

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Tereza Cristina Rodrigues e aprovada pela comissão julgadora.

Oswaldo E. S. Godinho

TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE GRUPOS AMINO
EM AMINOÁCIDOS E DE RESÍDUOS DE LISINA
EM PROTEÍNAS

TESE DE MESTRADO

Tereza Cristina Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo E. S. Godinho /

CAMPINAS

1993



Curriculum Vitae

Nome: Tereza Cristina Rodrigues

Formação Acadêmica

1. Graduação:

Curso: Habilitação em Química

Entidade: Universidade Federal de Uberlândia

Período: 1985-1989

2. Mestrado:

Curso: Química - Área de concentração: Química Analítica

Entidade: Universidade Estadual de Campinas

Período: 1990-1993

Título da Tese: Titulação Potenciométrica de grupos amino em aminoácidos e de resíduos de lisina em proteínas.

Participação em Encontros Científicos nos últimos 3 anos:

1. Evento: VI Encontro Nacional de Química Analítica

Atividade: Apresentação Oral em sessão coordenada

Data: setembro de 1991

Local: Araraquara - SP

Título do Trabalho: Titulações de aminoácidos e proteínas nos meios água-formaldeído e DMSO-água-formaldeído.

2. Evento: 15^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Atividade: Apresentação em Painel

Data: maio de 1992

Local: Caxambú - MG

Título do Trabalho: Determinação potenciométrica de grupos amino em aminoácidos e de resíduos de Lisina em Proteínas, em meio água-formaldeído. Influência de DMSO nestas titulações.

Ao Leonardo e aos meus pais.

Ao Criador:

Senhor, meu Deus, vós sois imensamente grande!
De majestade e esplendor vos revestis,
Envolto de luz como de um manto,
Vós estendestes o céu qual pavilhão,
Acima das águas fixastes vossa morada.
Ó Senhor, quão variadas são as vossas obras!
Feitas, todas, com sabedoria.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Godinho, orientador e amigo, pelas lições de sabedoria e dedicação, meu reconhecimento e gratidão.
- Aos Profs. Aleixo, Graciliano e Ivo, pelas sugestões.
- Aos amigos do laboratório: Andrei, Benjamin, Graziela, Helena, Keila, Maria de Fátima, Maria José, João, Júlio, Sandra e Zilda.
- À Helena, Zezé e Zilda, pelas valiosas discussões.
- Às amigas Fabíola e Regina, pela agradável convivência, e ao Sílvio pela sincera amizade.
- À Telma Lúcia, pela revisão do texto.
- Ao Laurindo, pelo capricho na reprodução e encadernação.
- Ao Instituto de Química pela oportunidade concedida.
- Ao CNPq e FAEP, pelo auxílio financeiro.
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

RESUMO

Autora: Tereza Cristina Rodrigues.

Orientador: Oswaldo Espirito Santo Godinho.

Neste trabalho foram feitas as determinações de grupos amino em aminoácidos e de resíduos de lisina em proteínas, por titulação potenciométrica em meio $H_2O:H_2CO_2$. Observou-se que os grupos amino dos aminoácidos e os resíduos de lisina das proteínas correspondem aos volumes de titulante gasto entre a primeira e a segunda inflexão da curva de titulação. O método envolve o tratamento da solução do aminoácido ou da proteína com um ácido forte e um solução de formaldeído e posterior titulação com KOH em isopropanol.

Estudou-se uma série de aminoácidos tais como: glicina, lisina, histidina, arginina; e de proteínas tais como: soro albumina bovina, lactoglobulina, ovalbumina e lisozima. O método é simples e rápido, levando á uma boa exatidão.

O estudo do meio dimetilsulfóxido-água-formaldeído mostrou alterações significativas nas curvas de titulação dos aminoácidos lisina e histidina. Foi observado que, neste meio, os grupos ϵ -amino foram titulados na primeira inflexão da curva e os grupos imidazóis na segunda inflexão.

ABSTRACT

Author: Tereza Cristina Rodrigues.

Supervisor: Oswaldo Espirito Santo Godinho.

A method for the determination of amino groups in aminoacids and available lysine residues in protein samples has been studied by potentiometric titration in a mixture water-formaldehyde. It was observed that the amino groups of aminoacids and lysine residues in proteins correspond to the titrant volume expended between the first and second inflection of the titration curve. The method involves treatment of the aminoacids or protein solution with a strong acid and formaldehyde solution. The solution then titrated with KOH in isopropanol.

Aminoacids such as: glycine, lysine, histidine, arginine, and the proteins: bovine serum albumin, egg albumin, β -lactoglobulin and lisozyme have been studied. The method is simple, fast and accurate.

However, when a dimethylsulphoxide-water-formaldehyde mixture was used a significant alteration occurs in the titration curves. It was observed that in this media the ϵ -NH₂ groups were titrated during the first inflection of the curve and the imidazol groups during the second inflection for the aminoacids.

IV.5 - Titulação potenciométrica em meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$	46
IV.5.1 - Titulação da lisina	47
IV.5.2 - Titulação da histidina	50
IV.5.3 - Titulação do ácido aspártico	52
IV.5.4 - Titulação de polipeptídeos	53
IV.5.5 - Titulação de outros aminoácidos	53
IV.6 - Titulação de proteínas	55
V - CONCLUSÃO	58
VI - SUGESTÕES PARA CONTINUAR O TRABALHO	63
VII - BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
I.1 - Estrutura dos corantes-ligantes AO 12, OG e AB 10B	08
I.2 - Curva de titulação da arginina em H_2O e H_2CO	11
I.3 - Curva de titulação da glicina em água (A) e H_2CO (B)	12
I.4 - 1 ^a derivada da curva de titulação potenciométrica da arginina em excesso de ácido forte no meio $DMSO:H_2O$ (7.0;0.4 (v/v))	19
I.5 - 1 ^a derivada da curva de titulação potenciométrica da lisozima(A) e ovalbumina(B) em excesso de ácido forte no meio $DMSO:H_2O$ (7.0;0.4 (v/v))	20
III.1 - Esquema da aparelhagem utilizada na titulação potenciométrica	26
IV.1 - Curva de titulação potenciométrica da glicina em presença de ácido forte no meio $H_2O:H_2CO$	33

IV.2 - Curva de titulação potenciométrica da lisina em presença de ácido forte no meio $H_2O:H_2CO_2$	35
IV.3 - Curva de titulação potenciométrica da histidina em presença de ácido forte no meio $H_2O:H_2CO_2$	36
IV.4 - Curva de titulação potenciométrica da glicina e histidina em ausência de ácido forte no meio $H_2O:H_2CO_2$	37
IV.5 - Curva de titulação potenciométrica da arginina(a) e cisteína(b) em presença de ácido forte no meio $H_2O:H_2CO_2$	38
IV.6 - Curva de titulação potenciométrica da BSA(A) e β -lactoglobulina(b) em presença de ácido forte no meio $H_2O:H_2CO_2$	44
IV.7 - Curva de titulação potenciométrica da lisina(a) e lisina + alanina em presença de ácido forte no meio $DMSO:H_2O:H_2CO_2$	47
IV.8 - Curva de titulação potenciométrica da histidina em presença de ácido forte no meio $DMSO:H_2O:H_2CO_2$	51

IV.9 - Curva de titulação potenciométrica do ácido aspártico em presença de ácido forte no meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$	52
IV.10 - Curva de titulação potenciométrica da BSA(a) e β -lactoglobulina (b) em presença de ácido forte no meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$	56
V.1.a - Curva de titulação potenciométrica da glicina(A), lisina(B) e histidina(C) presença de ácido forte no meio $\text{H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$	58
V.1.b - Curva de titulação potenciométrica da glicina(A), lisina(B) e histidina(C) presença de ácido forte no meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$	58

LISTA DE TABELAS

v.i.1 - Aminoácidos e iminoácidos mais comumente encontrados nas proteínas	vi
I.1 - Necessidade diária em gramas de aminoácidos essenciais (para rapazes na idade colegial)	02
I.2 - Titulação potenciométrica dos grupos da arginina, lisozima e ovalbumina no meio $\text{DMSO:H}_2\text{O}$	21
IV.1 - Dados obtidos da calibração da seringa utilizada nos experimentos	29
IV.2 - Peso molecular dos aminoácidos Poli-L-lisina e Poli-D-lisina	41
IV.3 - Resultados da titulação de grupos amino presentes em aminoácidos no meio $\text{H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$	42
IV.4 - Peso molecular e n° de grupos das proteínas: lisozima, BSA, ovalbumina, e β -lactoglobulina	43

IV.5 - Resultados da titulação de resíduos de lisina presentes em proteínas no meio $H_2O:H_2CO$	45
IV.6 - Resultados da titulação de grupos amino presentes em aminoácidos no meio $DMSO:H_2O:H_2CO$	54
IV.7 - Resultados da titulação de resíduos de lisina presentes em proteínas no meio $DMSO:H_2O:H_2CO$	55
V.1 - Quadro comparativo das titulações potenciométricas para grupos protonados de alguns aminoácidos em proteínas	61

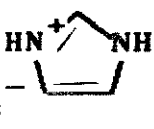
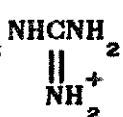
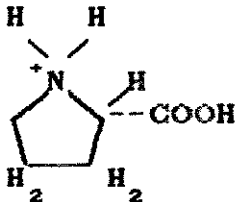
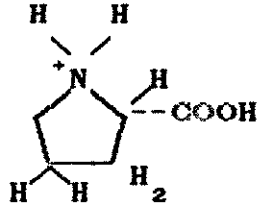
Tabela v.1 - Amino e iminoácidos mais comumente encontrados nas proteínas⁽¹⁾. (Classificação dos aminoácidos baseados na natureza da cadeia).

	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{R} \\ \\ \text{H} \end{array}$	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
1.glicina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$	2,34	9,6	-
2.alanina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \end{array}$	2,34	9,69	-
3.valina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,32	9,62	-
4.leucina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CH}_2\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,36	9,60	-
5.isoleucina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CHCH}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,36	9,68	-
6.serina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \end{array}$	2,21	9,15	-
7.treonina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	2,63	10,43	-
8.cisteina	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CH}_2\text{SH} \\ \end{array}$	1,71	10,78 pKa ₃	8,33 pKa ₂

tabela cont. na próxima página.

		pKa ₁	pKa ₂	
9. cistina	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-S-SCH_2-CH \\ \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad NH_3^+ \end{array} $	1.65 e 2.26	7.85 e 9.85	
10. metionina	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-CH_2-S-CH_3 \\ \end{array} $	2.28	9.21	-
11. fenilalanina	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \end{array} $	1.83	9.21	-
12. tirosina	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-OH \\ \end{array} $	2.20	9.21	-
13. triptofano	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N} \\ \end{array} $	2.38	9.39	
14. ácido aspártico	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-COOH \\ \end{array} $	2.09	9.82	3.8
15. glutamina	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-CH_2-\overset{O}{\parallel}C-NH_2 \\ \end{array} $	2.17	9.13	-
16. lisina	$ \begin{array}{c} \\ -C-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+ \\ \end{array} $	2.18	8.95	10.3

tabela cont. na próxima página.

		pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
17. histidina	$ \begin{array}{c} \\ -C- \\ \\ \end{array} \text{CH}_2 - \text{C}_5\text{H}_7\text{N}_2^+ $ 	1.82	9.17	6.0
18. arginina	$ \begin{array}{c} \\ -C- \\ \\ \end{array} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{NHCNH}_2^+ $ 	2.17	9.04	12.48
19. prolina		1.99	10.60	-
20. hidroxiprolina		1.92	9.73	-

INTRODUÇÃO

I-1) Importância da determinação de resíduos de lisina.

As proteínas, macromoléculas formadas por cadeias polipeptídicas compostas de arranjos de aminoácidos ligados covalentemente, estão envolvidas em maior número e variedade de eventos encontrados nos organismos vivos que qualquer outra classe de biomoléculas.

Extremamente versáteis em suas funções, cada uma delas tem uma sequência distinta de unidades em várias proporções de aproximadamente vinte aminoácidos, determinando a forma, propriedades e papel biológico da mesma. Seu valor e qualidade nutricional depende do conteúdo de aminoácidos essenciais e da digestibilidade de cada uma. Alguns fatores modificam a proporção da utilização de tais aminoácidos, como por exemplo, idade, sexo, atividade, saúde, estado emocional, e conseqüentemente influenciam na qualidade das proteínas.

Lehninger⁽²⁾ propôs que a quantidade de aminoácidos necessária para a nutrição do organismo humano, na fase adulta, varia à partir de 0,5 g/dia (triptofano) até cerca de 2 g/dia (leucina e fenilamina). A Tabela(I.1) proposta por

Lehninger⁽²⁾ é representada à seguir:

Tabela I.1 - Necessidade diária em gramas de aminoácidos essenciais (para rapazes na idade colegial).

aminoácido	gramas por dia
arginina	0*
histidinina	desconhecida**
isoleucina	1,30
leucina	2,02
lisina	1,50
metionina	2,02
fenilalanina	2,02
treonina	0,91
triptofano	0,46
valina	1,50

* requerida para bebês.

** essencial, mas a quantidade exata ainda não foi estabelecida.

O papel nutricional da lisina, um dos aminoácidos essenciais para a dieta humana, é bem conhecido e estudos revelam que a quantidade total de lisina em produtos

alimentícios pode ser determinada com precisão em análises de aminoácidos, mas em certas circunstâncias nem toda lisina presente está disponível para o consumo^(3,4). Portanto o conhecimento do conteúdo total de lisina nem sempre é uma estimativa do valor alimentício da proteína em relação à lisina⁽⁵⁾.

Seus resíduos existem em ambas as formas, livres e modificadas. Na forma livre, eles estão disponíveis para a clássica reação de aminas e na forma modificada, estão bloqueados por vários tipos de ligações covalentes. Tais modificações podem tornar a cadeia de proteína inacessível para a hidrólise, durante a digestão intestinal, e esta perde seu valor nutritivo pois os resíduos não estão biologicamente disponíveis.

Uma variedade de reagentes químicos podem modificar os resíduos de lisina em proteínas. Reações químicas entre os grupos ϵ -amino da lisina e certos carboidratos podem ocorrer com aquecimento⁽⁵⁾. Procedimentos químicos para modificações de resíduos de lisina são discutidos por Lundblad e Noyes⁽⁶⁾, Means e Feeney⁽⁷⁾. Métodos de modificações do conteúdo de lisina em proteínas e análises de derivados de lisina por procedimentos cromatográficos quantitativos são discutidos por Hennecke e Plapp⁽⁸⁾.

Embora muitos trabalhos tem sido dedicados ao estudos de resíduos de lisina, é importante salientar que nem sempre os aminoácidos determinados em procedimentos analíticos estão disponíveis para serem consumidos pelo organismo humano. Diferentes tipos de ligações químicas podem ocorrer durante o processo de digestão e efetivamente afetar a sua utilização.

I-2) Métodos efetivamente utilizados para determinação de resíduos de lisina.

Muitos métodos foram desenvolvidos para a determinação do conteúdo de resíduos de lisina em proteínas. Resumiremos aqui, alguns destes métodos.

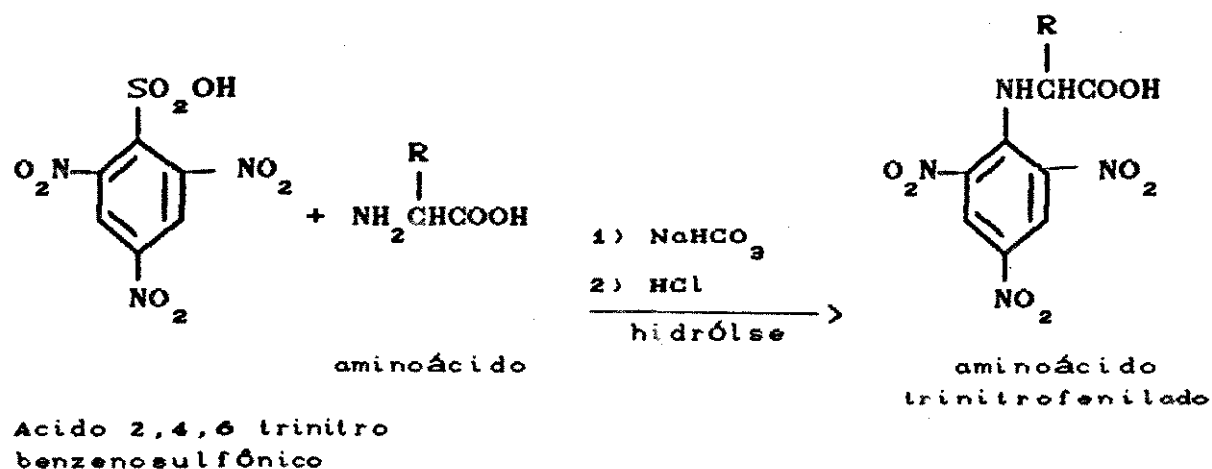
a) Métodos clássicos:

a.1) 1-fluoro-2,4-dinitro benzeno (FDNB).

Um método baseado na reação do aminoácido com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) para a determinação da quantidade de resíduos de lisina, foi desenvolvida primeiramente por Sanger⁽⁹⁾. Este autor mostrou que os produtos da reação de FDNB com aminoácidos individuais em solução de hidrogenocarbonato de sódio, quando aquecidos em

a.2) Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico

Utilizando o mesmo princípio de Carpenter⁽¹⁰⁾, Kakade e Liener⁽¹¹⁾ sugeriram outro reagente, o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), no lugar de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno. Posteriormente, Okuyama e Satake⁽¹²⁾ e Satake et al.⁽¹³⁾, desenvolveram um método para a determinação de amino grupos e peptídeos, utilizando o reagente proposto por Kakade e Liener.



Vários outros trabalhos empregam TNBS⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ como reagente, todavia, tanto a utilização do TNBS como do FDNB requerem emprego de hidrólise ácida e extração com solvente, seguida da determinação espectrofotométrica de DNP-lisina ou TNP-lisina. A hidrólise ácida consome muito tempo (1 a 48 horas), numerosas manipulações da amostra e correção de fatores, tornando impraticável sua aplicação em análises de rotina.

b) Reação com corantes

b.1) Orange G (OG); acid Orange 12 (AO 12); amido Black 10B (AB 10B).

Baseado no trabalho realizado por Fraenkel-Conrat e Cooper⁽¹⁷⁾, que mostraram que certos corantes orgânicos se ligam quantitativamente às proteínas, várias aplicações foram desenvolvidas para a avaliação da qualidade das proteínas em alimentos. O princípio do método consiste na formação quantitativa de complexos insolúveis pela reação da proteína com uma solução de corante e posterior separação do precipitado por filtração ou centrifugação. A realização de medidas colorimétricas, antes e depois da adição da proteína, permite calcular a capacidade do ligante, à partir da concentração de corantes não ligados, bem como a determinação da quantidade de proteína presente.

Vários outros métodos foram desenvolvidos para determinação de resíduos de lisina⁽¹⁸⁻²⁰⁾. A interação de orange G (OG), ácido orange 12 (AO 12) e Amido Black 10B foi estudada por Molnár-Perl e Pinter-Szakás⁽²¹⁾. Reagiram estes corantes com proteínas de farinha de soja e compararam os resultados obtidos para os diferentes corantes. Estes verificaram que a reação é estequiométrica e permite a

determinação quantitativa de conteúdo de lisina em proteínas.

A estrutura dos corantes-ligantes AO 12, OG, e AB 10B é representada na Figura(I.1).

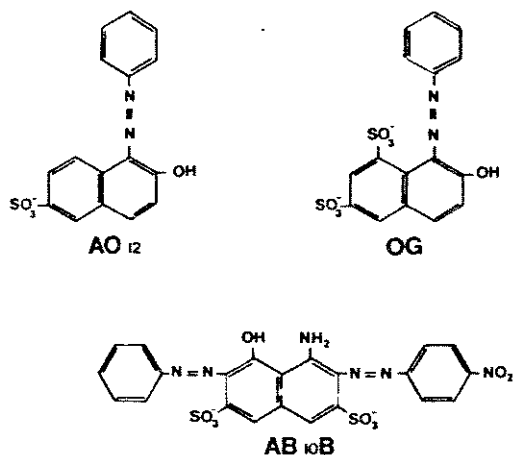


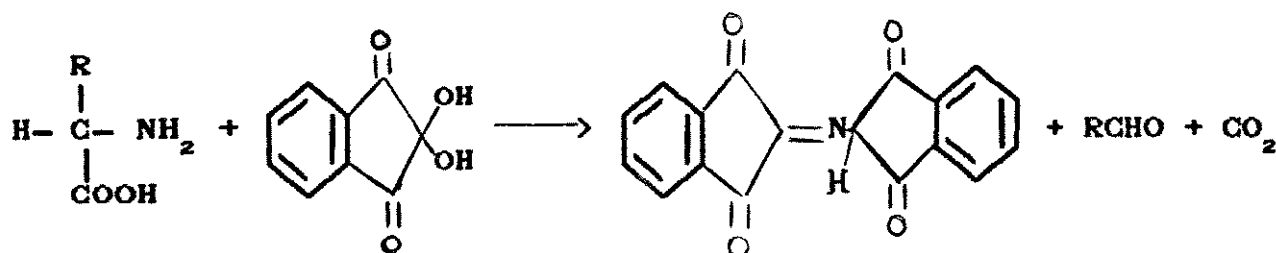
Figura I.1 - estrutura dos corantes AO 12, OG, e AB 10B.

b.2) Ninidrina

A aplicação da ninidrina como método para detecção e determinação de aminoácidos e peptídeos consiste na formação do mesmo produto de reação conhecido como púrpura de Ruheman. Este produto é frequentemente formado pela reação com outros compostos que contêm grupos amino livres⁽²²⁾.

A substância formada possui uma cor azul-violeta ($\lambda_{\max} = 540 \text{ nm}$). Uma exceção ocorre com a prolina que produz um derivado de cor amarelo ($\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$).

O aminoácido ou peptídeo reage com a ninidrina de acordo com a equação:

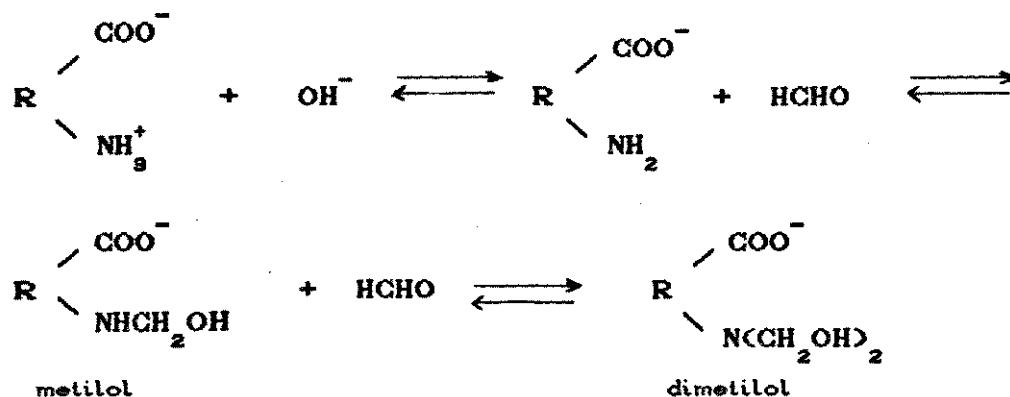


Vários autores⁽²³⁻²⁵⁾ estudaram os diferentes aspectos da reação. Friedman e Willians⁽²⁶⁾ estudaram a reação da ninidrina com proteína de queratina e observaram que esta ocorre lentamente sob temperatura ambiente e mais rapidamente sob aquecimento. Também estudaram a estabilidade da cor produzida pelo produto derivado da reação em DMSO. O método é usado para estimar grupos amino livres, necessitando correções, como por exemplo, a extrapolação da cor produzida à partir do tempo de reação à tempo zero.

c) Titulações Potenciométricas:

d.1) Titulação em presença de formaldeído

A reação do formaldeído com aminoácidos foi estudada há muitos anos atrás por Shiff⁽²⁷⁾. Posteriormente Sörensen⁽²⁸⁾ efetuou titulações de aminoácidos na presença de formaldeído em solução 50% etanol e fenolftaleína ou timolftaleína como indicadores. Henriques e Sörensen⁽²⁹⁾ realizaram titulações em formol, possibilitando a determinação total de aminoácidos presentes na urina. Vários outros estudos foram realizados por outros autores para elucidar a natureza da reação de aminoácidos e proteínas com formol. Fraenkel-Conrat e Olcott⁽³⁰⁾, verificaram que a reação ocorre sob temperatura elevada, em soluções ácidas ou alcalinas, para os grupos amida⁽³¹⁾, indol⁽³²⁾, guanidino⁽³³⁾ das proteínas, e instantaneamente para os grupos amino, mesmo em temperaturas baixas e soluções neutras, fornecendo derivados amino metilol.



A reação é rápida e reversível, embora reações de condensação irreversíveis possam ocorrer com aumento do tempo de contato⁽³⁴⁾. Os grupos derivados do grupo amino são bases bem mais fracas que os grupos amino originais, com valores de pka's menores, produzindo significativas mudanças em suas propriedades ácidas e conseqüentemente nas curvas de titulação.

Birch e Harris⁽³⁵⁾ foram os primeiros a empregar eletrodo de vidro para investigar a natureza destas mudanças. Durante a titulação da arginina em solução aquosa de formaldeído, observaram que apenas a região da curva de titulação envolvendo a adição de NaOH era alterada na presença de formaldeído, e a alteração aumentava marcadamente, com o acréscimo da concentração de formaldeído, deslocando a curva de titulação da posição normal, para uma região de valores de pH mais baixos. Figura(I.2).

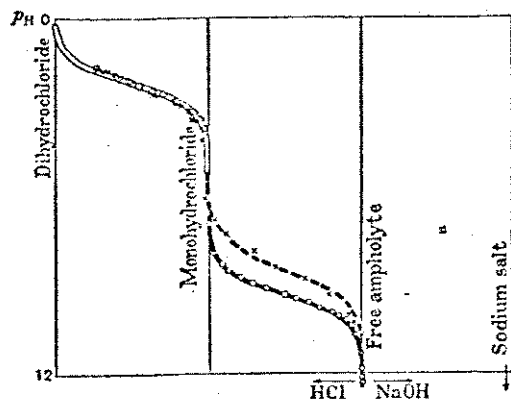


Figura I.2 - curva de titulação da arginina em água e HCOH.

o , em água.

x , em HCOH (0.25%).

A causa desta mudança na curva de titulação na presença de formaldeído pode ser representada à partir da relação:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \frac{[\text{RNH}_2]}{[\text{RNH}_3^+]}$$

O formaldeído se liga ao grupo amino, reduzindo sua concentração; portanto a razão $[\text{RNH}_2] / [\text{RNH}_3^+]$ é muito menor que na sua ausência. Isto pode ser verificado na titulação da glicina com alcali, onde o pH do ponto final é 12, na ausência de formaldeído, e aproximadamente 9 na presença deste⁽³⁶⁾, Figura(I.3).

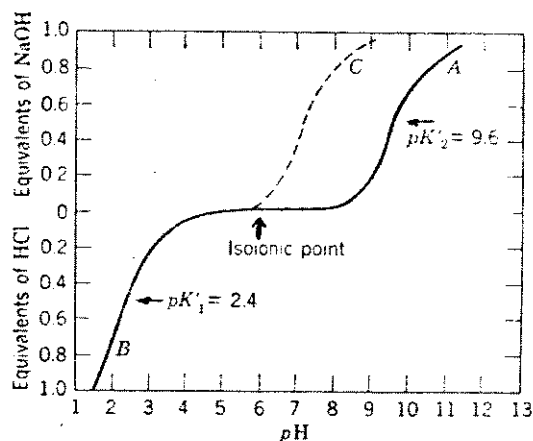


Figura I.3 - curvas de titulação da glicina. Curva A e B em solução aquosa; curva C em formaldeído 0.25%.

Este fato é explorado nas titulações conhecidas como " titulação formol " , utilizadas para determinação de grupos amino em aminoácidos e proteínas. Este método se baseia na titulação de aminoácidos ou proteínas com alcali até a viragem de fenolftaleína. A seguir, o formol é adicionado e a titulação com alcali é então prosseguida até a cor original do indicador ser restaurada.

Embora fenolftaleína seja amplamente utilizada como indicador, tanto no caso de aminoácidos, como no caso de proteínas, melhores resultados podem ser obtidos com titulações potenciométricas⁽³⁶⁾.

d.2) Titulações em meio não aquoso

Um dos primeiros trabalhos envolvidos na titulação de proteínas e aminoácidos em meio não aquoso, para determinação de resíduos de lisina, foi efetuado por Foreman⁽³⁷⁾, em 1920. Este autor efetuou titulações "formol" em meio álcool etílico. Popovici e Radulescu⁽³⁸⁾, em 1938, utilizaram o solvente dioxano para estas titulações.

Mais recentemente Molnár-Perl e Pinter - Szakács⁽³⁹⁾ determinaram a quantidade de grupos ϵ -amino da

lisina em proteínas. O método envolve titulação potenciométrica com ácido perclórico em ácido acético anidro ou ácido propiônico antes e depois da acilação dos grupos amino presentes na amostra. A diferença entre as duas basicidades fornece o conteúdo de resíduos de lisina presentes em proteínas.

Posteriormente Gunduz et al⁽⁴⁰⁾ realizaram titulações potenciométricas de α -aminoácidos, com titulante ácido perclórico em diferentes solventes: (a) ácido acético glacial e (b) acetonitrila 90% - ácido acético. Este autor chegou nas seguintes conclusões:

i) Todos os aminoácidos solúveis em ácido acético glacial, podem ser titulados potenciometricamente e condutometricamente neste meio, obtendo boa precisão nas medidas.

ii) O ácido acético tem efeito nivelador sobre a basicidade dos ϵ -amino grupos e α -amino grupos. Assim, o nível de basicidade dos amino grupos da lisina, arginina e ornitina, quando titulados potenciometricamente, fornecem apenas um ponto final estequiométrico, que corresponde à soma dos grupos α -amino e ϵ -amino. No entanto, este efeito nivelador não é observado no meio acetonitrila 90% - ácido acético, que fornece a estequiometria de dois pontos finais.

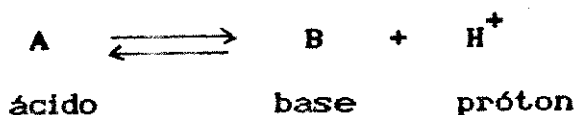
iii) Como a basicidade da histidina é muito fraca, mesmo em ácido puro não foi possível igualar a força deste grupo com a do grupo α -amino, fornecendo, desta forma, dois pontos finais.

Mais recentemente, Barbosa et al⁽⁴¹⁾ utilizaram o método proposto por Molnár-Perl e Pinter-Szakács⁽³⁹⁾ para determinar resíduos de lisina em proteínas, também realizando titulações potenciométricas em ácido acético glacial, com ácido perclórico como titulante, sendo o ponto final determinado visualmente com o uso de indicador.

Os resultados obtidos por Barbosa et al⁽⁴¹⁾, à partir de diferentes quantidades de amostras de proteínas de farinha de soja, são concordantes com os obtidos por titulação potenciométrica e titulação visual.

I-3) Titulação de aminoácidos e proteínas em meios não aquosos

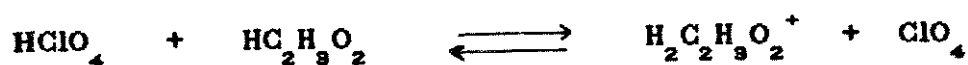
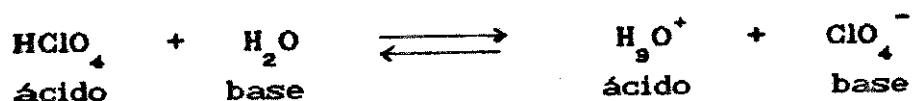
A teoria de dissociação eletrolítica, que surgiu no início do século, estava principalmente limitada ao meio aquoso e não era aplicada para reações de neutralização em outros solventes. Embora muitos estudos tenham sido realizados para meio não aquoso, apenas em 1912 Folin e Flanders⁽⁴²⁾ questionaram a validade da teoria de ionização quando aplicada para outros solventes. Em 1923 Bronsted⁽⁴³⁾ publicou o primeiro conceito de ácido-base. No ano seguinte, Lowry⁽⁴⁴⁾ independentemente, publicou essencialmente a mesma teoria. Bronsted⁽⁴⁵⁾ subsequentemente discutiu a particular aplicação de sua teoria para solventes anfipróticos. De acordo com essa teoria, um ácido é um doador de prótons, e uma base é um receptor de prótons; desta forma:



Um ácido ou uma base pode ser um íon ou uma molécula eletricamente neutra, por exemplo:



Um ácido dissolvido em água ou ácido acético poderia fornecer o seguinte equilíbrio:



Em seguida Lewis⁽⁴⁶⁾ propôs que uma base é um elétron doador e um ácido é um elétron receptor. As reações de neutralização ocorrem porque a troca de um ou mais pares de elétrons resulta em uma molécula de configuração mais estável.

Posteriormente, em 1931, LaMer e Downs⁽⁴⁷⁾ titularam ácidos e bases em solventes apróticos. Nadeau e Branchen⁽⁴⁸⁾ efetuaram titulação visual de aminoácidos em meio ácido acético com cristal violeta como indicador. Titulando o mesmo sistema, Meland e Blake⁽⁴⁹⁾ efetuaram titulações potenciométricas da glicina empregando eletrodo de calomelano e vidro. Gundiff e Markunas⁽⁵⁰⁾ realizaram titulações potenciométricas de aminoácidos em piridina, com solução de hidróxido de tetrabutilamônio na mistura benzeno-metanol como titulante e azul de timol como indicador. Em 1965, Jasinski e Kozłowska⁽⁵¹⁾ determinaram a constante de equilíbrio de vários aminoácidos.

Desde então, várias titulações foram realizadas em meios não aquosos, incluindo titulações de alguns α -aminoácidos. Entretanto muito pouco é conhecido sobre as propriedades dos α -aminoácidos, mesmo porque as reações de equilíbrios ácido-base em meios biologicamente importantes são frequentemente diferentes dos obtidos em água.

Baseado neste problema, Crosby et al.⁽⁵²⁾ sugeriram que meios tais como DMSO e etanol poderiam ser um melhor modelo para reações em vivo. O solvente DMSO é classificado como solvente dipolar aprótico⁽⁵³⁾ e tem sido usado puro ou juntamente com benzeno⁽⁵⁴⁾, para titulações potenciométricas^(55,56,57), termométricas⁽⁵⁸⁾ e com indicador. Por se capaz de aceitar pontes de hidrogênio e ser muito polar, o DMSO é um solvente com grande poder de solvatação. Possui a capacidade de solvatar fortemente ácidos e fracamente bases.

O sistema 80% DMSO - 20% água (p/p) foi empregado na determinação de várias drogas pouco solúveis em água⁽⁵⁹⁾. Esta mistura tem a capacidade de dissolver muitas substâncias orgânicas e inorgânicas, porém suas propriedades ácido - base são diferentes às propriedades da água.

Recentemente Godinho et al⁽⁶⁰⁾ efetuaram titulações potenciométrica e termométrica catalítica (TTC) do aminoácido arginina e das proteínas ovalbumina e lisozima, empregando o meio DMSO : água (7.0 ; 0.8 (v/v)). No caso da titulação termométrica catalítica utilizou-se a mistura DMSO-água-acrilonitrila (7.0 ; 0.8 ; 4.0 (v/v)), sendo a acrilonitrila o indicador termométrico. As curvas de titulação potenciométrica foram obtidas na forma de primeira derivada ($dE / dV \times \Delta V$). Um exemplo da curva obtida para o caso do aminoácido arginina é representado na Figura(I.4).

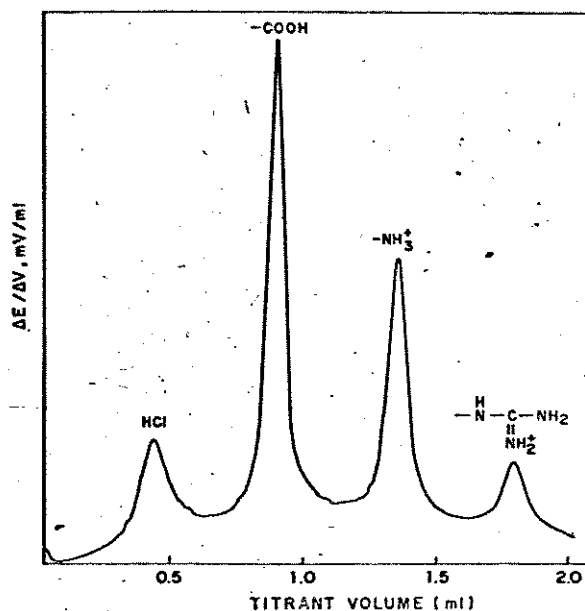


Figura I.4 - 1^a derivada da curva de titulação da mistura de 9,11mg de arginina e 0,809ml de 0,1018 mol dm⁻³ HCl, seguido da adição de 7,0ml de DMSO. Titulante: 0,0995 mol dm⁻³ KOH em isopropanol.

Verificaram que, de acordo com os resultados obtidos para este aminoácido na presença de ácido forte, foi possível titular todos os grupos separadamente, sendo o primeiro pico correspondente à titulação do excesso de ácido forte, o segundo ao grupo carboxílico, o terceiro ao grupo amino e o quarto ao grupo guanidino. Para as proteínas, o primeiro pico corresponde à titulação do ácido forte, o segundo à titulação de grupos carboxílicos e o terceiro à soma dos grupos básicos, Figura(1.5).

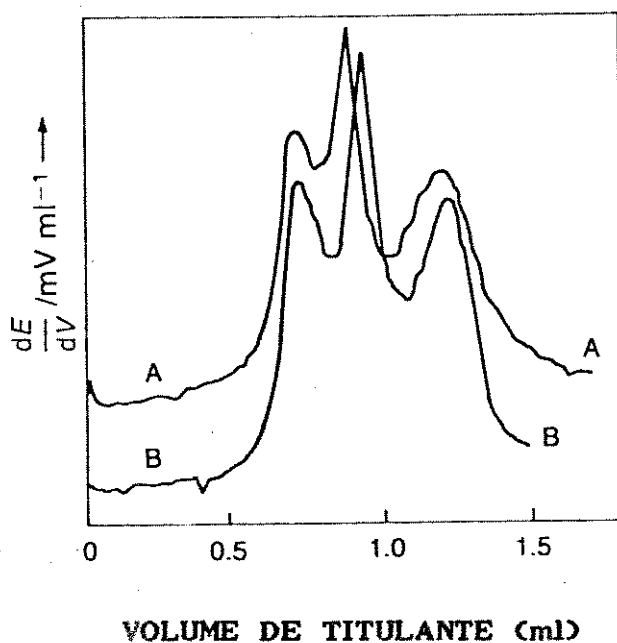


Figura 1.5 - 1ª derivada das curvas de titulação potenciométricas da lisozima e ovalbumina em excesso de ácido forte. Proteína dissolvida em 0,809ml de 0,1018 mol dm⁻³ HCl, seguida da adição de 7,0ml de DMSO: A) 25,69 mg de lisozima; e B) 19,01mg de ovalbumina. Titulante: 0,0995 mol dm⁻³ de KOH em isopropanol.

Godinho et al⁽⁶⁰⁾, verificaram que em suas titulações potenciométricas, os grupos guanidino da ovalbumina foram titulados, mas os grupos guanidino da lisozima não foram. Tabela(I.2)

Tabela I.2 - Resultados obtidos por titulação potenciométrica para o total de grupos protonados da arginina, lisozima e ovalbumina.

composto	n ^o de grupos carboxílicos		Total de n ^o de grupos		n ^o de grupos guanidino presente
	enc.*	pres.	enc.*	pres.+	
arginina	1,10 ± 0,01	1	2,96 ± 0,03	2	1
lisozima	8,7 ± 0,8	10-11	22,7 ± 0,8	21-22	11
Ovalbumina	42,2 ± 2,2	47	97,0 ± 2,1	88 ‡	15

* ± Desvio padrão.

+Não inclui grupos guanidinos.

‡10-11 carboxílicos, 1 imidazol, 1 α-amino, 6 ε-amino e 3 grupos fenólicos.

*47 carboxílicos, 7 imidazóis, 20 ε-amino, 10 fenólicos e 4 grupos SH

enc.=encontrado.pres.=presente.

Observaram ainda que na titulação termométrica catalítica todos os grupos protonados foram titulados, com exceção do sulfidrílico. Concluíram que os grupos guanidino da lisozima são ácidos mais fracos que os da ovalbumina.

II - OBJETIVO

A titulação formol, como foi visto anteriormente, já existe como método na titulação de aminoácidos, bem como, para determinação de resíduos de lisina, desde 1907. Iniciada por Sørensen⁽²⁸⁾, com a utilização de indicadores, foi posteriormente desenvolvida utilizando titulações potenciométricas^(35,36).

Este trabalho tem como objetivo estudar estas titulações de maneira mais sistemática, melhorando a determinação do ponto final e procurando avaliar a exatidão e a precisão do método. Também é de interesse, estudar a influência do solvente DMSO nas titulações formol de aminoácidos e proteínas, uma vez que já existem estudos de titulação potenciométrica destas substâncias utilizando misturas água-DMSO⁽⁶⁰⁾.

III-EXPERIMENTAL

III-1) EQUIPAMENTOS

- . Agitador magnético, Fisatom, modelo 7064.
- . Béquer de 25 ml.
- . Circuito derivador para primeira derivada (Construído em laboratório).
- . Eletrodo de vidro, Methron, uso geral, modelo E.A - 109.
- . Fio de níquel-cromo.
- . Potenciômetro, Micronal, modelo B375.
- . Propulsor de seringa, Sage Instruments, modelo 351.
- . Registrador potenciométrico; E.C.B., modelo RB-103, que permite registro simultâneo da curva de titulação e da derivada da curva.
- . Seringa de vidro de 10 ml; Yale.

III-2) REAGENTES

- . Ácido Benzóico P.A; Carlo Erba.
- . Ácido clorídrico, Merck.
- . Água destilada; destilador de vidro Glissa.
- . Carbonato de sódio P.A; Carlo Erba.
- . DMSO P.A; Merck.
- . Etanol absoluto; Merck.

- . Etanolamina; P.A; Carlo Erba.
- . Formaldeído em solução 37%; Merck.
- . Hidróxido de potássio P.A; Carlo Erba.
- . Iso-propanol; P.A; Merck.
- . Peneira molecular 4A; Carlo Erba.
- . Albumina bovina, Merck; Art. 12018 e Art 10664;
- . Ovalbumina; Sigma A-2512; lote 29F-8040.
- . Lisozima de clara de ovo; Aldrich, A-85387-9;
- . β -lactoglobulina; Sigma.
- . Aminoácidos; Sigma, Kit N^o LAA-21; lote 99F-9009.

III-3) PROCEDIMENTO

III-3.1) Calibração da seringa:

Para se conhecer a vazão real e verificar a uniformidade real do embolo, a seringa de 10 ml foi calibrada através da passagem do volume de água escoado durante 2,5 minutos, com a vazão do propulsor ajustada para $0,40 \text{ ml.min}^{-1}$, em intervalos de 1,0 ml.

Todas as medidas para a calibração da seringa, foram aplicadas em quadruplicata, considerando como resultado final, a média de todos os dados obtidos.

III-3.2) Tratamento dos solventes.

Os solventes, isopropanol e DMSO, foram secos sobre peneira molecular 4 Å^o, ativada. Cerca de 100 g de peneira molecular foram ativadas por aquecimento a 500°C durante 4 horas. Em seguida, resfriadas sob vácuo e imediatamente adicionadas no próprio frasco do solvente. Os solventes foram utilizados após um período mínimo de 24 horas.

III-3.3) Preparação das soluções padrão.

A solução de hidróxido de potássio 0.1000 M em isopropanol foi preparada dissolvendo-se cerca de 300g da base em 500 ml de isopropanol seco, sob agitação. Após a dissolução, a solução foi deixada em repouso por 12 horas para precipitação completa do carbonato de potássio. A solução foi transferida para um frasco de polietileno provido de sifão e tubo com cal sodada para evitar a contaminação pelo dióxido de carbono atmosférico. Esta solução foi padronizada com ácido benzóico utilizando etanol como solvente e fenolftaleína como indicador. O resultado obtido foi corrigido com dados obtidos da titulação em branco.

III-3.4) Titulação Potenciométrica.

Um esquema do equipamento utilizado nas titulações potenciométricas é representado na Figura(III.1).

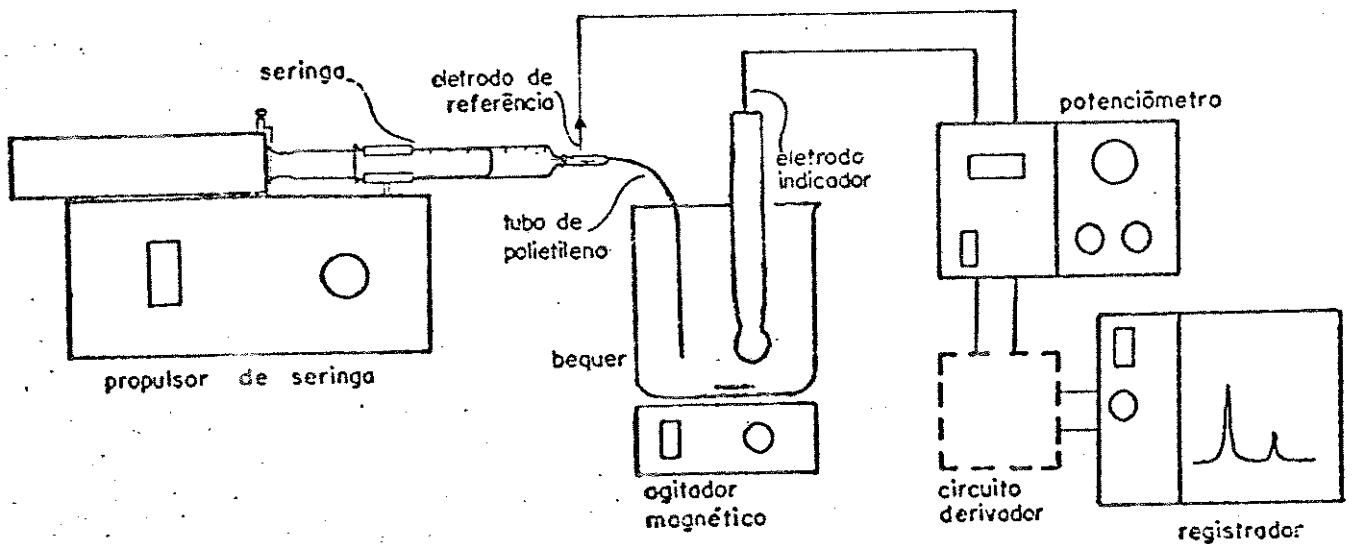


Figura III.1 - Esquema do equipamento utilizado na titulação potenciométrica.

Como eletrodo de referência, foi empregado o fio de níquel cromo selado na seringa e imerso no titulante, e como indicador, foi empregado o eletrodo de vidro imerso no titulado. O contato elétrico entre os dois eletrodos é feito com a imersão do eletrodo de vidro e da ponta do tubo de polietileno no titulado.

a) Titulações na mistura água-formaldeído.

A amostra de aminoácidos ou proteína foi pesada em balança analítica diretamente no béquer, e dissolvida em 7,0ml de água. Após a dissolução, foram adicionados 0,6 ml de HCl e posteriormente 0,8 ml de solução formaldeído 37%. A mistura obtida foi titulada com KOH sob agitação.

O registro das curvas de titulação potenciométrica, potencial em relação ao volume de titulante, foi obtido com registrador potenciométrico acoplado à um potenciômetro. A curva de titulação na forma de primeira derivada dE/dV em relação ao volume de titulante foi obtida utilizando o conjunto potenciômetro - circuito derivador- registrador, como mostra a Figura(III.1). Todos os valores obtidos foram corrigidos com os dados das titulações em branco.

b) Titulações na mistura DMSO-água-formaldeído.

Novamente certa quantidade de aminoácidos ou proteína foi pesada diretamente no béquer e dissolvida em 0,8 ml de HCl 0,1 M. Após a dissolução, foram adicionados 7,0 ml de DMSO e posteriormente 0,8 ml de solução de formaldeído 37%. A mistura obtida foi titulada, e os

resultados das referentes curvas de titulação também foram corrigidos com titulações em branco. Para o sistema DMSO-água-formaldeído, o eletrodo de vidro foi condicionado nesta mesma mistura 48 horas antes do uso.

IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.1 - Calibração da seringa

Para proceder a calibração da seringa, as medidas foram efetuadas em uma determinada seção da mesma e os resultados obtidos são mostrados na tabela(IV.1).

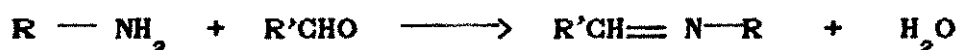
Tabela(IV.1) : Massas de água obtidas na calibração da seringa, a 21°C ; tempo de escoamento: 2,5 min; vazão nominal do propulsor: 0,40 ml.min⁻¹.

escala da seringa	massa de H ₂ O (g)			
7-6	0.79735	0.80754	0.79139	0.79706
6-5	0.79669	0.79972	0.80150	0.79547
5-4	0.79592	0.79887	0.79531	0.79880
4-3	0.80225	0.79967	0.79943	0.79940
3-2	0.79348	0.78939	0.79468	0.79225
2-1	0.79028	0.78579	0.78932	0.79190

Aplicou-se o teste Q para os resultados obtidos, e verificou-se que nenhum deles foi rejeitado com um nível de significancia de 90%. A vazão média obtida dos volumes de 7 a 1 ml foi de 0.3998 ± 0.0042. Apesar da homogeneidade da seringa, houve a preocupação de utilizar sempre o mesmo intervalo de 7-5 ml, cuja vazão média forneceu o resultado de 0,4000 ± 3.35 x 10⁻⁵.

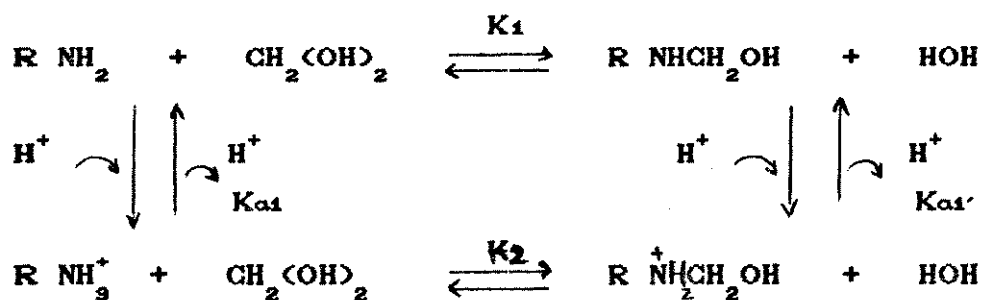
III-2) Titulações Potenciométricas em meio $H_2O:H_2CO$

Bases de Schiff são compostos básicos muito fracos, formados pela reação de aminas primárias ou secundárias com aldeídos.



Podem ser convenientemente analisadas por titulações em meio não aquoso, através de uma adequada escolha do par solvente titulante⁽⁶¹⁾.

Em tratamento teórico de titulações "formol", tem-se geralmente assumido que o formaldeído combina com aminas primárias ou secundárias para formar hidroximetilaminas de basicidade negligenciável⁽⁶²⁾. O equilíbrio da combinação destas aminas com formaldeído pode ser representado pela equação:



Entretanto, Kallen e Jencks⁽⁶²⁾ admitem tanto a protonação de hidroximetilamina, quanto a adição de formaldeído à uma amina protonada.

Em nosso trabalho, estudou-se as titulações "formol" para aminoácidos e proteínas, verificando o comportamento do formaldeído, visando desenvolver um método simples para a determinação de grupos amino em aminoácidos, bem como a determinação de resíduos de lisina em proteínas.

O método envolve tratamento da solução do aminoácido ou proteína com ácido forte e solução de formaldeído, com posterior titulação com KOH em isopropanol. Por outro lado, pretende-se verificar a influência do solvente DMSO nas reações referidas acima. Desta forma, procurou-se observar simultaneamente o efeito do formaldeído e variação da basicidade do solvente sobre os grupos amino, nas titulações potenciométricas.

IV-3) Titulação Potenciométrica de aminoácidos:

Para estas titulações, 25 aminoácidos foram testados. Efetuou-se a preliminar dissolução do aminoácido com 7,0 ml de água, e posterior acidificação do meio com 0,6 ml de HCl 0,1 M. A adição de ácido ao meio transforma os grupos carboxílicos na forma protonada.

Na sequência foi realizada a adição de 0,8 ml de solução formaldeído 37% . O formaldeído reage com os grupos amino transformando-os em derivados amino metilol.

É importante observar que, quando se fala em amino grupos na presença de formaldeído, na realidade está se referindo ao produto da reação do grupo amino com o formaldeído. Estes compostos são derivados amino metilol, ou seja, iminas conhecidas como bases de Schiff e apresentam o valor do pKa menor que o pKa do amino grupo⁽⁶²⁾.

Por último efetuou-se a titulação. Durante todo nosso trabalho, foram registradas duas curvas simultâneas para cada experimento executado, sendo : a) curva clássica de titulação potenciométrica $\Delta E \times \Delta V$ e b) a primeira derivada desta curva $dE / dV \times \Delta V$. Paralelamente foram obtidos os

valores aproximados do potencial referente a cada ponto final, no decorrer da titulação de alguns aminoácidos. Efetuou-se também titulações de mistura de alguns deles. Estes procedimentos servem para comprovar a localização de cada grupo na curva de titulação.

IV-3.1) Titulação da glicina.

Para a glicina, aminoácido que possui apenas o grupo carboxílico e o grupo amino, verificou-se a seguinte curva de titulação potenciométrica: Figura(IV.1).

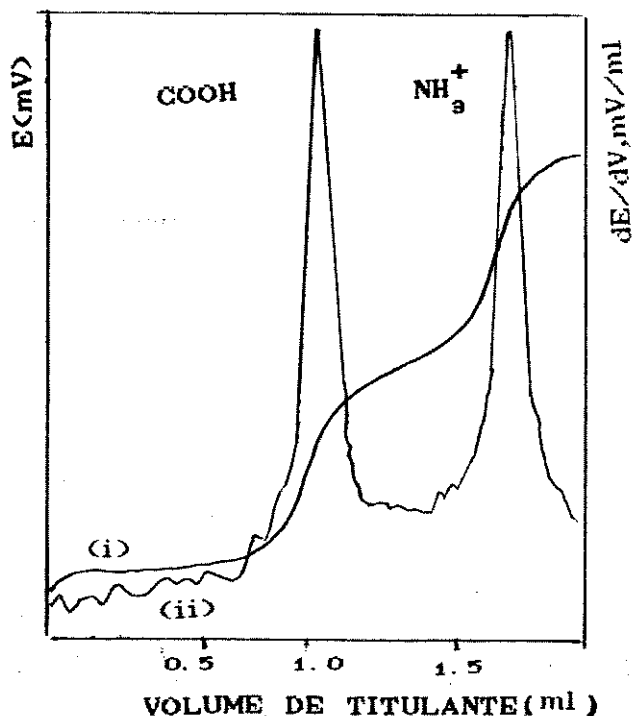


Figura IV.1- (i) curva de titulação potenciométrica da glicina em presença de ácido forte, (ii) primeira derivada da curva; $m=3,79$ mg de glicina. Titulante: KOH 0,0998M em isopropanol.

Observou-se duas inflexões: a primeira correspondente à soma do excesso de ácido forte e grupos carboxílicos e a segunda correspondente aos grupos amino.

O ácido é importante para transformar o grupo carboxílico em forma protonada. A quantidade estequiométrica correta do ácido carboxílico e excesso de ácido, na verdade não é importante no nosso caso, uma vez que estamos interessados na quantificação correta do grupo amino. Os grupos carboxílicos protonados, por serem ácidos mais fortes, aparecem na primeira inflexão, juntamente com excesso de ácido forte e impurezas do solvente, e os grupos amino na segunda inflexão. Desta forma, a medida do volume necessário para titular o grupo amino, corresponde à distância entre o primeiro e o segundo pico.

IV-3.2) Titulação da lisina:

A lisina, aminoácido que tem em sua estrutura os grupos: carboxílico, α -amino e ϵ -amino, apresenta duas inflexões: uma corresponde à soma da titulação do grupo carboxílico e excesso de ácido forte e a segunda inflexão corresponde à titulação dos grupos α -amino e ϵ -amino. Figura(IV.2).

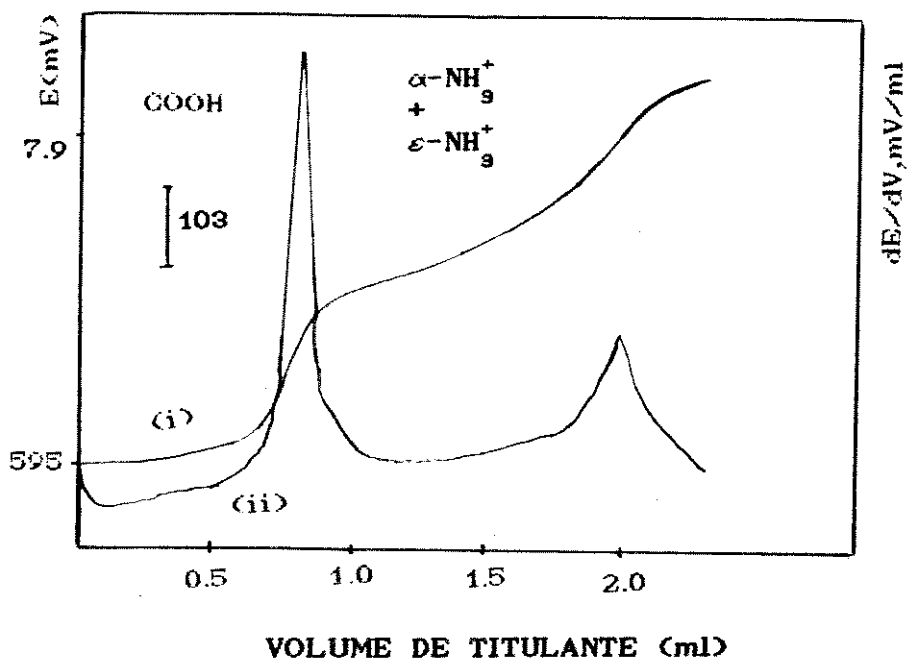
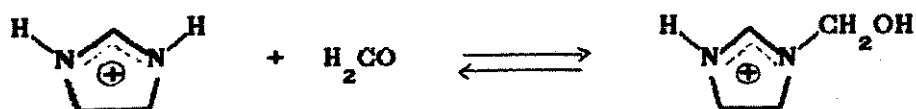


Figura IV.2- (i) curva de titulação potenciométrica da lisina em presença de ácido forte; (ii) primeira derivada desta curva; m = 9,000mg de lisina. Titulante: KOH 0,0998M em isopropanol.

IV-3.3) Titulação Potenciométrica da histidina:

A histidina é um aminoácido que possui o grupo imidazol em sua fórmula estrutural, com valor de pKa menor que o pKa do grupo amino, em meio aquoso.

Embora alguns autores^(63,64,65) acreditem que o grupo imidazol não reage com formaldeído, em trabalhos posteriores, Wellisch⁽⁶⁶⁾, Kallen e Jencks⁽⁶²⁾ admitiram que a reação ocorre. Kallen e Jencks⁽⁶²⁾ propuzeram que a reação entre o grupo imidazol e o formaldeído acontece de acordo com a equação:



Em nosso trabalho, apesar de termos nos utilizado da reação acima para nossas titulações, não nos preocupamos na identificação e determinação dos compostos analisados.

Realizamos a titulação da histidina nas mesmas condições das efetuadas para a lisina. Verificamos novamente a presença de duas inflexões na curva de titulação potenciométrica. Figura(IV.3).

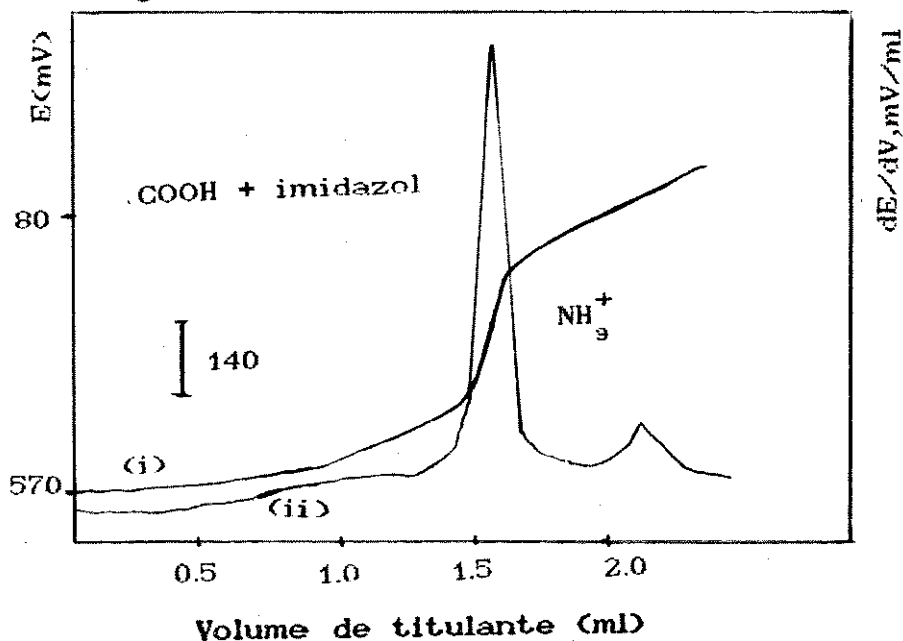


Figura IV.4 - (i) curva de titulação potenciométrica da histidina em presença de ácido forte; (ii) 1ª derivada desta curva; m = 9,012 mg de histidina. Titulante: KOH 0,0998M em isopropanol.

Sendo o grupo imidazol um grupo mais ácido que o grupo amino, concluiu-se que o primeiro pico corresponde à titulação do excesso de ácido clorídrico, grupo carboxílico e grupo imidazol, e o segundo pico à titulação do amino grupo.

Para comprovar a posição do α -amino grupo, titulou-se uma mistura de cloridrato de histidina e glicina em ausência de ácido forte. Desta forma, o grupo imidazol aparece sozinho no primeiro pico, onde o grupo carboxílico não é titulado, e de dois grupos na segunda inflexão sendo um pertencente à glicina e outro à histidina, Figura(IV.4).

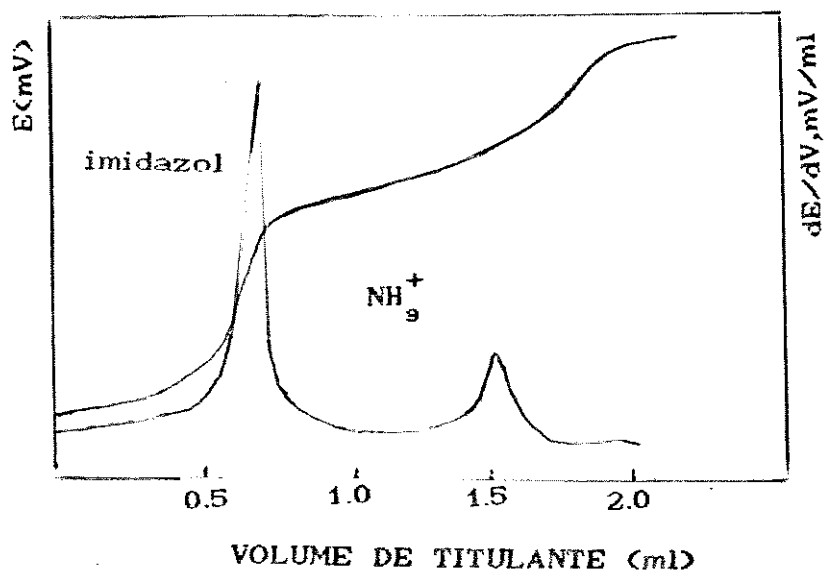


Figura.IV.4 - (i) curva de titulação potenciométrica da histidina e glicina em presença de ácido forte. (ii) 1ª derivada da curva. a) $m = 3,47$ mg de glicina; b) $m = 9,00$ mg de histidina. Titulante: KOH 0.0998M em isopropanol.

IV-3.4) Titulação de outros aminoácidos:

Outros aminoácidos, tais como a arginina, que possui o grupo guanidino, e a cisteína que possui o grupo sulfidrilico, foram titulados. Figuras(IV.5.a, IV.5.b).

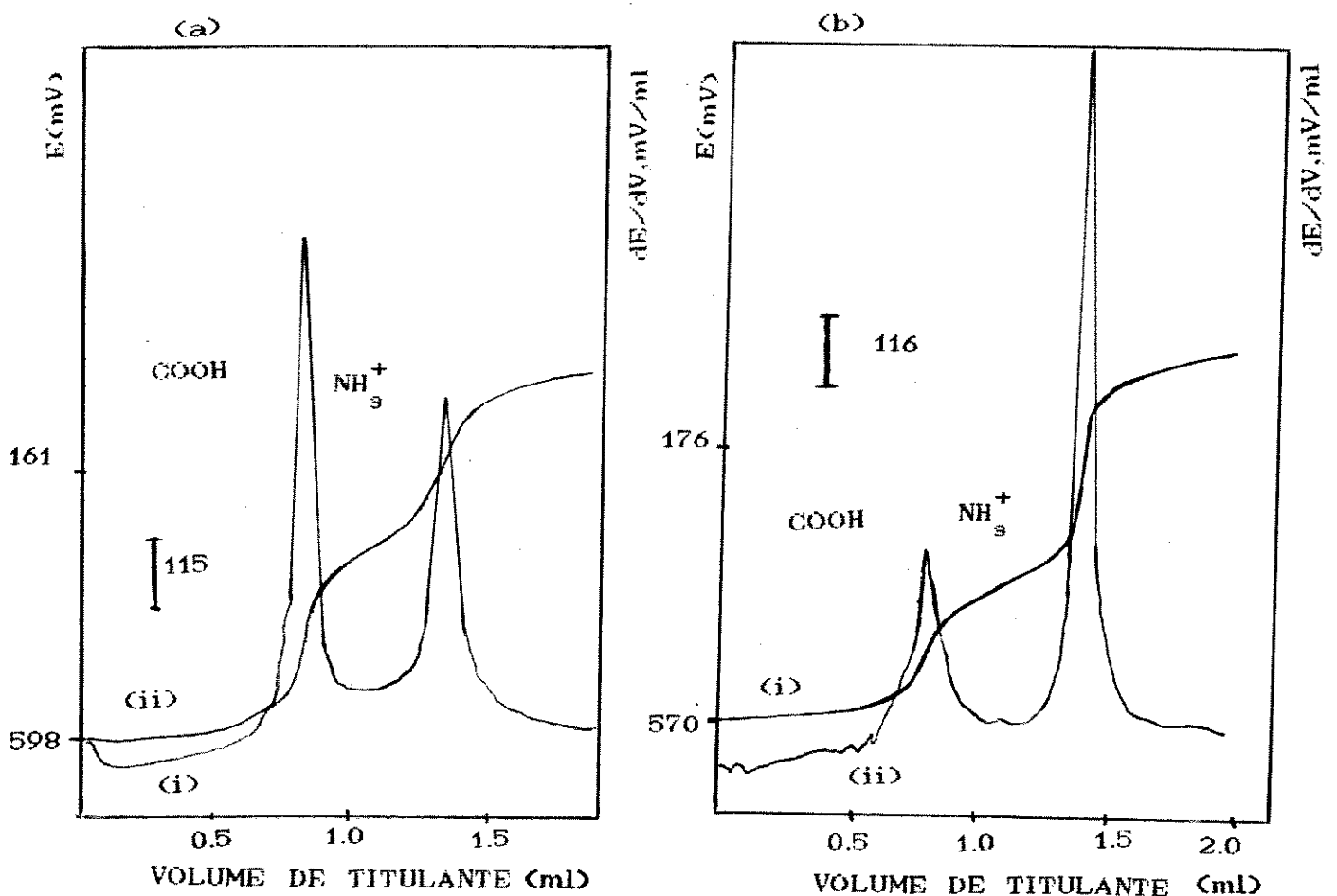


Figura IV.5 - (i) curvas de titulação potenciométrica da arginina e cisteína, em presença de ácido forte; (ii) 1ª derivada desta curva. a) $m = 9,24$ mg de arginina; b) $m = 6,08$ mg de cisteína. Titulante: KOH 0,1027 M em isopropanol.

Resultados idênticos à titulação da glicina foram obtidos para a arginina e para a cisteína. Desta forma, verificamos que tanto o grupo guanidino como o grupo sulfidrílico não foram titulados neste meio, e sim apenas os grupos carboxílicos e grupos amino. Isto pode ser observado por suas curvas de titulação.

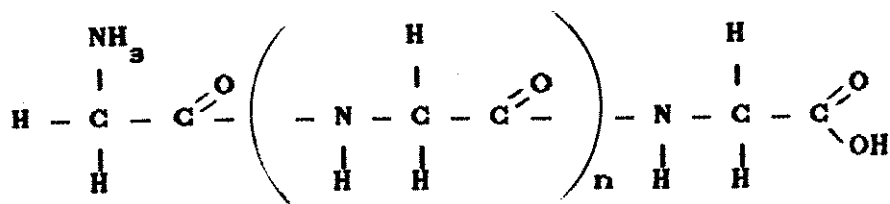
Os demais aminoácidos estudados apresentaram de forma similar aos anteriores. Portanto, concluímos que os grupos fenóis da tirosina, os indóis do triptofano e os grupos amida da asparagina ou glutamina, também não foram titulados.

IV-3.5) Titulação de aminoácidos dicarboxílicos:

Uma observação importante deve ser relatada sobre a titulação dos aminoácidos dicarboxilados: ácido aspártico e ácido glutâmico. Sendo estes aminoácidos compostos de dois grupos ácidos carboxílicos, observou-se nas curvas de titulação que os dois grupos carboxílicos aparecem no primeiro pico, sendo titulado apenas o grupo amino no segundo pico. Isto pode ser devido ao solvente, que provavelmente deixa todos os grupos carboxílicos com valores de pKa próximos, separando-os do grupo amino, que neste meio, seriam ácidos mais fracos.

IV-3.6) Titulação de polipeptídeos:

Outra observação importante deve ser feita à respeito dos polipeptídeos: diglicina e triglicina. O aminoácido diglicina possui dois grupos glicina ligados covalentemente, e o aminoácido triglicina possui três grupos glicina ligados covalentemente em suas estruturas:



Para $n = 0$ — diglicina. Para $n = 1$ — triglicina.

Novamente observou-se que a curva de titulação potenciométrica para estes aminoácidos, tanto para a diglicina como para a triglicina, tem forma similar à curva de titulação de glicina, sendo que foi observado apenas duas inflexões; uma pertencente ao grupo carboxílico e a outra pertencente ao grupo amino.

Os aminoácidos poli-L-lisina e poli-D-lisina também foram titulados. Ambos os poliaminoácidos parecem titular

todos os grupos amino. Porém não foi possível determinar com exatidão o número de ϵ -amino grupos titulados, devido à diferenças entre os valores fornecidos de seus pesos massas moleculares, determinados por diferentes métodos.

Tabela IV.2 - Peso molecular dos aminoácidos: Poli-L-Lisina e Poli-D-lisina.Poli-D-lisina.

aminoácido	peso molecular	método de determinação
Poli-L-Lisina	24.500	viscosidade
	21.000	LALLS*
Poli-D-Lisina	25.900	viscosidade
	17.600	LALLS

*LALLS - sistema de medida adotado pela sigma (Low Angle Laser Light Scatering).

Os resultados das titulações dos aminoácidos são mostrados na Tabela(IV.3). Pode-se verificar uma boa concordância entre os valores esperados (teórico), e os valores encontrados, com exceção da tirosina e lisina. Os outros aminoácidos puderam ser determinados com erro inferior à \pm 2,6%, significando que o método proposto possui uma boa exatidão.

Tabela IV.3 : Resultado da titulação de grupos aminos presentes em aminoácidos no meio $H_2O:H_2CO_2$ (7,0 ; 0,8 (v/v)).

aminoácido	n ^o de grupos amino por mol.		Erro relativo
	presente	encontrado*	
glicina	1,000	0,998	-0,2%
alanina	1,000	1,004	+0,4%
valina	1,000	1,007	+0,7%
leucina	1,000	1,023	+2,3%
isoleucina	1,000	1,006	+0,6%
serina	1,000	0,980	-2,0%
treonina	1,000	1,019	+1,9%
cisteína	1,000	1,013	+1,3%
cistina	não é solúvel no meio		
metionina	1,000	1,003	+0,3%
fenilalanina	1,000	1,010	+1,1%
tirosina	1,000	0,934	-6,6%
triptofano	1,000	1,003	+0,3%
ácido aspártico	1,000	0,995	-0,5%
ácido glutâmico	1,000	1,006	+0,6%
glutamina	1,000	0,995	-0,5%
lisina	2,000	1,860	-7,0%
histidina	1,000	1,001	+0,1%
arginina	1,000	1,011	+1,1%
hidroxiprolina	1,000	1,012	+1,2%
diglicina	1,000	0,997	-0,2%
triglicina	1,000	0,974	-2,6%

* média de 6 determinações.

IV-4) Titulação de proteínas.

Da mesma forma, as curvas de titulação das proteínas mostraram resultados coerentes aos resultados obtidos para os aminoácidos, sendo que apenas os grupos carboxílicos, aminos e imidazóis foram titulados, e de maneira similar, a primeira inflexão da curva corresponde á titulação do excesso de ácido forte, grupos carboxílicos e imidazóis, e a segunda á titulação dos amino grupos. Foram efetuadas titulações de 4 proteínas, sendo elas: soro albumina bovina, lisozima, β -lactoglobulina, ovalbumina. A Tabela(IV.4) mostra os pesos moleculares e o número de grupos presentes em cada proteína.

Tabela(IV.4) - pesos moleculares e número de grupos das proteínas: lisozima, BSA, Ovalbumina, β -lactoglobulina.

	Lisozima ⁽⁶⁷⁾	BSA ⁽⁶⁸⁾	Ovalb. ⁽⁶⁹⁾	lactog. ⁽⁷⁰⁾
Guanidino	11	23	15	6
α -amino	1	1	0	2
ϵ -amino	6	59	20	28
imidazol	1	17.6	7	4
carboxílico	10	94	47	54
fenol	3	19	10	8
sulfidrílico	-	-	4	2
P.M.	14307	67000	42699	35500

De acordo com os dados obtidos, observou-se que para as proteínas, os grupos carboxílicos e grupos imidazóis são titulados na primeira inflexão, enquanto os grupos amino na segunda inflexão. No entanto, os demais grupos não são titulados. Figura (IV.6).

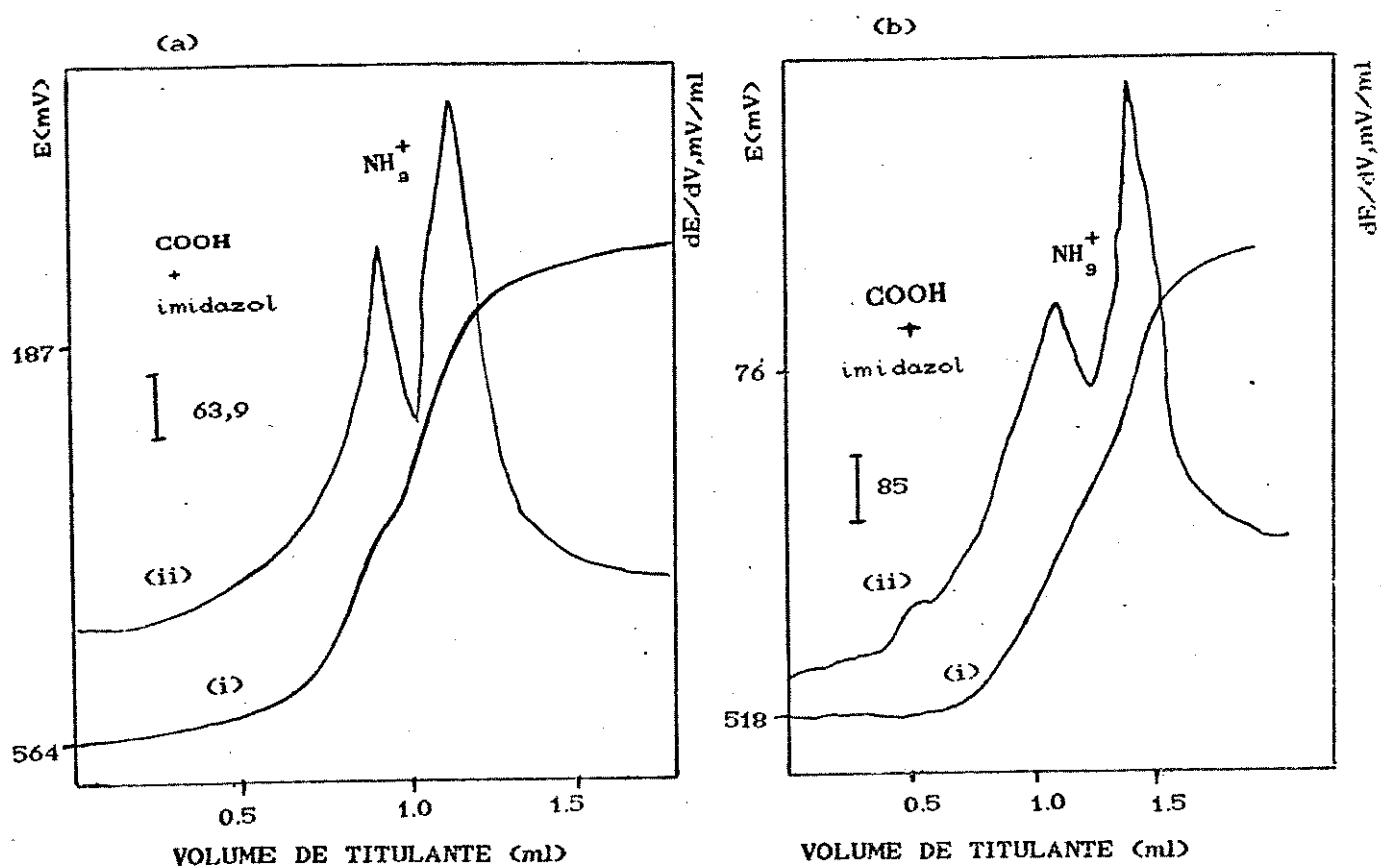


Figura IV.6 - (i) curvas de titulação potenciométrica da BSA e β -lactoglobulina em presença de ácido forte; (ii) primeira derivada desta curva. a) $m=19,10$ mg de BSA; b) $m = 18,70$ mg de β -lactoglobulina. Titulante: KOH 0,0998M em isopropanol.

Esta característica parece favorável quando o interesse é a determinação de resíduos de lisina pois os grupos amino são titulados separadamente dos demais aminoácidos.

Os resultados obtidos para todas as proteínas, com exceção da ovalbumina, apresentam uma boa concordância com o valor esperado, onde o erro relativo não ultrapassa $\pm 1,53\%$, exceto para a proteína ovalbumina indicando que o método apresenta uma boa exatidão. Tabela (IV.5).

Tabela IV.5 - Resultados da titulação de resíduos de lisina presentes em proteínas, no meio $H_2O : H_2CO (7,0;0,8 (v/v))$.

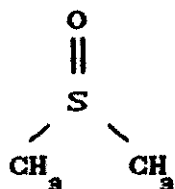
proteína	n ^o de grupos amino por mol		Erro relativo
	presente	encontrado*	
BSA	60,00	60,92	+1,53%
Lisozima	6,00	5,93	-1,17%
β -Lactoglobulina	30,00	29,91	-0,30%
Ovalbumina	20,00	19,04	-4,80%

* média de 6 determinações.

IV-5.) Titulação potenciométrica em meio
DMSO-água-Formaldeído:

Todos os experimentos anteriormente citados para o meio água-formaldeído, foram repetidos com o meio DMSO-água-formaldeído, para verificar a influência do solvente dimetilsulfóxido nestas titulações. O estudo deste meio mostrou alterações significativas nas curvas de titulação de alguns aminoácidos e das proteínas.

O DMSO é classificado como solvente dipolar aprótico⁽⁷¹⁾. Estes solventes são altamente polares, com constante dielétrica moderadamente alta, e não possuem hidrogênio ácido na molécula. O fato do solvente DMSO ser muito polar e ser capaz de aceitar pontes de hidrogênio é que lhe confere um grande poder de solvatação⁽⁷²⁾. A associação do próton ao DMSO é feita somente através do átomo de oxigênio, embora o enxofre também possua um par de elétrons livres.



Estrutura do solvente DMSO.

IV-5.1) Titulação da lisina:

No caso da titulação da lisina, a primeira inflexão corresponde à titulação do excesso de ácido clorídrico, do grupo carboxílico, e do grupo ϵ -amino, e a segunda inflexão corresponde à titulação do grupo α -amino. Figura(IV.7).

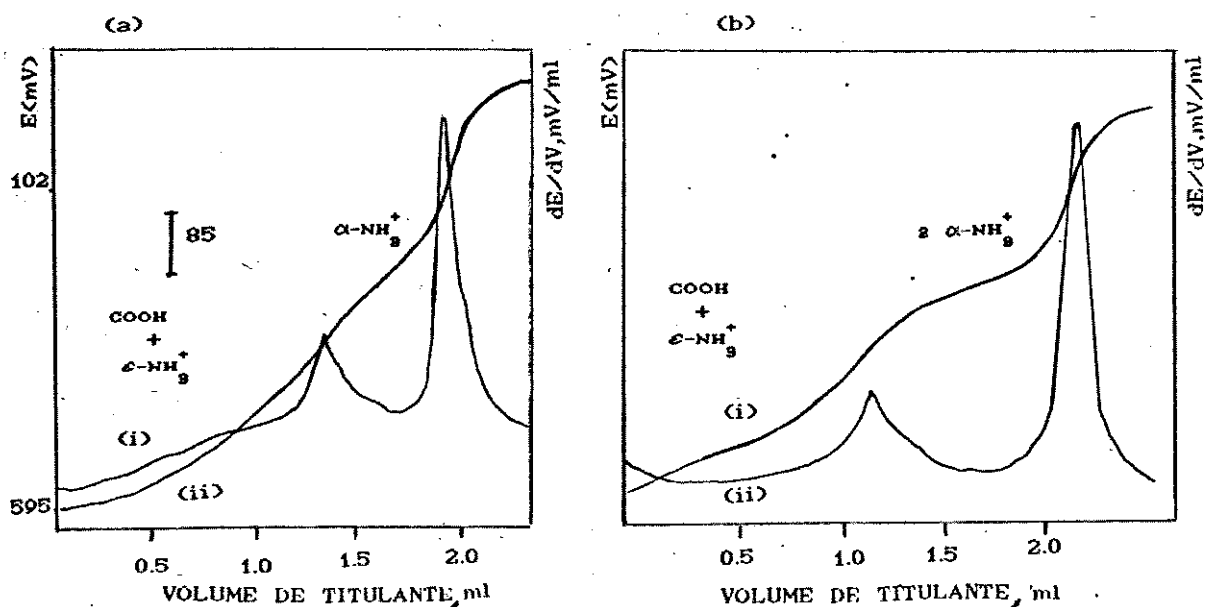


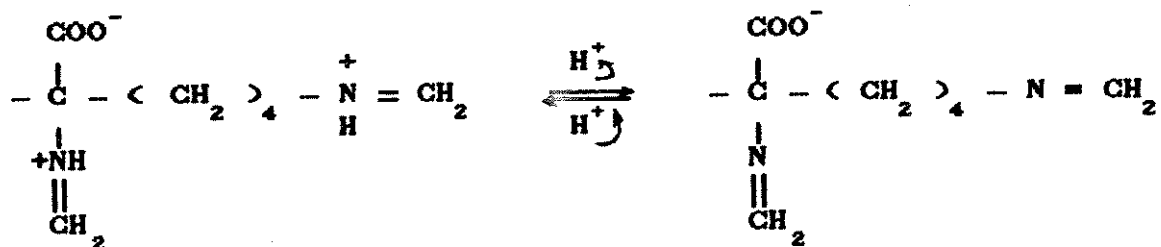
Figura IV.7- (i) Curvas de titulação potenciométrica da lisina e da mistura de lisina e alanina em presença de ácido forte. (ii) 1ª-derivada desta curva. a) $m = 9,21\text{mg}$ de lisina; b) $m = 4,44\text{ mg}$ de lisina; $m = 3,83\text{ mg}$ de alanina. Titulante: KOH 0,1099M em isopropanol.

Este resultado pode ser confirmado pela titulação da mistura de lisina e etanolamina e da mistura de lisina e alanina.

A etanolamina é uma base que possui o grupo amino não adjacente ao grupo carboxílico, devendo apresentar comportamento próximo ao do ϵ -amino grupo da lisina. Os resultados mostram um acréscimo na estequiometria correspondente a 1^a inflexão da curva de titulação. Isto comprova que o grupo ϵ -amino da lisina é titulado no primeiro pico e não no segundo.

Para uma mistura de lisina e alanina, Figura(IV.7), houve um acréscimo na segunda inflexão da curva, que corresponde à titulação dos grupos α -amino de ambos os aminoácidos. Este procedimento confirma a posição dos α -amino grupos na curva de titulação da lisina.

Neste ponto, torna-se evidente a influência do solvente DMSO nestas titulações. O grupo ϵ -amino, que em meio água-formaldeído aparece juntamente com o grupo α -amino, em DMSO-água-formaldeído aparece na primeira inflexão, juntamente com os grupos carboxílicos. De acordo com a reação abaixo, verificamos que:



Quando a titulação é feita em meio aquoso, os grupos α -amino dos aminoácidos tem valores de pKa menores que os grupos ϵ -amino. Tabela (v.1). Isto pode ser atribuído ao modesto efeito indutivo (-I) do grupo carboxilato que é menos significativo no caso do ϵ -amino grupo.

Não dispõe-se dos valores de pKa dos imino derivado resultantes da reação dos amino grupos com formaldeído, apesar deles serem titulados na mesma inflexão da curva de titulação.

Na mistura DMSO:H₂O:H₂CO, isto, porém não ocorre. O imino derivado do grupo ϵ -amino fica um ácido mais forte que o derivado do α -amino grupo. As principais razões para a mudança na forma da curva de titulação se deve não apenas a efeitos indutivos, mas também ao fato do solvente DMSO ser um solvente aprótico. Neste caso a explicação não nos parece muito fácil, uma vez que envolve muitos fatores. A magnitude do efeito de um solvente sobre as propriedades ácido-base depende tanto da natureza deste efeito, quanto do tipo de composto titulado.

Além do mais verificou-se que em titulações da lisina em meio DMSO:H₂O (trabalho já desenvolvido e ser publicado), a curva de titulação potenciométrica é semelhante à curva de titulação em meio água-formaldeído.

IV-5 2) Titulação da histidina.

Para a titulação da histidina em meio água-formaldeído a primeira inflexão da curva corresponde à titulação dos grupos carboxílico e imidazol e a segunda inflexão a titulação do imino derivado do grupo amino. No entanto, em DMSO-H₂O:H₂CO o grupo imidazol aparece na segunda inflexão juntamente com o imino derivado do grupo α-amino.

Por outro lado, a curva de titulação da histidina no meio DMSO:H₂O^(7a) possui duas inflexões, uma correspondente aos grupos carboxílico e imidazol e a outra ao α-amino grupo.

Fazendo uma comparação das titulações da histidina nos três meios diferentes, ou seja: mistura H₂O:H₂CO, mistura DMSO:H₂O:H₂CO e DMSO:H₂O^(7a) estamos induzidos a acreditar que o DMSO exerce um efeito bem maior sobre imino derivado do grupo ε-amino que é titulado na primeira inflexão do que sobre ε-amino grupo que é titulado na segunda inflexão, da mesma

forma que no meio água-formaldeído.

A Figura (IV.8) mostra a curva de titulação da histidina.

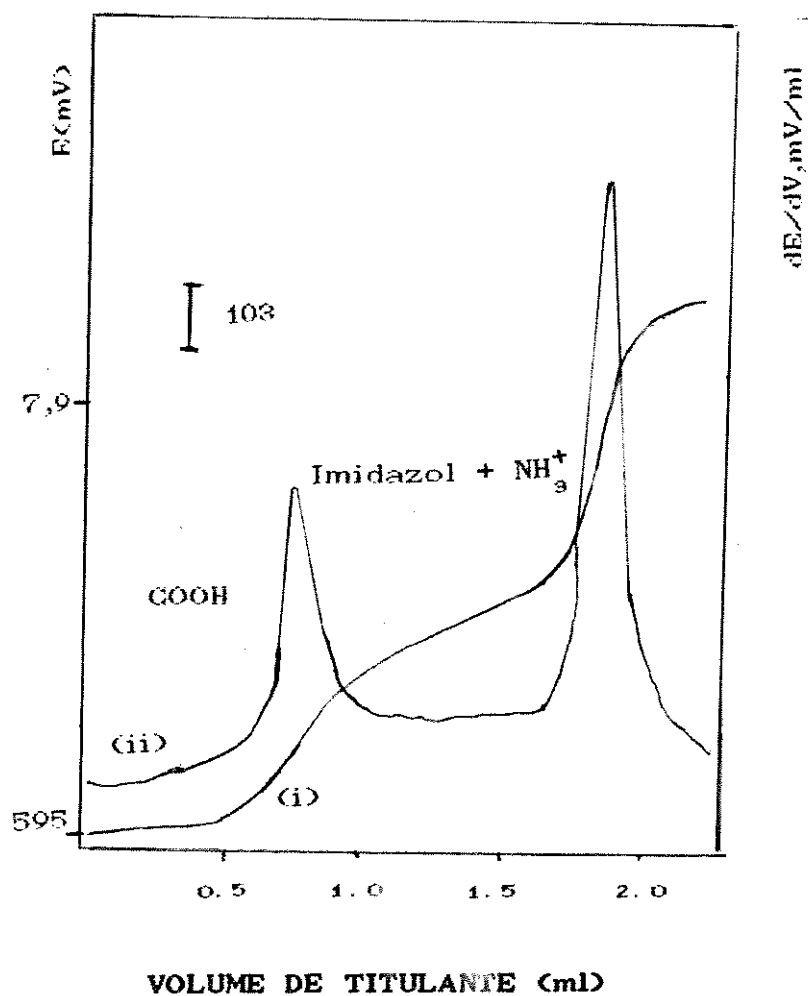


Figura IV.8 - (i) curva de titulação potenciométrica da histidina em presença de ácido forte. (ii) 1ª derivada desta curva. m = 9,15mg de histidina. Titulante: KOH 0,1099M em isopropanol.

IV-5.3) Titulação do ácido aspártico:

A curva de titulação do ácido aspártico em meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$ também apresenta diferenças significativas em relação a curva de titulação em meio $\text{H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$. Figura (IV.9).

Neste meio, ($\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$) observamos que o grupo α -carboxílico apresenta propriedades mais ácidas que o grupo β -carboxílico e, desta forma, são titulados separadamente.

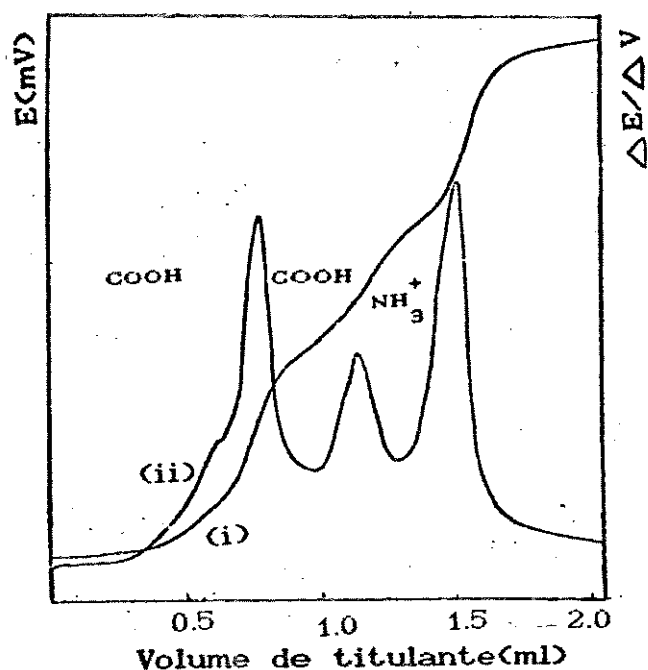


Figura IV.9 - (i) curva de titulação potenciométrica do ácido aspártico em presença de ácido forte; (ii) 1^a derivada desta curva, $m = 3,87$ mg de ácido aspártico. Titulante: $\text{KOH } 0,1076 \text{ M}$ em isopropanol.

IV-5.4) Titulação de polipeptídeos:

Para os aminoácidos diglicina e triglicina, os resultados também parecem coincidir com os resultados obtidos em meio água-formaldeído. No entanto, para os aminoácidos poli-L-lisina e poli-D-lisina, acredita-se que todos os grupos ϵ -amino foram titulados juntamente com o grupo carboxílico, assim como ocorre para a lisina. Porém, neste meio também não foi possível determinar com exatidão, todos os grupos ϵ -amino destes dois aminoácidos, pelos mesmos motivos já citados anteriormente.

IV-5.5) Titulação de outros aminoácidos:

Para os demais aminoácidos, as curvas de titulação neste meio apresentam resultados similares aos encontrados pelas titulações no meio água-formaldeído. Assim os grupos: guanidina, fenóis, sulfidrílicos, amida, indóis, não são titulados.

Também para o meio DMSO-água-formaldeído, os resultados das titulações de aminoácidos apresentam uma boa exatidão, exceto para o ácido aspártico. Tabela(IV.6)

Tabela IV.6 - resultados das titulações dos grupos amino em aminoácidos no meio DMSO- água-formaldeído (7,0;0,2;0,8(v/v)).

aminoácido	n ^o de grupos amino por mol		Erro relativo
	presente	encontrado	
glicina	1,000	1,010	+1,0%
alanina	1,000	1,020	+2,0%
valina	1,000	0,986	-1,4%
leucina	1,000	1,008	+0,8%
isoleucina	1,000	0,990	-1,0%
serina	1,000	0,977	-2,3%
treonina	1,000	0,995	-0,5%
cisteína	1,000	1,000	0,0%
cistina	não é solúvel neste meio		
metionina	1,000	0,998	-0,2%
fenilalanina	1,000	1,005	+0,5%
triptofano	1,000	1,014	+1,4%
tirosina	1,000	0,979	+2,1%
ácido aspártico	1,000	1,120	+10,7%
glutamina	1,000	1,023	+2,0%
lisina	1,000	0,980	-2,0%
histidina	1,000	1,010	+1,0%
arginina	1,000	1,020	+2,0%
Prolina	1,000	1,010	+1,0%
hidroxiprolina	1,000	1,009	+0,9%
diglicina	1,000	0,996	-0,2%
triglicina	1,000	1,025	+2,4%

* média de 6 determinações.

IV-6) Titulação de Proteínas:

No caso das proteínas, o solvente DMSO não alterou tanto a acidez dos grupos ϵ -amino, como alterou para o caso da lisina. Neste meio, os grupos ϵ -amino das proteínas são titulados na segunda inflexão. Isto talvez se deva à estrutura complexa das proteínas que dificulta a ação do DMSO sobre este grupo.

Neste meio foram realizadas titulações potenciométricas com as mesmas proteínas tituladas em meio água-formaldeído. Tabela (IV.7).

Tabela IV.7 - Resultados da titulação de resíduos de lisina em proteínas na presença de ácido forte, no meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}_2$ (7,0; 0,2;0,8(v/v)).

proteínas	Grupos encontrados	N ^o de grupos presentes			
		amino	imidazol	fenol	guanidino
BSA	78,92	60,00	17,60	19,00	23,00
lisozima	13,28	6,00	1,00	3,00	11,00
lactog.	34,59	30,00	4,00	8,00	6,00
ovalbumina	42,17	20,00	7,00	8,00	15,00

* média de 6 determinações.

Como exemplo dos resultados por nós obtidos das titulações das proteínas neste meio pode-se observar as Figuras (IV.10a, IV.10b). Estas mostram as curvas de titulações potenciométricas da soro albumina e ovalbumina respectivamente.

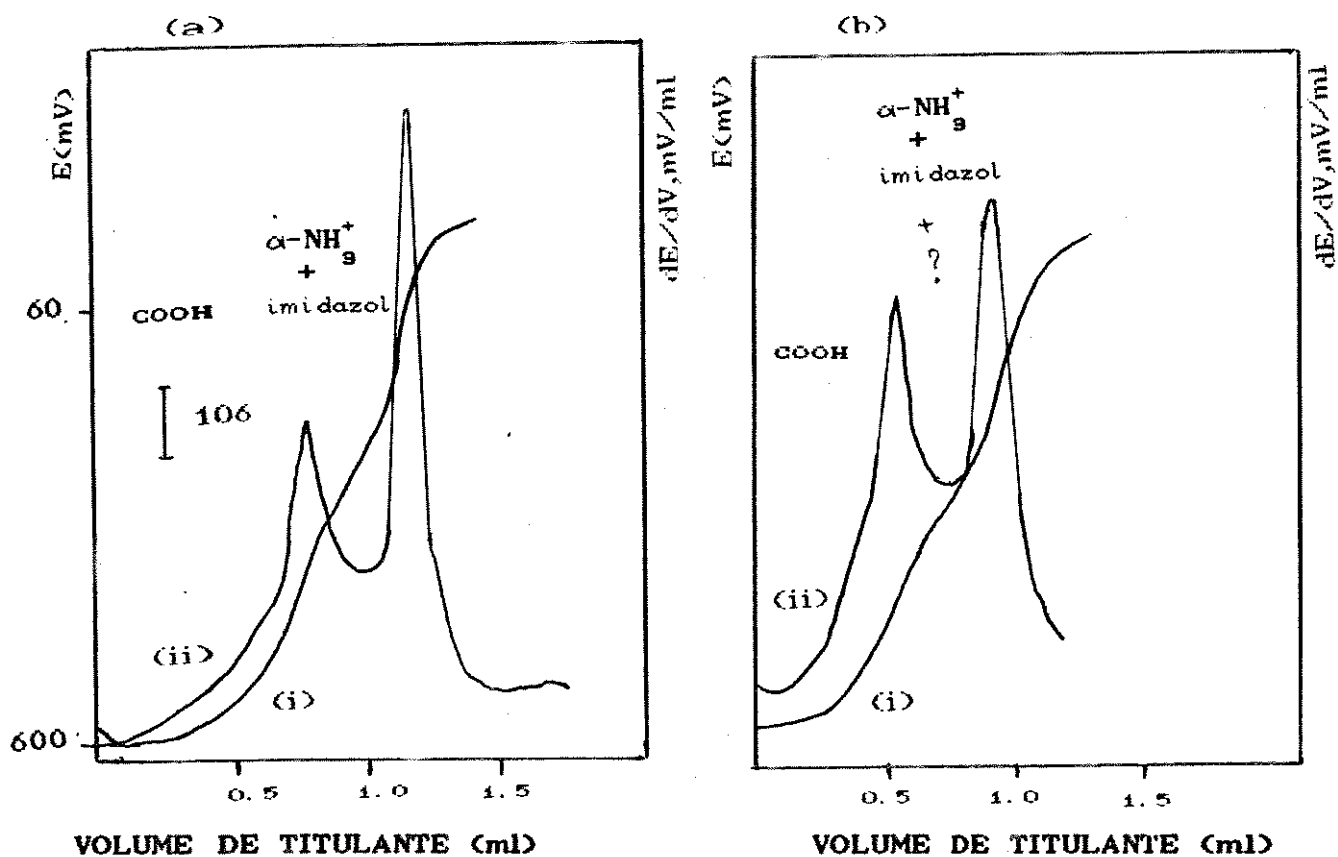


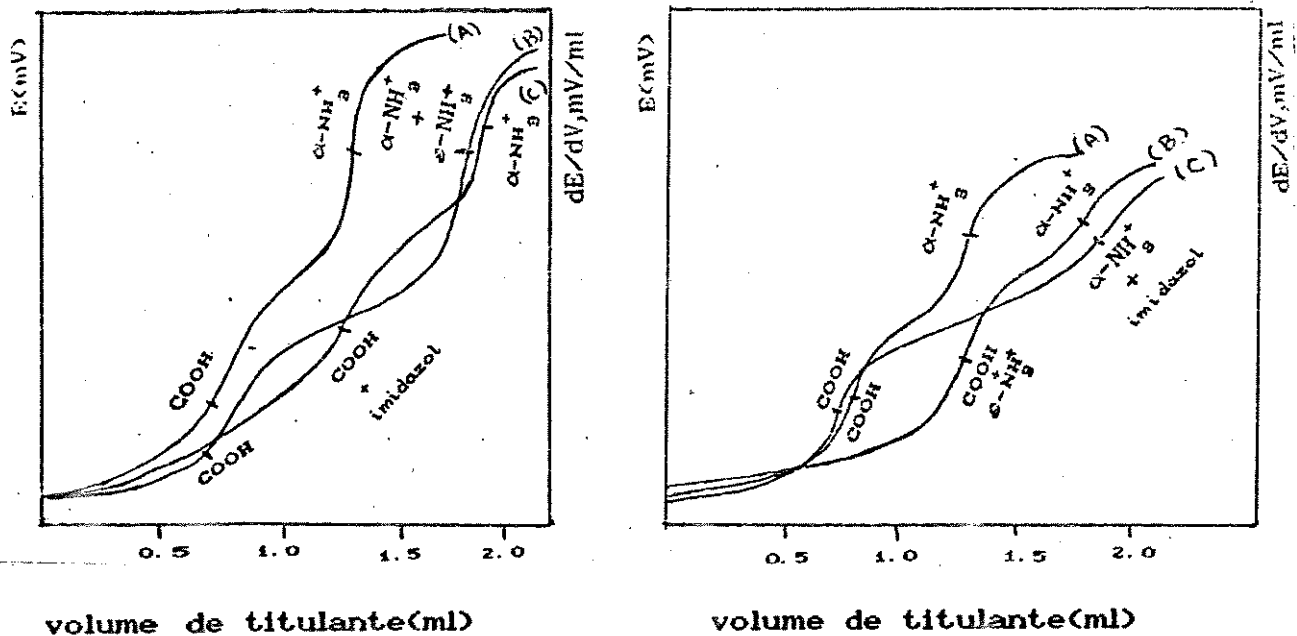
Figura III.10 - (i) curvas de titulação potenciométrica de BSA e ovalbumina, em presença de ácido forte; (ii) 1ª derivada desta curva. a) $m = 19,09$ mg de BSA, b) $m = 19,15$ mg de ovalbumina. Titulante: KOH 0,1067 M.

Para o meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$, os resultados obtidos não estão muito claros. Deixam certa dúvida à respeito de quais grupos foram titulados. Não se sabe ao certo, qual ou quais grupos seriam titulados juntamente com o grupo amino. Para a soro albumina e β -lactoglobulina , os grupos ϵ -amino e imidazol parecem ser titulados entre a primeira e a segunda inflexão da curva. Porém para as proteínas ovalbumina e lisozima, outro grupo, ou parte dele, também parece ser titulado na segunda inflexão.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a titulação no sistema $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$ não parece ser favorável ao desenvolvimento de um método analítico, para determinação de resíduos de lisina em proteínas, pelo menos antes de um estudo mais aprofundado sobre o sistema.

V-CONCLUSÃO

Fazendo analogia das curvas de titulação potenciométrica dos aminoácidos: glicina, lisina, histidina, observamos que para o meio $H_2O : H_2CO$, são próximos os valores de pKa dos grupos: a) carboxílico do imidazol na histidina e b) α -amino do ϵ -amino na lisina. Por outro lado, em meio $DMSO:H_2O:H_2CO$, o valor do pKa do grupo carboxílico está próximo ao do ϵ -amino, no caso da lisina, enquanto o pKa do grupo imidazol fica próximo do pKa do grupo α -amino, no caso da histidina. Figuras(V.1.a,V.1.b).

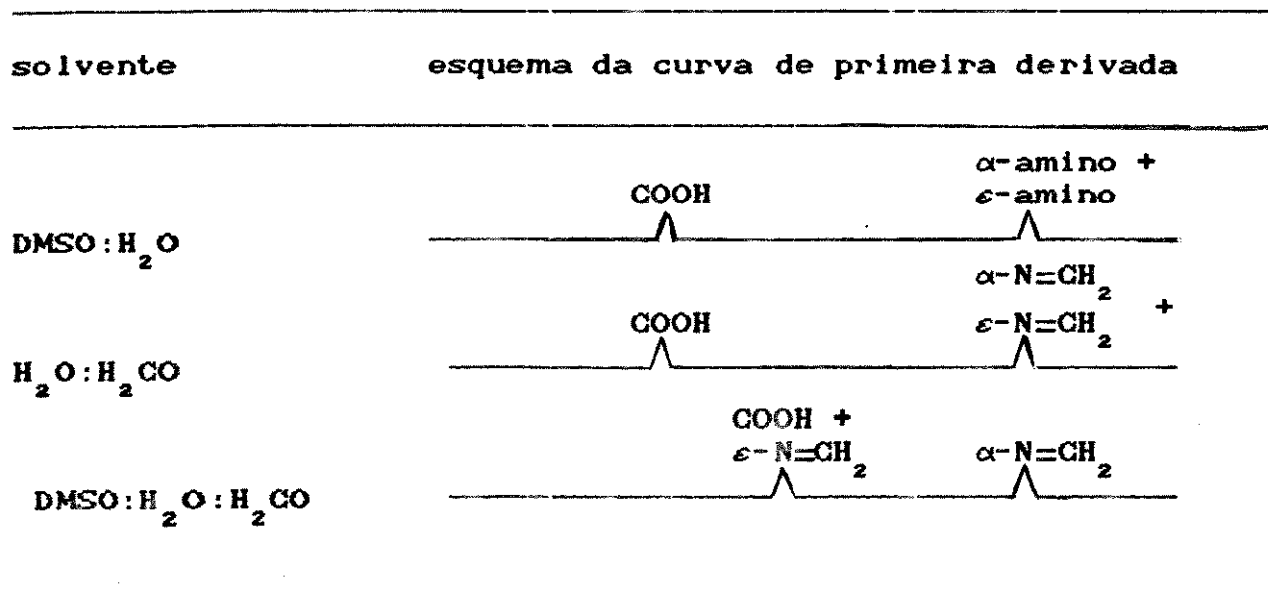


volume de titulante(ml)

volume de titulante(ml)

Figura V.1 - curvas de titulação potenciométrica de 4,5 moles da (A)glicina, (B)lisina, (C)histidina nos meios : a) $H_2O:H_2CO$ b) $H_2O : H_2CO : DMSO$. titulante: KOH 0,1067 M.

b) lisina:



Resultados interessantes também ocorrem com a lisina, em meio DMSO-água (trabalho já desenvolvido a ser publicado), onde o α -amino é titulado juntamente com o grupo ϵ -amino. Porém em presença de formaldeído, o grupo ϵ -amino derivado parece ser um ácido mais forte, sendo titulado junto com o grupo carboxílico. No entanto, isto não ocorre em meio água-formaldeído.

Outra comparação pode ser feita em relação às proteínas, para os diferentes meios. Observa-se que em meio dimetilsulfóxido-água, todos os grupos são titulados⁽⁶⁰⁾. Por outro lado, no meio água-formaldeído, apenas os grupos

carboxílico, imidazol, α -amino e ϵ -amino são titulados, sendo os grupos amino titulados sozinhos na segunda inflexão. Porém para o meio dimetilsulfóxido-água-formaldeído a segunda inflexão corresponde à soma dos grupos amino, imidazol e outro grupo ou parte dele.

Quadro geral comparativo das titulações potenciométricas para grupos protonados em proteínas:

TIPO	DMSO:H ₂ O ⁽⁶⁰⁾	H ₂ O:H ₂ CO	DMSO:H ₂ CO:H ₂ CO
carboxílico	+	+	+
imidazol	+	+	+
α -amino	+	+	+
ϵ -amino	+	+	+
fenol	+	-	-
guanidino	+	-	(+)*
sulfidrílico	+	-	-

* ausente em algumas proteínas e presença não comprovada em outras proteínas.

Importante observar que, para determinação de resíduos de lisina, o meio água-formaldeído fornece vantagens sobre outros meios, uma vez que os grupos amino são titulados

separadamente. No entanto em dimetilsulfóxido-água, isto não ocorre, pois com exceção dos grupos carboxílicos e sulfidrílico, todos os outros são também titulados juntamente com o grupo amino. Quando as titulações são realizadas em meio dimetilsulfóxido-água-formaldeído, o grupo imidazol aparece junto com o grupo amino, e provavelmente outro grupo para certas proteínas.

Para os aminoácidos analisados, o meio água-formaldeído fornece resultados com erro relativo menor que $\pm 2.3\%$, exceto para a lisina e a tirosina, e para as proteínas analisadas, menor que $\pm 1.53\%$, exceto para a ovalbumina. O método é simples, rápido e de baixo custo, podendo facilmente ser aplicado em análises de rotina. Pode ser usado para análise de lisina em misturas de aminoácidos bem como sua determinação em fluidos fisiológicos em laboratórios clínicos.

VI-PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS:

Outros caminhos podem ser tomados na sequência deste trabalho. A realização de estudos em diferentes meios, utilizando solventes dipolares apróticos, tais como: dimetilformamida, dimetilacetamida e hexametilfosforamida, para alguns aminoácidos, bem como a variação do sistema solvente titulante, podem fornecer resultados interessantes.

Por outro lado, um estudo mais aprofundado das titulações da lisina e histidina no meio $\text{DMSO:H}_2\text{O:H}_2\text{CO}$, tais como variação da concentração de dimetilsulfóxido ou solução de formaldeído, pode ser realizado.

Outra possibilidade seria a tentativa de investigar o efeito de DMSO sobre os amino derivados dos grupos α -amino e ϵ -amino por meio de outra técnica como por exemplo RMN de prótons.

A realização destes trabalhos, juntamente com o auxílio de outros já efetuados, podem levar á uma melhor compreensão do efeito de um solvente aprótico em titulação formol.

VII - BIBLIOGRAFIA

1. Bohinski, R. C., "Modern Concepts in Biochemistry", 2nd ed., Allyn and Bacon, Boston, 1976, p.85.
2. Lehninger, A. L., "Bioquímica", Vol I, Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1976, p.46.
3. Carpenter, K. J. Ellinger, G. M., Murro, M. I., and Rolfe, R. J., Br. J. Nutr. 11 , 162 (1957).
4. Lea, C. H., Parr, L. J., and Carpenter, K. J., Br. J. Nutr. 14 , 91 (1960)
5. Pellet, P. L., Food Technol. 32 , 60 (1978).
6. Lundblad, R. L., and Noyes, C. M., "Chemical Reagents for Protein Modification", CRC Press, Boca Raton, Fl.,1983.
7. Means, G. E., and Feeney, R. E. Chemical Modification of Proteins, Hoden-Day, San Francisco, 1971.
8. Hennecke, M., and Plapp, V. B., Anal. Biochem. 136 , 110 (1984).

9. Sanger, F., Biochem. J. 39 , 507 (1945).
10. Carpenter, K. J., Biochem. J. 77 , 604 (1960).
11. Kakede, M. L., and Liener, I. E., Anal. Biochem. 27 , 273
(1969).
12. Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., and Shinoda, T., J.
Biochem. (Japan) 47 , 654 (1960).
13. Okuyama, T. and Satake, K., J. Biochem. (Japan) 47 , 454
(1960).
14. Habeeb, A. F. S. A., Anal. Biochem. 14 , 328 (1966).
15. Mokrash, L. G., Anal. Biochem. 18 , 64 (1967).
16. Hall, R. J., Trinder, N., and Gines, D. I., Analyst 98 ,
673 (1973).
17. Fraenkel-Conrat, H. and Cooper, M., J. Biol. Chem. 154 ,
239 (1944).

18. Rosenberg, R. M., and Klotz, I. M., "A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry", Vol I, Pergamon Press, London, 1960.
19. Udy, D. C., Cereal Chem. 31 , 389 (1954).
20. Udy, D. C., Nature 178 , 314 (1956).
21. Molnár-Perl, I. , and Pintér-Szakács, M., Food Chemistry 20 , 21 (1986).
22. McCaldin, D. J., Chem. Rev. 60 , 39 (1960).
23. Friedman, M., and Siegel, C. W., Biochemistry 5 , 478 (1966).
24. Friedman, M., Can. J. Chem. 89 , 4709, (1967).
25. Lamothe, P. J., and McCormick, P. G., Anal. Chem. 44 , 821 (1972).
26. Friedman, M., and Williams, L. D., Anal. Biochem. 54 , 333 (1973).

27. Shiff, H., Liebigs Ann., 310 , 25 (1900).
28. Sørensen, S. P. L., Biochem. Z. 7 , 45 (1907).
29. Henriques, V., and Sørensen, S. P. L., Z. Physiol. Chem. 64 , 120 (1910).
30. Fraenkel-Conrat, H., and Olcott, H. S., J. Biol Chem. 174, 827 (1948).
31. Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., and Olcott, H. S., J. Am. Chem. Soc. 67 , 950 (1945).
32. Fraenkel-Conrat, H., Brandon, B. A., and Olcott, H. S., J. Biol. Chem. 168 , 99 (1947).
33. Fraenkel-Conrat, H., and Olcott, H. S., J. Am. Chem. Soc. 68 , 34 (1946).
34. Safarik, L., and Stránský, Z., "Titrimetric Analysis in Organic Solvents" (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, Vol 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, p.262.

35. Birch, W. T., and Harris, L. J., *Biochem. J.* 24 , 1080 (1930).
36. Kenchington, A. W., "Analytical Methods of Protein Chemistry" (Alexander, P. and Block, R. J.), Pergamon Press, New York, 1968, p 381.
37. Foreman, F. W., *Biochem. J.* 14 , 451 (1920).
38. Popovich, O., Radulescu, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 20 , 73 (1948).
39. Molnár-Perl, I., and Pintér-Szakács, M. , *Anal. Chim. Acta* 202 , 159 (1987).
40. Gündüz, T., Günduz, N., Kiliç, E. Köseoglu, F., and Öztas, S. G., *Analyst* 113 , 715 (1988).
41. Barbosa, J., Bosch, E., Cortina, J. L., and Rosés, M., *Anal. Chim. Acta* 256 , 177 (1992).
42. Folin, O., and Flanders, F. F., *J. Am. Chem. Soc.* 34 , 774 (1912).

43. Bronsted, J. N., Rec. Trav. Chim. 42 , 718 (1923)
44. Lowry, T. M., Trans. Faraday Soc. 20 , 13 (1924).
45. Bronsted, J. N., Physik. Chem. A. 169 , 52, (1934).
46. Lewis, G. N., "Valence and Structure of Atoms and Molecules" , Chemical Catalog Co., New York, 1923.
47. La Mer, V. K., and Downs, H. C., J. Am. Chem. Soc. 53 , 888 (1931).
48. Nadeau, G. F., and Branchen, L. E., J. Am. Chem. Soc. 57 , 1336 (1935).
49. Meland, G., and Blake, M. I., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 45 , 672 (1956).
50. Cundiff, R. H., and Markunas, P. C., Anal. Chem. 28 , 792 (1956).
51. Jasinski, T., Kozłowska, L., Roczniki Chemii 39 , 1861 (1965).

52. Crosby, J., Stone, R., and Lienhard, G. E., J. Am. Chem. Soc. 92 , 2891, (1970).
53. Martin, D. Weise, A., and Niclas, H. J., Angew. Chem. 6 , 318 (1967).
54. Resibois, B., and Hode, C., J. Pharm. Belg. 25 , 343 (1970).
55. Korewa, R., Chem. Anal. (Warsaw) 15 , 127 (1970).
56. Korewa, R., Jasinski, T., Anal. Chem. 44 , 529R (1972).
57. Kwiatkowski, E., Plucinska, H., Nikel, I., Chem. Anal. (Warsaw) 14 , 1295 (1969).
58. Kiss, T., Fresenius' Z. Anal. Chem. 252 , 12 (1970).
59. Fini, A., Maric, P., Guarnieri, A., and Varoli, L., J. Pharm. Sci. 76 , 48 (1987).
60. Godinho, O. E. S., Raimundo Jr., I. M., Aleixo, L. M., and Oliveira Neto, G., Analyst 116 , 1181 (1991).

61. Van der Heijde, H. B., Anal. Chim. Acta 17 , 512 (1957).
62. Kallen, G. R., and Jencks, W. P., J. Biol. Chem. 241 (24), 5864 (1966).
63. French, D., and Edsall, J. T., Advan. Prot. Chem. 2 , 277 (1945).
64. Levy, M., J. Biol. Chem. 109 , 365 (1935).
65. Frienden, E. H., Dunn, M. S., and Coryell, C. D., J. Phys. Chem. 47 , 85 (1943).
66. Wellisch, J., Biochem. Z. 49 , 173 (1913)
67. Canfield, R. E., J. Biol. Chem. 238 , 2698 (1963).
68. Levy, M., Compt. Rend. Lab. Carlsberg Sér. Chim., 30 , 301 (1958).
69. Nisbet, A. D., Saundry, R. H., Moir, A. J. G., Fothergill, L. A., and Fothergill, J. E., Eur. J. Biochem. 115 , 335 (1981).

70. Tanford, C., *Advan. Prot. Chem.* 17 , 157 , (1962).
71. Popovich, O., and Tomkins, "Nonaqueous Solution Chemistry", John Wiley, New York, 1981, p.34.
72. Martin, P., Weise, A., and Niclas, H. J., *Angew. Chem.* 79 , 1176 (1975).
73. Queiroz, R. R. U., "Investigações Envolvendo a Titulação Termométrica Catalítica", Tese de Doutorado, Instituto de Química / UNICAMP , Campinas, 1988.