAL DE OXIDO-REDUÇÃO

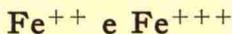
Um caracter comum de quasi todas as reações que se passam nos meios celulares, é a reversibilidade.

Nas reações de oxidação e redução, onde existe essa reversibilidade, o processo final é determinado quando se atinge a um equilíbrio entre a forma oxidada e a reduzida.

Esse ponto final de equilíbrio depende, naturalmente, da capacidade redutora ou oxidante do meio.

Vamos tomar aquí o exemplo clássico da oxidação do ferro para melhor se compreender o fenómeno e ao mesmo tempo ter-se uma idéia do processo de determinação do potencial elétrico de um sistema de oxido-redução.

Imaginemos o caso da oxidação de um sal ferroso em sal férrico. Tomemos duas soluções, cada uma das quais contendo proporções diferentes de ions ferrosos e férricos:



em concentrações diferentes. Mergulhemos um eletrodo inerte em cada uma delas e, por meio de um condutor elétrico, fechemos o circuito, for-

mando assim uma pilha de funcionamento reversível.

Possuindo essas soluções, concentrações diferentes de ions, o transporte de eletrons que se verifica através o condutor, condiciona uma força eletromotora cuja intensidade póde ser medida e, segundo Van t'Hoff, determina a atividade da reação. Neste caso podemos medir a concentração da forma oxidada de uma das soluções simplesmente pela determinação desta força eletromotora. Isto se tomarmos a outra como comparação, conhecendo naturalmente a proporção de formas oxidadas e reduzidas e o seu respectivo potencial.

Podemos aplicar a fórmula de Nernst para a determinação da força eletromotora assim formada no circuito:

$$E_h = E_o - \frac{RT}{nF} \log \frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]}$$

E, generalizando-a para todos os casos, vem:

$$E_h = E_o - \frac{RT}{nF} \log \frac{[Red]}{[Oxi]}$$

E_h é a diferença de potencial observada entre o eletrodo da solução e o eletrodo normal padrão de hidrogênio;

E_o é característica constante de cada sistema de oxido-redução em equilíbrio. E, se fizermos a

relação $\frac{[Red]}{[Oxi]} = 1$, E_o será igual a E_h .

Já que o hidrogênio tem uma função fundamental no equilíbrio das reações de oxido-redução, como já vimos linhas atrás, podemos considerar que esse sistema está em equilíbrio com ions hidrogênio. E a concentração destes, por sua vez, está na dependência do hidrogênio molecular (H), em virtude da bem conhecida relação entre elementos dissociados e não dissociados.

Como consequência, pôde tirar-se logo a seguinte conclusão, que exprime a relação entre capacidade de oxidação do sistema e pressão de hidrogênio no mesmo: “a todo potencial de oxido-redução de um sistema corresponde uma pressão de hidrogênio”. Esta pressão será tanto maior quanto menor for o poder de oxidação e vice-versa.

E isto é claro, pois que um sistema é facilmente oxidavel quando tem grande facilidade em perder eletrons. Esses eletrons devem ser equilibrados pelas cargas positivas do hidrogênio ionizado. Se a ionisação deste é grande, a sua forma molecular diminue e, por conseguinte, será pequena a pressão.

Notação rH

Indiretamente poderá a pressão de hidrogênio de uma solução indicar a capacidade de oxido-redução do sistema. Acontece porém que os valores desta pressão, expressos em atmosferas, são muito pequenos, representando portanto, frações mínimas. Mansfield Clark propôs, em analogia com a notação pH de Sörensen, exprimir essa concentração molecular pelo seu logaritmo sem o sinal negativo precedido do símbolo *rH*. Assim:

$rH = -\text{logaritmo da pressão de hidrogênio}$

Se, por exemplo, a pressão deste hidrogênio,

como acontece em certos meios celulares, corresponde a $\frac{1}{10^{12}}$ de 1 atmosfera, ou seja 10^{-12} podemos escrever da seguinte maneira:

$$rH = 12$$

Naturalmente que a concentração de ions hidrogênio do meio, ou seja, o pH, ha de ter uma influencia muito grande nessa capacidade de oxido-redução.

De fato, um pH menor, trazendo uma maior concentração de ions H com carga positiva, ha de influenciar sobre a perda de eletrons do sistema oxidado, no sentido de facilitar esse fenômeno, e vice-versa. Daí a importância capital de se verificar o pH do meio quando se determina o seu potencial de oxido-redução.

Pela feliz analogia, esse modo de representação criado por Clark fez época em tempos atrás. Agora, porém, vai sendo pouco a pouco posto de parte; e procura-se representar o potencial de oxido-redução diretamente em milivolts, relacionado com o eletrodo normal de hidrogênio.

Não se ha de negar que, para o caso da concentração de ions hidrogênio de uma solução, a representação logaritmica traz facilidades tipográficas ao mesmo tempo que dá uma idéia imediata da grandeza dessa concentração.

O mesmo não acontece porém no caso da pressão de hidrogênio. Esta possui uma zona de variação muito extensa e a sua expressão não nos póde dar uma noção imediata de seu valor; enquanto que a representação em milivolts, com um limite de variação mais reduzido, traz maiores facilidades.

PROCESSOS DE DETERMINAÇÃO

Em analogia com os meios de determinação do pH de uma solução, existem dois métodos para a determinação do potencial criado por um sistema oxido-redutor: eletro métrico e colorimétrico.

a) Eletrométrico.

É o método mais geral e aquele que nós poderíamos chamar de *direto*, por determinar diretamente o valor da força eletromotora criada pela diferença de potencial entre o sistema a estudar e um outro de valor conhecido.

Esta medida se faz empregando o princípio da oposição de Poggendorf, que consiste em se opôr à força eletromotora assim criada, uma outra de valor bem conhecido.

Uma resistência constituída por um fio metálico muito homogêneo em natureza e dimensões fará criar uma resistência à passagem da corrente mais forte até igualar sua intensidade à da outra. Neste ponto, um galvanômetro disposto no dispositivo acusará a igualdade.

Da relação entre os segmentos do fio que serviu de resistência e o valor da força eletromotora de oposição, valor este que é conhecido por ser fornecido por uma célula padrão tipo Weston, pôde determinar-se facilmente o valor da força eletromotora criada pelo sistema que está sendo estudado.

A diferença entre a leitura encontrada para esta e o potencial de referência, geralmente constituído por um eletrodo de calomelanos, dará o valor do potencial de oxido-redução na temperatura em que se realizou a experiência e no pH que for determinado.

b) Colorimétrico.

Uma das conseqüências bastante interessantes e de grande utilidade dos estudos de Clark, foi o estabelecimento de uma grande série de substâncias corantes que, pela sua coloração ou descoloração, podem indicar o potencial de oxido-redução dos sistemas a que forem adicionadas.

Muitas substâncias corantes, de natureza química a mais variada (indo-fenóis, indigo, etc.) tornam-se incolores quando reduzidas. Cada um desses corantes tem a sua redução, isto é, uma passagem para leuco-derivado em um potencial próprio.

Clark pôde conseguir então uma escala de corantes que se tornam incolores pela redução e dispô-los em uma tal ordem que um seja oxidante em relação ao que lhe vier logo abaixo.

A seguir vamos reproduzir a escala acrescida agora de um maior número de substâncias estudadas, a qual existe também em qualquer manual que trate do assunto.

<i>Indicadores</i>	<i>E_o (volt)</i> <i>pH = 7.</i>
m. bromofenol indofenol	+ 0,248
o. clorofenol indofenol	+ 0,233
cloreto de azul de fenol	+ 0,227
2:6 diclorofenol indofenol	+ 0,217
m. cresol indofenol	+ 0,210
o. cresol indofenol	+ 0,195
2:6 diclorofenol-indo-o-cresol	+ 0,181
1 naftol 2 sulfonato indofenol	+ 0,123
cloreto de azul de toluileno	+ 0,115
cloreto de azul de cresil brilhante ..	+ 0,047
azul de metileno	+ 0,011
azul de toluidina	+ 0,011
tetrasulfonato de indigo	— 0,046
azul de metil capri	— 0,061
trisulfonato de indigo	— 0,081
azul de Nilo	— 0,122
disulfonato de indigo	— 0,125
monosulfonato de indigo	— 0,150
violeta de cresil	— 0,167
azul neutro	— 0,192
sulfonato de beta antraquinona	— 0,250
verde de Janus	— 0,258
safranina T	— 0,289
vermelho neutro	— 0,340
etilviologênio	— 0,449

IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Já ha muito tempo que a redução de certos corantes, com respetiva mudança de côr, foi utilizada em biologia para a verificação do estado de funcionamento de certos tecidos.

A primeira tentativa de avaliação do grau do potencial de oxido-redução dos tecidos foi feita por Ehrlich. Introduzindo nos vários tecidos matérias corantes diversas, pôde ele verificar que cada um tem poder de oxido-redução diferente e os dividiu logo em três grupos:

1.º) tecidos que reduzem o indo-fenol e que têm, então, alto potencial;

2.º) tecidos que reduzem o indo-fenol mas que não reduzem o azul de alizarina. Estes têm uma capacidade média;

3.º) tecidos que reduzem o azul de alizarina, tendo então um potencial baixo.

Ao primeiro grupo fazem parte, principalmente, a matéria cinzenta do cérebro, o coração, etc. Ao segundo pertencem a maioria dos tecidos e ao terceiro fazem parte o tecido pulmonar, o tecido hepático e as gorduras.

Em condições patológicas estas propriedades se modificam inteiramente.

A determinação do potencial de oxido-redução de um tecido, foi sempre rodeada de um grande número de dificuldades.

Na manipulação para se obter os sucos dos tecidos para a determinação eletrométrica, qualquer traço de oxigênio influencia de uma maneira extremamente sensível.

A introdução de indicadores corados não pôde ser realizada sinão mais contemporaneamente quando Chamber desenvolveu o seu método de micro-dissecção.

Aplicando este método, Needham pôde, por injeção de indicadores no interior da célula, determinar o seu rH. Interessante conclusão de suas pesquisas foi a diferença encontrada entre as células animais e vegetais, entre células anaeróbias e aeróbias.

Para as células animais foi encontrado um rH em torno de 19 a 20 ou seja, um potencial cerca de 0,200 volts e, para as vegetais, entre 14 e 18 ou seja, um potencial em torno de $-0,081$ e $+0,120$.

Para as células anaeróbias achou-se um rH oscilando entre 13 e 0, o que corresponde a um potencial de 0,081 a $-0,450$.

Joyet-Lavergne determinou nas células as zonas em que os processos de oxido-redução são mais intensos e verificou que elas correspondiam sempre a uma concentração mais rica em glutathione.

Benzançon e Wolff estudaram o poder oxidoreductor da célula renal e observaram que a eliminação do azul de metileno, nas formas corada ou leuco, dependia do pH. E que na diurese o rim deveria ser a séde de reações químicas que correspondem a um rH = 15.

Relação muito interessante se acha entre as vitaminas e a manutenção do equilíbrio do potencial de oxido-redução nos seres vivos.

A identificação do ácido ascórbico com a vitamina C e a da citoflavina com a vitamina B₂ e ainda as capacidades fortemente redutoras dessas duas substâncias, fez nascer logo a idéia de que um papel muito importante deveria ser por elas representado na regulação destes fenômenos biológicos.

Um grande número de trabalhos tem sido realizado nestes últimos tempos, sobretudo por Guzmán Barron e seus associados, nos Estados Unidos. A literatura do assunto tem apresentado resultados pouco concordantes, e às vezes mesmo, contraditórios, de modo que não podemos conhecer no momento atual, a natureza e o mecanismo íntimo desta ação reguladora. Um futuro bem próximo, entretanto, muito ha de dizer.

De todas as pesquisas realizadas, tem-se verificado sempre uma grande constância do potencial de oxidação, apesar das inúmeras variações que se realizam nos seres vivos em pleno estado de funcionamento.

De certo que ha de haver para estes casos, um mecanismo regulador, assim como existe um já bem conhecido relativamente, que mantem o equilíbrio ácido-básico.

Em um sistema simples, constituído por um corante e um redutor, podemos verificar, conforme curvas que apresentamos no fim deste trabalho, uma modificação relativamente pequena, apesar das grandes variações da substância redutora adicionada.

Estas curvas têm sempre o mesmo aspeto e a sua posição, isto é, o valor do potencial depende do pH em que a reação é realizada.

A regulação deste equilíbrio está então na dependência dos ions H^+ . Nos tecidos também existem substâncias capazes de regular a pressão de hidrogênio, mantendo constante o potencial de oxido-redução.

Estas substâncias são chamadas substâncias tampões de oxido-redução e entre elas figuram até agora como capazes de realizar esse fenómeno, as seguintes:

- a) Ácido ascórbico;
- b) Citocromo;
- c) Citoflavina;

e provavelmente quasi todos os corpos eletroativos dos quais já fizemos referência atrás.

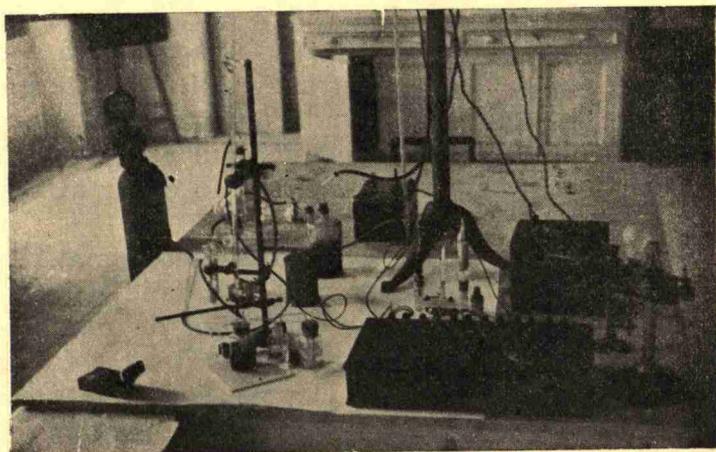
II PARTE

Vamos agora passar ao estudo do modo pelo qual se p \acute{o} de realizar a medida eletrom \acute{e} trica de um sistema de oxido-redu \acute{c} o.

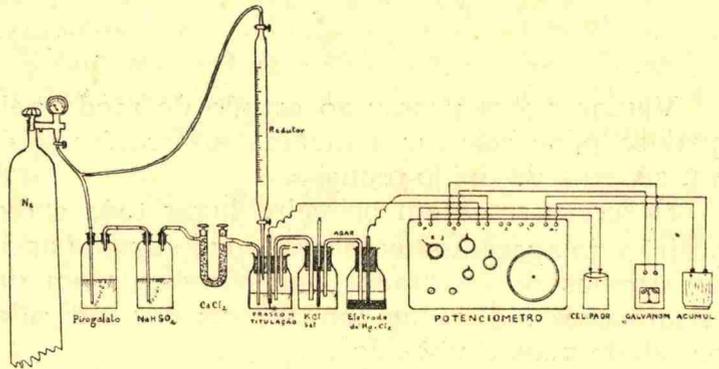
Descreveremos em primeiro lugar toda a disposi \tilde{c} o do aparelho necess \acute{a} rio e em seguida apresentaremos os resultados que obtivemos em determina \tilde{c} es realizadas com alguns dos indicadores vitais mais conhecidos.

Uma vista de conjunto \acute{e} dada pelo esquema das figuras apresentadas no fim deste trabalho.

A determina \tilde{c} o do potencial normal de um sistema, isto \acute{e} , o potencial quando suas formas oxidada e reduzida se acham na mesma concentra \tilde{c} o, tem de ser realizada em um meio isento de oxig \acute{e} nio e obedece aos princ \acute{i} pios gerais da potencio-metria. \acute{E} o que se realiza nesse dispositivo.



Vejamos parceladamente cada uma das partes constituintes deste conjunto.



Aparelho

1.º) Atmosfera de azoto.

Para se realizar a determinação de um potencial desta natureza, o melhor processo é fazer-se afastar a influência do oxigênio, criando-se uma atmosfera de azoto.

No frasco de titulação que contém a substância a estudar, faz-se passar, 1/2 hora antes e durante toda a operação de determinação, uma corrente de azoto. Como mostra o esquema, este gás borbulha no líquido. É levado por um tubo de vidro até o fundo deste e sai por um escapamento superior arrastando todo o oxigênio do ar atmosférico.

A pureza do azoto é condição essencial. De princípio não o obtivemos com facilidade; o nosso azoto tinha uma certa porcentagem de oxigênio que os processos de purificação utilizados foram insuficientes para retirar. Depois, com a General Electric obtivemos um gás em grande grau de pu-

reza, que é justamente o material utilizado na fabricação de lâmpadas elétricas.

Este gás ao sair de seu reservatório é feito passar por uma solução de pirogalato de potássio, a seguir por uma outra de sulfito alcalino e por último sêco em um tubo com cloreto de cálcio anhidro.

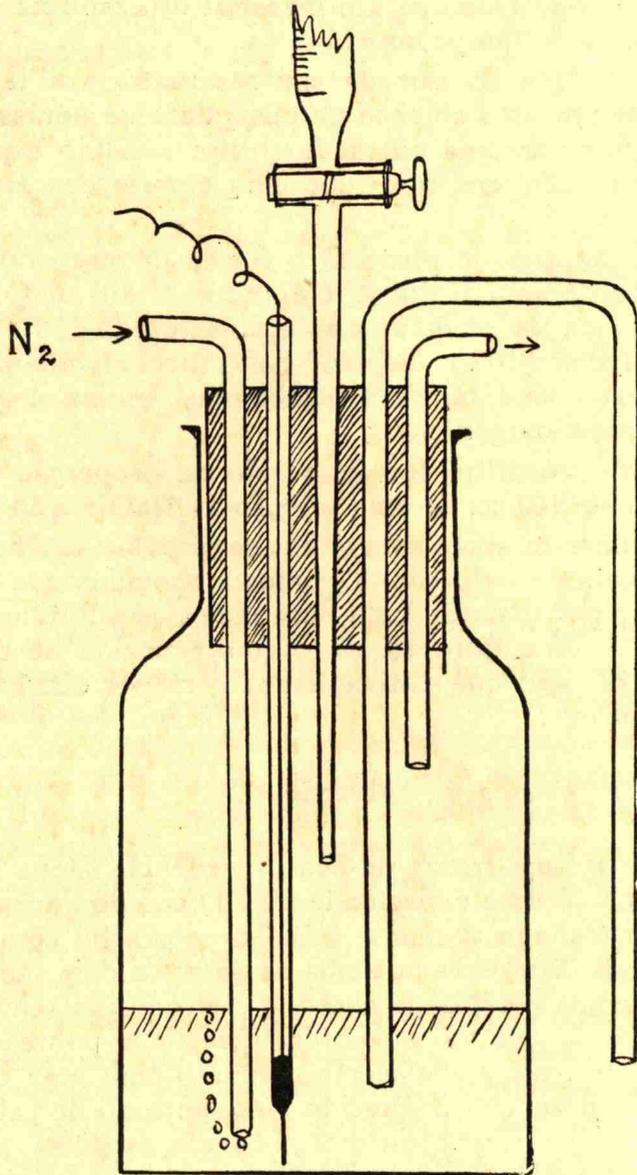
A solução de pirogalato foi assim preparada, de acordo com Haldane (Methods of air analysis 1925): em 100 cc. de uma solução saturada de KOH dissolvemos 10 gr. de ácido pirogálico, arrolhamos e guardamos, pois as soluções mais velhas absorvem mais oxigênio.

O hidrosulfito foi dissolvido na proporção de 20 gr. em 100 cc. de uma solução de NaOH a 50 %.

Com este azoto estávamos seguros da ausência completa do oxigênio. Tivemos a oportunidade de deixar por mais de uma hora este gás borbulhando em uma solução de forma reduzida de um corante, sem que obtivéssemos o menor sinal de coloração.

2.º) *Frasco de titulação.*

Este é um frasco de boa procedência (Jena ou Pyrex) de uma capacidade de 200 cc., de gargalo largo, fechado por uma rolha de borracha com 5 orifícios. Por estes orifícios passam: os dois tubos de entrada e saída do azoto, o eletrodo inatacável de platina que vai ao potenciômetro, a ponte de agar que vai estabelecer o contacto com uma célula de potencial conhecido — o eletrodo de calomelanos — e, por último, a bureta especial que contém a solução da substância redutora.



3.º) *Eletrodo de calomelanos.*

Este tem um potencial determinado para cada temperatura e deverá ser relacionado com o potencial do sistema estudado.

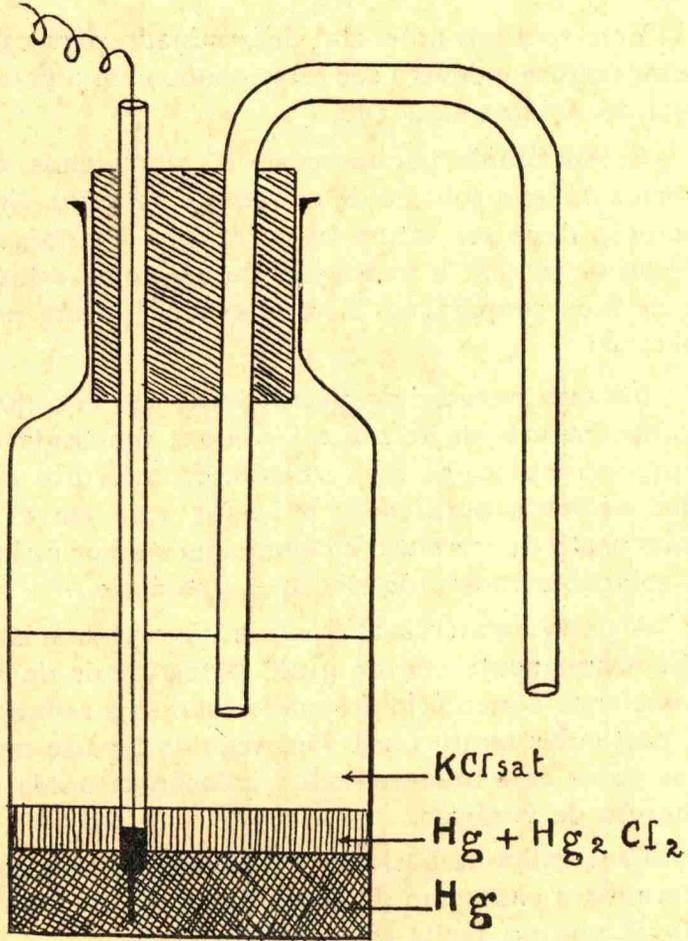
É constituído por mercúrio e calomelanos, cobertos de uma solução de cloreto de potássio. Esta solução deve ser saturada, normal ou 0,1 normal. A primeira tem a vantagem de ser mais estável e de fácil preparação. Este eletrodo é assim preparado:

Em um frasco de capacidade de 150 cc., aproximadamente, de forma tal como a mostrada no esquema, coloca-se uma camada de mercúrio cuidadosamente purificado; a seguir uma outra de uma pasta de mercúrio e calomelanos e por último a solução saturada de cloreto de potássio.

A pasta de mercúrio é obtida fazendo-se misturar intimamente em um gral, partes iguais de calomelanos e mercúrio até que o todo seja reduzido a partículas muito finas. Em seguida lava-se muitas vezes essa mistura com a solução saturada de cloreto de potássio.

Uma rolha de borracha com dois orifícios para permitir a passagem da ponte de agar e do eletrodo de platina, fecha esse vaso.

O potencial deste eletrodo de referência varia com a temperatura e o seu coeficiente de temperatura absoluta é $-0,00020$.



A seguir apresentamos uma tabela que nos dá o valor deste potencial em diversas temperaturas:

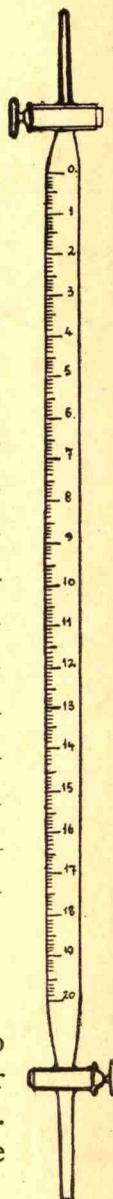
ELETRODO DE CALOMELANOS

Valores dos potenciais em diversas temperaturas, para solução saturada.

<i>Temperatura</i>	<i>Volts</i>
15°	0,2525
16°	0,2515
17°	0,2509
18°	0,2503
19°	0,2495
20°	0,2488
21°	0,2482
22°	0,2475
23°	0,2468
24°	0,2463
25°	0,2458
30°	0,2420
35°	0,2380
37°	0,2355
38°	0,2350

4.º) *Bureta especial.*

É uma bureta comum de 25 cc. quadrada ao 0,1 cc. e tendo a extremidade superior fechada por uma torneira terminando com uma ponta capilar. Através desta torneira faz-se o vácuo na bureta e depois enche-se com a solução do redutor.



5.º) *Ponte de agar.*

São preparadas da seguinte maneira. Tubos de vidro de 4 mm. de espessura são curvados duas vezes em ângulo reto, constituindo verdadeiros si-fões, e cheios de uma geléia de agar saturada de cloreto de potássio.

Para se preparar esta geléia, aquecem-se 30 gr. de cloreto de potássio e 3 gr. de agar em 100 cc. de água destilada até que tudo se dissolva e o líquido fique límpido. Ainda quente, enche-se os tubos de vidro com ela, tendo-se o cuidado de evitar bolhas de ar. Ao se resfriar a geléia se solidifica.

As pontes assim preparadas são guardadas com as suas duas extremidades imersas em uma solução de cloreto de potássio. Se ficaram expostas ao ar, a geléia pôde secar-se e permitir a penetração de bolhas de ar que irão aumentar a resistência da ponte.

6.º) *Eletrodos de platina.*

São facilmente preparados fazendo-se prender ao maçarico um pequeno fio de platina à extremidade de um tubo de vidro com a mesma espessura daqueles que foram utilizados para a preparação das pontes de agar. A solda é feita de tal modo que fique, para o exterior, um segmento de 1 a 1,5 cm. e para a luz do tubo, apenas 0,5 cm. do fio de platina. A extremidade interior é coberta de mercúrio metálico no qual vai ser imersa a extremidade do fio que deverá pôr em ligação este eletrodo com o potenciômetro.

7.º) *Potenciômetro.*

O aparelho que usamos é do tipo fornecido por Baird Talbock (Londres). Tem a vantagem de permitir a determinação até de 0,0002 de volt.

Este aparelho possui ainda três pares de bornes onde se podem ligar três sistemas diferentes, o que permite três determinações sem ser necessário desligarem-se uns fios para se ligarem outros.

8.º) *Célula padrão.*

A força eletromotora de oposição deve ser muito contínua. Em geral é fornecida por um acumulador comum, o de automovel, por exemplo. Esta fonte deve produzir 2 volts pelo mínimo. A sua medida exata é feita por comparação com uma célula padrão. Ela passa por uma resistência do potenciômetro e é reduzida exatamente a uma voltagem correspondente a 1,0186 volts, oposta pela célula padrão tipo Weston.

Esta célula padrão de que nos utilizámos foi gentilmente emprestada pela Escola Nacional de Engenharia e recentemente controlada.

9.º) *Galvanômetro.*

Vários tipos podem ser usados. Nós experimentámos o capilar de mercúrio, mas é pouco prático. Em todas as determinações utilizámos o galvanômetro de corda, fabricado por Max Kohl, que satisfaz pela sua sensibilidade.

TÉCNICA DA DETERMINAÇÃO

Para se determinar o potencial normal de um indicador, ou seja, o seu potencial quando a relação entre as suas formas oxidada e reduzida é igual à unidade, segue-se sempre o seguinte processo:

1.º) Colocar no frasco de titulação uma determinada quantidade da solução da substância. Esta solução póde ser M/500 ou M/750, sendo o corante dissolvido em uma solução tampão do pH que se quer estudar. Deve ser feita a lavagem, muito cuidadosa de todo o vasilhame empregado (sabão, mistura sulfo-crômica, água destilada, etc.).

2.º) Borbulhamento de azoto isento de oxigênio através o corante, pelo menos durante 30 minutos.

3.º) Borbulhamento de azoto na solução tampão na qual se vai dissolver o hidrosulfito de sódio.

4.º) Pesagem do hidrosulfito de sódio. Faz-se geralmente uma solução M/750 (0,117 gr. em 1000 cc. da solução tampão) que se coloca na bureta especial.

5.º) Medir o potencial do indicador, várias

vezes até se obter valores constantes, e depois deixar cair, fracionadamente, o redutor da bureta. Anotar os resultados e estabelecer a curva.

Esta curva que tem sempre o mesmo aspeto, vai mostrar os diversos valores do potencial do corante em relação à proporção entre suas formas oxidada e reduzida e ao pH do meio. O seu ponto de inflexão marca o potencial normal.

A maioria de nossas determinações foram realizadas em um pH igual a 7,00.

Uma solução tampão com este pH póde ser preparada, de acordo com os trabalhos de Clark, da seguinte maneira:

NaOH 0,1 N	29,63 cc.
KH_2PO_4 0,1 molar	50,00 cc.
Água destilada q. s. p.	100,00 cc.

Realizámos sempre as determinações eletrométricas e colorimétricas do pH destas misturas, das soluções do corante e do redutor e do final da titulação, encontrando sempre valores concordantes.

A dissolução do hidrosulfito faz elevar um pouco o pH; para evitar isto, deve-se dissolvê-lo em uma solução com pH um pouco inferior a 7 (6,90).

A determinação eletrométrica foi realizada simultaneamente no mesmo potenciômetro, usando

sempre o eletrodo de quinidrona, por trabalharmos com pH inferior a 8,00

Para o cálculo empregamos a seguinte fórmula, deduzida da equação de Nernst:

$$\text{pH} = \frac{0,4532 - 0,00009 (t-25^\circ) - \text{Leitura}}{0,0591 + 0,0002 (t-25^\circ)}$$

A seguir vamos mostrar os resultados das nossas determinações que são inteiramente concordantes com os resultados achados por todos os que têm trabalhado neste sentido.

Primeiro mostramos um corante com alto potencial normal, três outros de potencial médio e um de potencial baixo. Estes corantes são todos de emprego relativamente frequente nas colorações vitais.

2:6 dicloro-fenol-indo-fenol

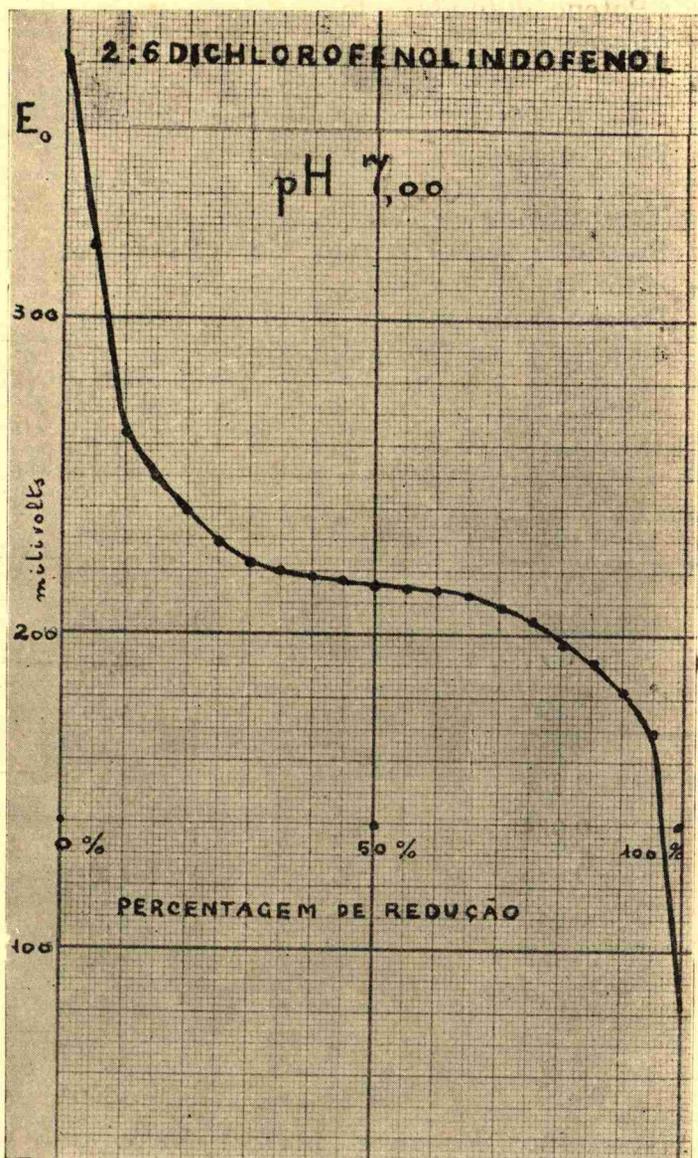
Solução M/750 — 5 cc.
Redutor: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

pH { inicial — 7,00
 final — 7,04

Temperatura — 30°

Potencial do eletrodo de calomelanos — 0,2420.
 Potencial normal — + 0 217 (Wurmser).

E h	Cc do redutor M/500	E o (volts)
+0,140	0	+0,382
+0,081		0,323
+0,022		0,264
+0,008		0,250
—0,003	1	0,239
—0,014		0,228
—0,020		0,222
—0,022		0,220
—0,024	2	0,218
—0,025		0,217
—0,026		0,216
—0,027		0,215
—0,028		0,214
—0,030	3	0,212
—0,034		0,208
—0,038		0,204
—0,045		0,197
—0,050	4	0,192
—0,060		0,182
—0,072		0,170
—0,160		0,080



Azul de toluidina:

Solução M/750 — 10 cc.

Redutor — $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ M/500

inicial — 7,00

pH

final — 7,00

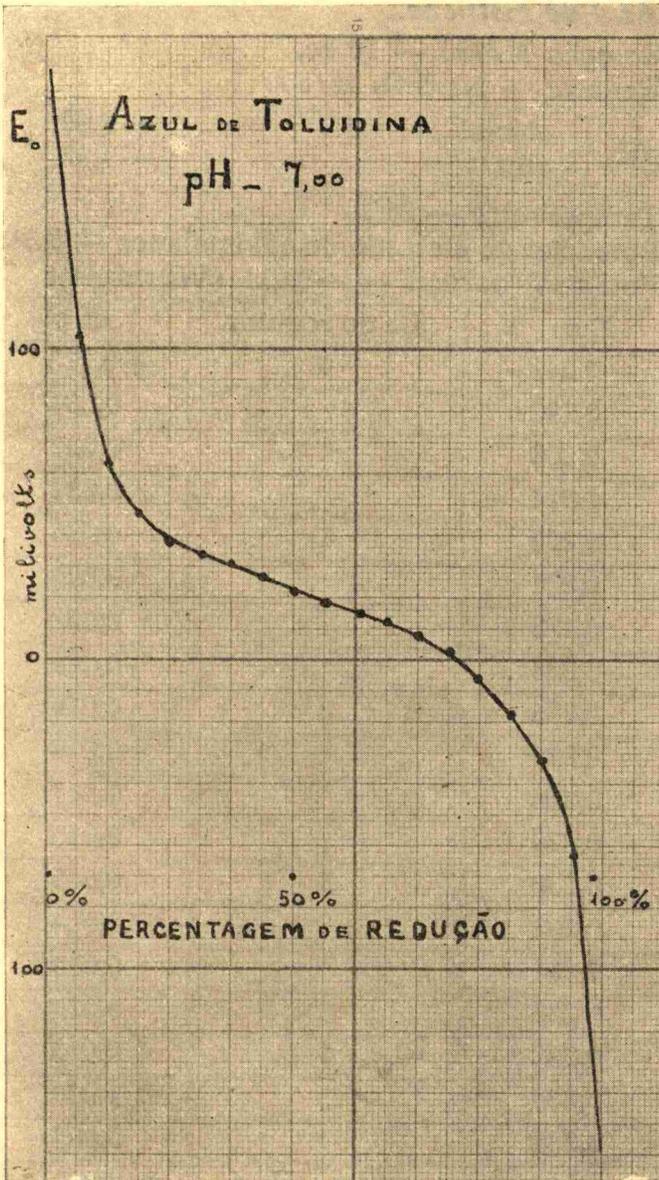
Temperatura — 25°.

Potencial do eletrodo de calomelanos —
— 0,2458.

Potencial normal — —0,011 (Wurmser).

E h	Cc do redutor	E o
—0,029	0	+0,216
0,141		0,104
0,182		0,063
0,191		0,047
0,207	1	0,038
0,212		0,033
0,214		0,031
0,219		0,026
0,223	2	0,022
0,226		0,019
0,230		0,015
0,233		0,012
0,238	3	0,007
0,244		0,001
0,253		—0,008
0,279	4	—0,019
0,310		—0,064

Resultado: Potencial normal encontrado —
—0,012.



Azul de metileno.

Solução M/750 — 10 cc.

Redutor — $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ M/500

pH: { inicial — 7,00
 final — 7,07

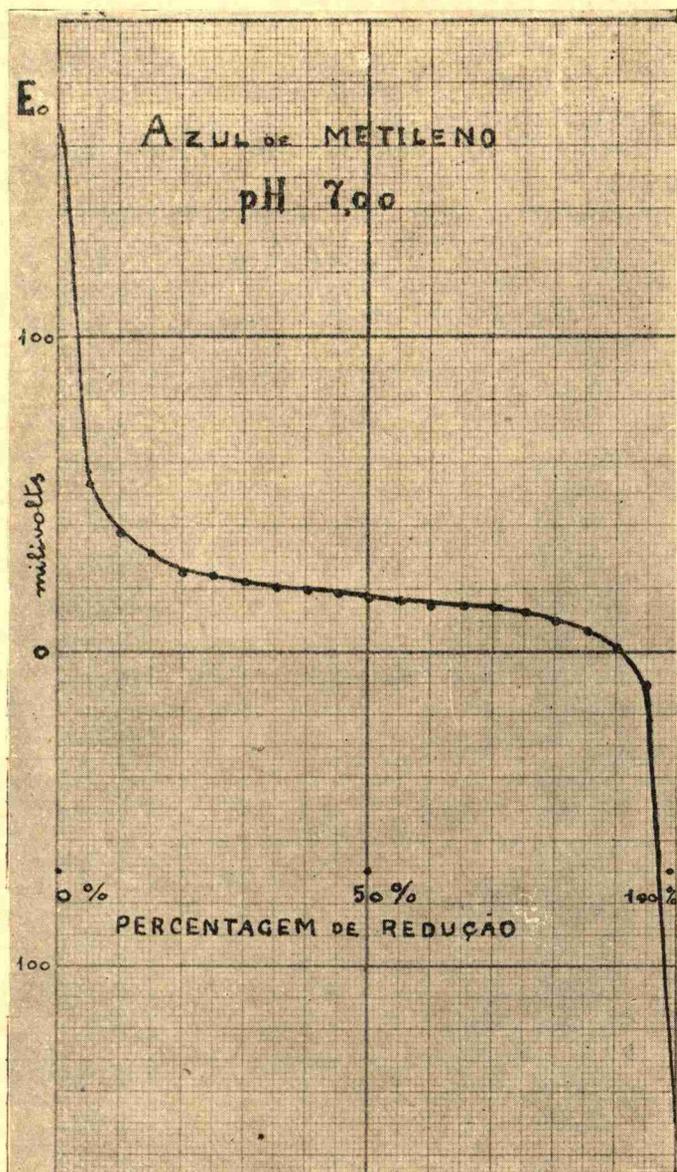
Temperatura — 26°.

Potencial do eletrodo de calomelanos — 0,2455.

Potencial normal — -0,011 (Wurmser).

E h	Cc do redutor	E o
-0,042	0	+0,213
0,192		0,054
0,208		0,037
0,214		0,031
0,220	1	0,025
0,221		0,024
0,223		0,022
0,225		0,020
0,226	2	0,019
0,227		0,018
0,228		0,017
0,229		0,016
0,230	3	0,015
0,231		0,014
0,231		0,014
0,232		0,013
0,233	4	0,012
0,235		0,010
0,238		0,007
0,244		0,001
0,255	5	-0,010
0,270		-0,245

Resultado: Potencial normal encontrado: —
—0,014.



Tetrasulfonato de indigo.

Solução — M/750 — 10 cc.

Redutor — $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ M/500

pH } inicial — 7,00
 } final — 7,03

Temperatura — 30°.

Potencial do eletrodo de calomelanos —
 —0,2420.

Potencial normal — —0,046 (Wurmser).

E h	Cc do redutor	E o
—0,133	0	+0,109
0,207		0,035
0,229		0,013
0,237		0,005
0,248	1	—0,006
0,253		—0,011
0,258		—0,016
0,262		—0,020
0,265	2	—0,023
0,269		—0,027
0,272		—0,030
0,275		—0,033
0,278	3	—0,036
0,280		—0,038
0,282		—0,040
0,286		—0,044
0,289	4	—0,047
0,293		—0,051
0,297		—0,055
0,304		—0,062
0,311	5	—0,069
0,452		—0,204

Resultado: Potencial normal encontrado: —
—0,044.

Vermelho neutro.

Solução M/750 — 10 cc.

Redutor — $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ M/500

pH	{	inicial	— 7,00
		final	— 7,04

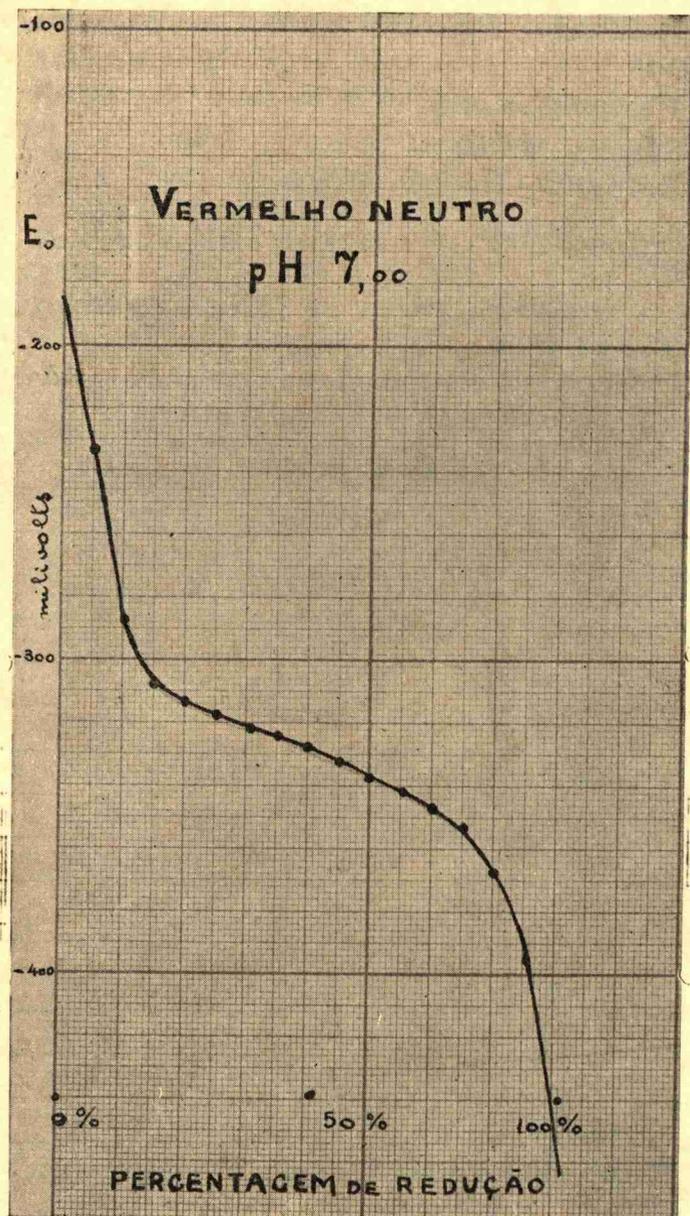
Temperatura — 27°.

Potencial do eletrodo de calomelanos — 0,2450.

Potencial normal — 0,330 (Wurmser).

E h	Cc do redutor	E o
—0,012	0	—0,232
+0,532		—0,287
0,554		—0,309
0,558		—0,313
0,562	1	—0,317
0,566		—0,321
0,569		—0,324
0,573		—0,328
0,577	2	—0,332
0,584		—0,339
0,587		—0,342
0,592		—0,347
0,596	3	—0,351
0,612		—0,367
0,640		—0,395

Resultado: Potencial normal encontrado: —
—0,330.



Para verificar agora a influência do pH sobre o potencial de oxido-redução, repetimos a determinação do potencial do tetrasulfonato de indigo, em meios de concentração de hidrogênio mais forte: pH — 6,00 e pH — 5,00.

Tetrasulfonato de indigo.

Solução — M/750 — 10 cc.
Redutor — $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ M/500

pH	{	final	— 6,0
		inicial	— 6,0

Temperatura — 27°.

Potencial do eletrodo de calomelanos — 0,2450.

E h	Cc do redutor	E o
—0,040	0	+0,205
0,130		0,115
0,153		0,092
0,178		0,067
0,194	1	0,051
0,211		0,034
0,218		0,027
0,224		0,021
0,228	2	0,017
0,233		0,012
0,236		0,009

0,238		0,007
0,240	3	0,005
0,243		0,002
0,245		0,000
0,246		—0,001
0,248	4	—0,003
0,250		—0,005
0,253		—0,008
0,260		—0,015
0,265	5	—0,020
0,288		—0,033
0,295		—0,050
0,270		0,028
0,320	5	0,078

Resultado: Potencial normal encontrado —
—0,045.

E h	Cc de redutor	E o
0,380		—0,135

Resultado: Potencial normal encontrado: —
—0,006.

Tetrasulfonato de indigo.

Solução — M/750 10 cc.

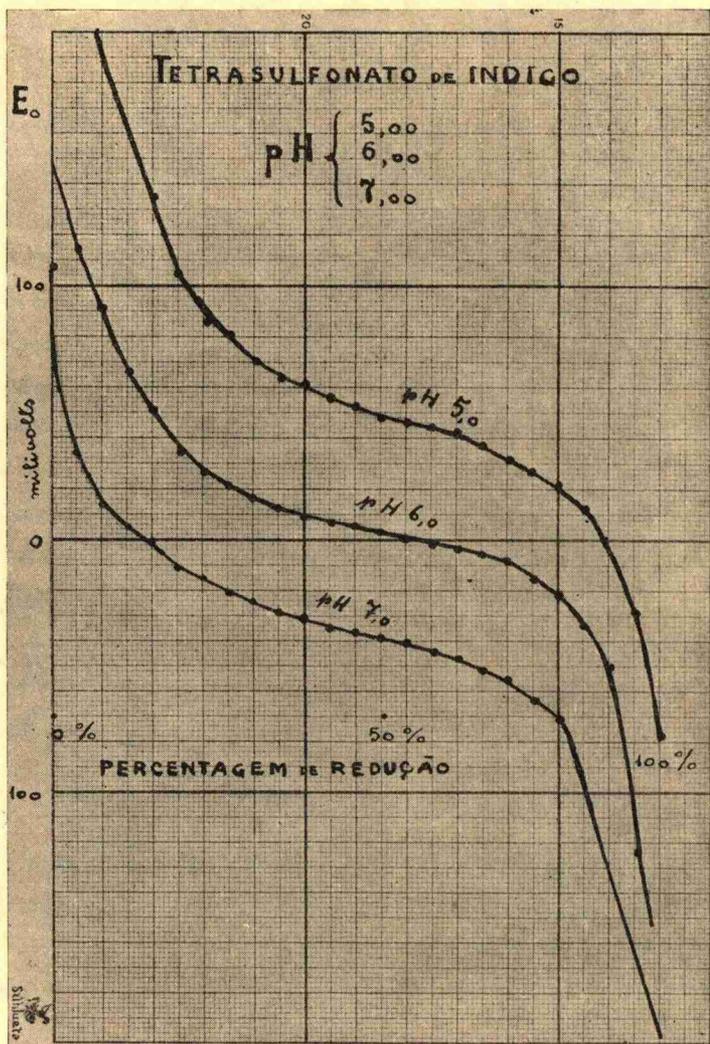
Redutor — $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ M/500

pH	}	inicial	— 5,00
		final	— 5,00

Temperatura — 29°.

Potencial do eletrodo de calomelanos —
—0,2420.

E h	CC de redutor	E o
—0,105	0	+0,137
0,138		0,104
0,157		0,085
0,160		0,082
0,172	1	0,070
0,178		0,064
0,180		0,062
0,186		0,056
0,189	2	0,053
0,193		0,049
0,195		0,047
0,197		0,045
0,199	3	0,043
0,205		0,037
0,210		0,032
0,215		0,027
0,220	4	0,022
0,226		0,016
0,235		0,007



CONCLUSÕES

I

O estudo dos fenômenos de oxidação e redução tem grande importância em biologia porque permite um conhecimento mais aprofundado das várias manifestações da energia que apresentam os seres vivos.

II

As diversas substâncias celulares capazes de tomar parte nesses fenômenos de reversibilidade, se mantêm em um estado de equilíbrio constante que pôde ser definido por um potencial elétrico

cujo valor nos dá a relação $\frac{\text{Red}}{\text{Oxi}}$.

III

A técnica para a determinação do potencial de oxido-redução é minuciosamente descrita.

IV

Os resultados encontrados para os valores dos potenciais normais de alguns corantes vitais concordam com os que têm sido determinados por outros pesquisadores.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AUBEL — Etude du potentiel d'oxido-reduction dans les organismes vivants.
Ann. de Physiol. et Physico-Chemie Fisiologique 8:477 — 1933.
- 2) BLANC-LEMOINE — Traité de Physique Exp. et Gen.
Lyon Eirolles — 1938.
- 3) BORSOOK-SCHOTT — J. Biol. Chemistry 92: 533 — 1931.
- 4) CLARK et AL — Public Health Reports.
Washington — 1923.
- 5) CLARK M. — The determination of Hydrogen ions.
W. and Wilkins — 1928.
- 6) CATOIRE M. — La micelle biochimique.
Rev. Général des Sciences 5:121 — 1938.
- 7) DOGNON — Physico-chimie biologique.
Masson & Cia. — 1931.
- 8) DERIBERE — Les applications industrielles du rH.
Paris — 1937.
- 9) ERIC BALL — Studies on oxidation-reduction.
J. Biol. Chemistry 102:691 — 1933.
- 10) ERIC BALL — Studies on oxidation-reduction — ascorbic acid.
J. Biol. Chemistry 103:218 — 1933.
- 11) FAJANS — Practical physical chemistry.
Methuen — 1930.
- 12) FINDLAY — Physical Chemistry.
Longmans — 1931.
- 13) GLOSH-RAMA — Das Oxidations-reduktions Potential des Ascorbinsäure (Vit. C).
Zeit. für Phys. Chemie 246:115 — 1937.
- 14) GLASSTONE — Electrochemie des solutions.
Paris — 1936.
- 15) HARROW-SHERWIN — Text-book of biochemistry.
Saunders — 1935.
- 16) HITCHCOCK — Physical Chemistry.
Ch. Thomas — 1934.
- 17) HOPKINS — J. Biol. Chemistry 84:269 — 1929.
- 18) KOLTHOFF — pH and electrotitrations.
J. Wiley and Sons — 1931.
- 19) KEILIN — Erg. Enzymforsch.
II — 239 — 1933.

- 20) MICHAELIS — Oxydations-reduktions-potential — Berlin, 1933.
- 21) MONALDI — Determinazione e misura dei processi di ossido-reduzione intracelulare.
Il Policlinico 36:172 — 1929.
- 22) NEEDHAN — Concentration en ions H et potentiel d'oxido-reduction des cellules.
Proc. Roy. Soc. Bact. 98:259 — 1925.
- 23) PONSINET — Principes de l'electrochimie — Paris — 1934.
- 24) SZENT GYORGYI — Biochem. Zeits. 152:309 — 1925.
- 25) SPEAKMAN — The theory of the valency — Londres 1935.
- 26) WARBURG-CHRISTIAN — Biochem. Zeits. 254:438 — 1932.
- 27) WARBURG — Herter lecture.
J. Hopkins Hospital Bull. 47:341 — 1930.
- 28) WOLFF — L'importance des processus d'oxido-reduction en biologie et la notion du rH.
Presse medicale 77:1225 — 1928.
- 29) WURMSER — Le potentiel de oxido-reductions des cellules.
Masson & Cie. Paris — 1930.
- 30) WURMSER — Oxidations et reductions.
Paris — 1930.
- 31) WURMSER-FILITTI — Sur l'equilibre d'oxido-reduction des oxipurines.
C. R. Soc. Biol. 118:1027 — 1935.
- 32) WURMSER — L'electroactivité dans la Chimie des cellules.
Paris — 1935.
- 33) WURMSER et AL. — Le potentiel d'oxido-reduction de la reductone. — J. de Chimie Physique — 33:101 — 1936.
- 34) BESSEY e KING — The distribution of Vit. C in plant and in animal tissues. — J. Biol. Chemistry 103:687 — 1933.
- 35) FRUTON — Oxydation-reduction potentials of ascorbic acid. — J. Biol. Chemistry 105:79 — 1934.
- 36) KING C. G. — Vitamin C ascorbic acid. — Physiol. Reviews 16:238 — 1936.
- 37) BEZZSSNOFF — L'activité reductrice de la Vitamine C et d'autres reducteurs biologique exprimée en fonction de leur concentration — Bull. Soc. Ch. Biolog. 16:1133 — 1934.
- 38) VON EULER e outros — Die Katalasen und die Enzyme der Oxydation und Reduktion. — München — 1934.
- 39) HALDANE, J. S. e GRAHAM, J. I. — Methods of air analysis. — Londres — 1935.
- 40) MOLLIARD, M. — C. R. Soc. Biolog. 87:219 — 1922.

ÍNDICE

1.^a PARTE

1) Explicação	5
2) Introdução — Fenômenos de óxido-redução	7
3) Fenômenos bio-energéticos	17
4) Corpos eletroativos	25
5) Teoria das pilhas	31
6) Potencial de óxido-redução	37
7) Processos de determinação	41
8) Importancia biológica	45

2.^a PARTE

1) Aparelho de determinação	49
2) Técnica de determinação	59
3) Resultados	61
4) Conclusões	75
5) Bibliografia	77