

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

LINEARIZAÇÃO DA CURVA DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE PROTEÍNAS. APLICAÇÃO
À LISOZIMA, β -LACTOGLOBULINA E IMUNOGLOBULINA HUMANA.

José do Patrocínio Hora Alves
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof.Dr. Osvaldo Espírito Santo Godinho

CAMPINAS - 1982

À meus pais e à vocês, Eva,
Daniel, Valter e Aline.

A G R A D E C I M E N T O S

Queremos externar os nossos agradecimentos àqueles cuja colaboração veio tornar possível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Osvaldo Espírito Santo Godinho, pela sugestão do tema, orientação e constante apoio na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Manoel Aleixo, pela colaboração prestada, principalmente no início deste trabalho.

Ao professor Dr. Ari Ivaska, pelas sugestões e boa vontade com que sempre nos atendeu.

Ao professor Dr. Benedito Oliveira e toda sua equipe, pelo fornecimento das amostras de imunoglobulina e pelas informações prestadas, bastante úteis na titulação desta proteína.

Aos meus colegas de laboratório, pelo calor humano, ajuda e amizade.

A Universidade Federal de Sergipe e Capes-PICD, pela oportunidade concedida e pelo suporte financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foram feitas titulações potenciométricas de proteínas, no estado nativo em força iônica 0,10 e 1,0 M e desnaturadas com uréia e cloridrato de guanidina. As soluções de proteínas, nativas ou desnaturadas, mais excesso de ácido forte foram tituladas com solução padrão de hidróxido de sódio. Os dados das titulações foram analisados pelo método da linearização da curva de titulação, que permitiu obter, ao mesmo tempo, o ponto de equivalência dos vários grupos tituláveis da proteína e suas respectivas constantes de dissociação.

Os resultados obtidos para lisozima, β -lactoglobulina e imunoglobulina humana, mostraram que este método funciona muito bem na titulação de proteínas. Em todos os três casos foram caracterizados dois tipos diferentes de grupos carboxílicos e grupos imidazol e amino. Os grupos amino foram parcialmente titulados no estado nativo e totalmente no estado desnaturado.

Uma observação importante é que somente em uréia, os resultados da estequiometria da lisozima foram concordantes com os números de grupos indicados pela sequência de aminoácidos. Esta mesma observação não pôde ser feita com as outras proteínas, devido a falta de uma sequência de aminoácidos bem estabelecida.

S U M M A R Y

Potentiometric titrations of native and denatured proteins have been performed. In the first case, the titrations have been realized at ionic strengths 0.10 and 1.0 M and in the second case, the proteins have been denatured by urea or guanidine hydrochloride before to be titrated. The solutions of proteins plus strong acid were titrated with sodium hydroxide solution. The application of the method of the linearization of titration curves, to the data obtained, lead us to determine the equivalence point and the dissociation constants of the titratable groups of the proteins.

The results obtained for lysozyme, β -lactoglobuline and human immunoglobuline were capable to show that the application of this method, to the titration of proteins, is advantageous. Amino, imidazole and two types of carboxylic groups have been characterized in the application of the method to the proteins studied in this work. Only part of the amino groups have been titrated in the case of native proteins, but they are completely determined when the proteins are denatured before the titration.

An interesting fact to note is that the stoichiometry of lysozyme agrees with the results of the amino acid sequence, only in the case of the denaturation with urea. It was not possible to check whether there is or not this concordance in the case of other proteins, due to the fact that their amino acid sequence are not available.

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	7
I - PARTE EXPERIMENTAL	11
1.1 - Aparelhagem e Reagentes.	11
1.2 - Medidas da Concentração Hidrogeniônica . . .	12
1.2.1 - Em força iônica 0,10 M.	12
1.2.2 - Em força iônica 1,0 M	12
1.2.3 - Em solução concentrada de uréia	15
1.2.4 - Em solução concentrada de cloridrato de guanidina	17
1.3 - Pureza da uréia e do cloridrato de guanidina	19
1.4 - Procedimento.	21
II - MÉTODO DE CÁLCULO	22
III - TITULAÇÃO DA LISOZIMA.	28
3.1 - Titulação potenciométrica da lisozima nativa	28
3.1.1 - Resultados e Discussão.	30
3.2 - Titulação potenciométrica da lisozima desna- turada	54
3.2.1 - Resultados e Discussão.	75
IV - TITULAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA	79
4.1 - Titulação potenciométrica da β -lactoglobuli - na nativa e desnaturada.	79
4.2 - Resultados e Discussão	103
V - TITULAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA.	113
5.1 - Titulação potenciométrica da imunoglobulina humana (IgG1) nativa e desnaturada	113
5.2 - Resultados e Discussão	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

INTRODUÇÃO

Muitas revisões (1,2) têm mostrado que as curvas de titulação potenciométrica de proteínas, têm servido para obtenção de dados, tais como pK_a e estequiometria de grande importância na elucidação de suas estruturas e propriedades. É óbvio que a correspondência entre a estequiometria obtida da titulação da proteína e a composição de aminoácidos, ou a falta de tal correspondência, ou a existência de uma correspondência apenas parcial, podem produzir informações importantes sobre a conformação da proteína. O interesse no estudo do equilíbrio ácido-base de proteínas, também reside no fato de praticamente todas as propriedades das soluções de proteínas, inclusive aquelas de significado biológico, serem afetadas fortemente pela atividade do íon hidrogênio na solução. Portanto, solubilidade, pressão osmótica, características de absorção da luz, viscosidade, mobilidade eletroforética, estabilidade da forma nativa, atividade enzimática etc. são todas função do pH.

O método clássico de obtenção da curva de titulação, envolve a titulação potenciométrica de ambos, proteína e solvente com ácido e base, a partir do qual os íons hidrogênios combinados ou liberados da proteína são calculados. Devido a falta de inflexões discretas, para contagem dos grupos titulados, divide-se a curva de titulação em três partes, região de pH 2 a 6, região neutra e região alcalina, onde se supõe que são titulados os grupos carboxílicos, imidazol e α -amino, e ϵ -amino e fenólicos respectivamente. Este método de contagem está sujeito a algumas arbitrariedades e os resultados do número

de grupos (Ni) assim obtidos, podem ser refinados quando se faz a análise semi-empírica da forma de cada parte da curva de titulação (2).

O tratamento clássico dado a curva de titulação potenciométrica de proteínas, faz uso do modelo de Lindstrom-Lang (3). Este tratamento leva em consideração a interação eletrostática e como resultado disso, a constante de dissociação de algum grupo titulável torna-se dependente da carga média, Z , por molécula de proteína. Isto implica que a constante de dissociação de cada grupo está constantemente variando com o pH e com a carga da proteína. Para obtenção da constante de dissociação de cada grupo titulado é usado a equação :

$$pH - \log (x_i / (N_i - x_i)) = pK_i - 0,868wZ \quad (1)$$

onde x_i é o número médio de prótons dissociados de N_i grupos, pK_i é o $-\log$ da constante de dissociação dos grupos i , w o coeficiente de interação eletrostática e Z a carga líquida sobre a proteína. Quando a lado esquerdo da equação é graficado versus Z , a inclinação é $0,868w$ e a interseção em Z igual a zero, é o pK_i .

Em alguns casos a equação de Lindstrom-Lang tem fornecido resultados estranhos, como valor muito elevado para w na região dos carboxílicos da lisozima (4). E no caso da albumina bovina (5), o valor constante de w não ajusta todos os dados na região dos carboxílicos. Nos dois exemplos acima, o problema pôde ser contornado considerando-se a presença de dois tipos diferentes de grupos carboxílicos (6,7).

Marini e Martin (8) criticam o fato de se atribuir toda variação na constante de dissociação somente a interação eletrostática, já que esta constante é o resultado da estrutura molecular, força iônica, hidratação, constante dielétrica, ressonância, ligação hidrogênio e também carga da proteína. Mos-

traram também, que em face da dificuldade de se estabelecer valores corretos para N_i , resultados errados podem ser obtidos para w . Portanto, sugerem que expressões derivadas da aplicação da lei da ação das massas, podem adequadamente descrever a titulação de uma proteína.

Recentemente Godinho e Aleixo (9) têm apresentado um método para titulação de proteínas, cujas principais modificações em relação ao método clássico, são a eliminação da titulação em branco e um tratamento matemático simples, que permite através da linearização da curva de titulação potenciométrica, obter-se, ao mesmo tempo, a estequiometria e a constante de dissociação de cada grupo titulável. Naquele trabalho a solução de proteína é tratada simplesmente como uma mistura de ácidos fracos monopróticos e não são considerados os efeitos das interações eletrostáticas. Quando usado na titulação da ovoalbumina (9) em força iônica 0,10 M, os resultados mais significativos obtidos por aquele método, foram a caracterização de dois tipos de grupos carboxílicos e a indicação de que nem todos os grupos amino, presentes na molécula da proteína, são acessíveis a titulação.

Neste trabalho são apresentados e discutidos os resultados da aplicação do método da linearização na titulação das proteínas, lisozima; β -lactoglobulina e imunoglobulina humana em força iônica 0,10 M, 1,0 M e desnaturadas com uréia e cloridrato de guanidina. A lisozima foi escolhida em função do grande número de trabalhos até agora a ela dedicados e das dificuldades encontradas quando a curva de titulação desta proteína, foi analisada usando o modelo de Lindstrom-Lang. Isto nos permitiu fazer uma discussão mais fundamentada dos resultados obtidos, e a titulação desta proteína, se constituiu num verdadeiro teste para o método da linearização. A β -lactoglobulina apresenta a característica de mudar de conformação

durante a titulação, estando esta variação de conformação associada a titulação de grupos carboxílicos anômalos. Portanto, um sistema diferente da lisozima onde o método pôde ser aplicado. É também importante porque outras proteínas podem apresentar um comportamento semelhante a este. A titulação da imnoglobulina foi um desafio ao método, devido a complexidade desta proteína e a pequena quantidade disponível, mas serviu para mostrar que este método pode ser útil na elucidação da estrutura e propriedades destas proteínas, de importância fundamental na imunologia moderna.

Os resultados aqui obtidos, mostram que o método da linearização da curva de titulação potenciométrica, funciona muito bem na titulação de proteínas. A titulação da lisozima em uréia vem indicar que o método funciona na região alcalina tão bem quanto na região ácida. Portanto, o número de grupos amino obtidos na titulação em força iônica 0,10 M, inferior ao indicado pela sequência de aminoácidos, se constitui numa informação a mais sobre a estrutura da proteína, do que, como se pensou, numa deficiência do método.

Uma perspectiva nova que se abre neste trabalho, é a titulação de proteínas em soluções concentradas de uréia. Somente neste meio os resultados da estequiometria da lisozima, foram concordantes com o número de grupos indicados pela sequência de aminoácidos. Portanto, se este comportamento for comprovado com outras proteínas, este método poderá se constituir num método analítico útil, na análise de aminoácidos e sequenciação de proteínas.

I - P A R T E E X P E R I M E N T A L

1.1 - APARELHAGEM E REAGENTES

As medidas de fem foram feitas com precisão de 0,1 mV e as de pH com precisão de 0,001 unidades, usando um pHmetro Orion modelo 701 A. Foi usado um eletrodo de vidro Metrohm EA 109 e um eletrodo de referência de dupla junção Orion número 90-20 . A parte externa do eletrodo de referência foi cheia com solução saturada de cloreto de potássio, exceto no caso da titulação em cloridrato de guanidina , quando foi cheia com solução 6 M de nitrato de sódio.

Os volumes de titulante foram medidos com precisão de 5 microlitros, usando uma microbureta Metrohm E 457.

As soluções padrões de hidróxido de sódio, livre de carbonato, foram preparadas com água bidestilada e fervida, de acordo com a literatura (10). Foram guardadas em frascos de polietileno equipados com sifão e protegidos com tubo contendo "ascarite". Foram preparadas soluções de hidróxido de sódio 0,10 e 1,0 M em cloreto de potássio e 6,0 M em nitrato de sódio, para as titulações em força iônica 0,10 M, 1,0 M e em cloridrato de guanidina respectivamente.

As soluções de proteínas foram preparadas a partir dos seguintes produtos comerciais:

Lisozima da clara do ovo, da Aldrich - Europe nº 85387-9 lote 070957.

β -Lactoglobulina (contendo A e B) do leite bovino, Sigma

nº I-0130, lote 119 C - 8020.

A imunoglobulina G1 (IgG1) humana aqui estudada, é uma proteína M do soro do paciente JJO, isolada e purificada pela equipe do professor Dr. Benedito Oliveira (Laboratório de Imunologia Química, Instituto de Biologia, UNICAMP). Foi identificada como uma proteína melomatososa do tipo antigênico IgG1 constituída de cadeia leve do isotipo λ .

Foram usados cloridrato de guanidina ultra puro, da Mann Research Laboratories, e uréia p.a. da Merck.

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e fervida.

1.2 - MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO HIDROGENIÔNICA

1.2.1 - Em força iônica 0,10 M

Antes de cada titulação os eletrodos foram calibrados com padrões NBS a pH 4,008; 6,865 e 9,180. Para transformar as atividades de H^+ e OH^- em concentração, usamos os coeficientes de atividade calculados pela equação expandida de Debye Huckel. Assumimos que os coeficientes de atividade dos ions H^+ e OH^- usados em nosso cálculo, não são afetados pela presença da proteína, e que a mesma não contribui significativamente para a força iônica da solução.

1.2.2 - Em força iônica 1,0 M

Calibrando-se os eletrodos com uma solução de concentração conhecida e mantendo-se os coeficientes de atividade constantes (isto pode ser feito mantendo a força iônica constante) o potencial medido pode ser representado pelas equações a 25°C (11) :

$$E = E'_{0a} + 59,16 \log [H^+] + E_j \quad (2)$$

$$E = E'_{0b} - 59,16 \log [OH^-] + E_j \quad (3)$$

O potencial de junção, E_j é dado pela equação :

$$E_j = j_H [H^+] + j_{OH} [OH^-] \quad (4)$$

onde j_H e j_{OH} são constantes características do meio iônico.

O produto iônico da água pode ser determinado como (11):

$$- \log K_w = (E'_{0a} - E'_{0b})/59,16 \quad (5)$$

Pehrsson e outros (12) indicam a titulação de uma quantidade conhecida de ácido forte com base forte, como um dos melhores métodos de determinação de E'_0 , j_H e j_{OH} . Para pontos antes do ponto de equivalência, o gráfico $E - 59,16 \log[H^+]$ versus $[H^+]$ dá j_H como inclinação e E'_{0a} como interseção com o eixo dos y (13). De maneira semelhante, pode-se determinar j_{OH} e E'_{0b} para pontos após o ponto de equivalência.

Para determinação de E'_{0a} , E'_{0b} , j_H e j_{OH} , titulamos potenciometricamente uma quantidade conhecida de HCl, em solução 1,0 M de KCl, com solução padrão de NaOH. O ponto de equivalência da titulação foi determinado pelo gráfico $(V_0 + V) \times 10^{E/59,16}$ versus V (14), onde V_0 é o volume inicial, V o volume de titulante adicionado e E o potencial medido. As concen- trações de H^+ antes do ponto de equivalência e OH^- depois do ponto de equivalência foram calculadas como:

$$[H^+] = (V_e - V) C_B / (V_0 + V) \quad (6)$$

TABELA 01

Dados referentes a determinação de j_H e E_{0a} em força iônica 1,0 M em KCl.

E/mV	$[H^+]/M$	$E - 59,16 \log [H^+]$
285,9	$7,514 \cdot 10^{-3}$	411,6
277,7	$5,452 \cdot 10^{-3}$	411,6
266,0	$3,456 \cdot 10^{-3}$	411,6
258,4	$2,579 \cdot 10^{-3}$	411,5
244,9	$1,523 \cdot 10^{-3}$	411,6

TABELA 02

Dados referentes a determinação de j_{OH} e E_{0b} em força iônica 1,0 M em KCl.

E/mV	$[OH^-]/M$	$E + 59,16 \log [OH^-]$
-261,1	$3,932 \cdot 10^{-3}$	-403,4
-258,7	$3,584 \cdot 10^{-3}$	-403,4
-255,9	$3,233 \cdot 10^{-3}$	-403,2
-253,0	$2,898 \cdot 10^{-3}$	-403,1
-249,3	$2,526 \cdot 10^{-3}$	-402,9

$$[\text{OH}^-] = (V - V_e) C_B / (V_o + V) \quad (7)$$

onde V_e é o volume no ponto de equivalência e C_B a concentração da base.

Operando os dados da tabela 01 e 02 pelo método dos mínimos quadrados, com uma calculadora de bolso obtém-se :

$$E_o' = 411,6 \text{ mV}; j_H = 0; E_{ob}' = -402,0 \text{ mV} \text{ e } j_{OH} = -372,3 \text{ mV/M.}$$

Usando a equação (5) e os valores de E_o' e E_{ob}' obtivemos $pK_w = 13,76 \pm 0,01$ (média de três determinações). O valor indicado na literatura para força iônica 1,0 M é $13,79 \pm 0,02$ (15)

Na titulação das proteínas em força iônica 1,0 M, a concentração hidrogeniônica foi calculada usando a equação :

$$E = E_o' + 59,16 \log [H^+] - 372,3 [OH^-] \quad (8)$$

para E em milivolt e concentração em moles por litro. Para o eletrodo de vidro usado E_o' foi o mesmo na região ácido e alcalina. Antes de cada titulação é determinado o E_o' da maneira acima descrita.

1.2.3 - Em solução concentrada de uréia

Para determinação de E_o' , E_{ob}' , j_H e j_{OH} neste meio, adicionamos a uma solução 10 M de uréia, uma quantidade conhecida de HCl. A mistura foi feita 0,10 M em KCl e titulada potenciometricamente com solução padrão de NaOH. Após a adição do HCl a solução de uréia torna-se 9,3 M. O método usado no cálculo de E_o' , E_{ob}' , j_H , j_{OH} e pK_w foi o mesmo descrito para força iônica 1,0 M. Para os pontos após o ponto de equivalência não levamos em consideração a fração de OH^- devido a uréia, pois esta é uma base muito fraca com um $pK = 13,82$ (16).

Usando os dados da tabela 03 e 04, os seguintes valores

TABELA 03

Dados referentes a determinação de j_H e E_{0a}' em solução de uréia 9,3 M e 0,10 M em KCl.

E/mV	$[H^+]/M$	$E - 59,16 \log[H^+]$
186,6	$5,680 \cdot 10^{-3}$	319,5
184,9	$5,305 \cdot 10^{-3}$	319,5
183,1	$4,912 \cdot 10^{-3}$	319,7
181,1	$4,522 \cdot 10^{-3}$	319,8
178,9	$4,134 \cdot 10^{-3}$	319,9
176,5	$3,749 \cdot 10^{-3}$	320,0
173,8	$3,367 \cdot 10^{-3}$	320,1
170,8	$2,986 \cdot 10^{-3}$	320,2

TABELA 04

Dados referentes a determinação de j_{OH} e E_{0b}' em solução de uréia 9,3 M e 0,10 M em KCl.

E/mV	$[OH^-]/M$	$E + 59,16 \log[OH^-]$
-296,4	$2,513 \cdot 10^{-3}$	-450,2
-299,6	$2,855 \cdot 10^{-3}$	-450,1
-302,4	$3,195 \cdot 10^{-3}$	-450,0
-304,8	$3,533 \cdot 10^{-3}$	-449,9
-307,1	$3,869 \cdot 10^{-3}$	-449,8
-309,1	$4,202 \cdot 10^{-3}$	-449,7

foram obtidos, pelo método dos mínimos quadrados, para solução de uréia 9,3 M e 0,10 M em KCl : $E_{0a} = 321,0$ mV; $j_H = -274,6$ mV/M; $E_{0b} = -450,9$ mV; $j_{OH} = 296,0$ mV/M e $pKW = 13,048$.

Na titulação das proteínas em uréia 9,3 M e 0,10 M em KCl, a concentração hidrogeniônica foi calculada usando a equação :

$$E = E_0' + 59,16 \log[H^+] - 274,6[H^+] + 296,0[OH^-] \quad (9)$$

para E em milivolt e concentração em moles por litro. E_0' foi determinado como descrito, antes de cada titulação.

1.2.4 - Em solução concentrada de cloridrato de guanidina

O cloridrato de guanidina ($GuHCl$) é um eletrólito, e o íon guanidônio (GuH^+) um ácido de constante de dissociação 13,74 a 25 °C (17). Neste caso temos de levar em consideração o fato do GuH^+ poder ser convertido na base livre, guanidina (Gu), com remoção de íons OH^- da solução. Portanto, a concentração dos íons OH^- não pode ser calculada diretamente do excesso de base adicionado. A concentração dos íons OH^- , agora passa a ser:

$$[OH^-] = (V - V_e) C_B / (V_0 + V) - [Gu] \quad (10)$$

Em virtude da dificuldade de se determinar a concentração de guanidina livre, tivemos que pensar numa outra solução.

Como já nos referimos anteriormente, às soluções de NaOH foram adicionados KCl, a fim de manter a força iônica constante durante a titulação. No entanto, na solução de NaOH destinada a titular proteínas em $GuHCl$, a força iônica foi ajustada com nitrato de sódio, ao invés do $GuHCl$, em face deste reagente decompor rapidamente em meio alcalino (17). Devido a isto e ao fato de termos verificado que soluções 6 M de $GuHCl$

TABELA 05

Dados referentes a determinação de j_H e E'_{oa} em solução de nitrato de sódio 5,6 M.

E/mV	H /M	E - 59,16 log H
337,9	$7,733 \cdot 10^{-3}$	462,8
331,4	$6,012 \cdot 10^{-3}$	462,8
327,5	$5,166 \cdot 10^{-3}$	462,8
323,1	$4,346 \cdot 10^{-3}$	462,8
317,7	$3,532 \cdot 10^{-3}$	462,8
311,2	$2,731 \cdot 10^{-3}$	462,8

TABELA 06

Dados referentes a determinação de j_{OH} e E'_{ob} em solução de nitrato de sódio 5,6 M.

E/mV	OH /M	E - 59,16 log OH
-227,0	$1,823 \cdot 10^{-3}$	-389,1
-230,9	$2,112 \cdot 10^{-3}$	-389,2
-234,5	$2,400 \cdot 10^{-3}$	-389,5
-237,5	$2,685 \cdot 10^{-3}$	-389,6
-240,2	$2,969 \cdot 10^{-3}$	-389,7

e 6 M de NaNO_3 apresentam o mesmo valor de j_H , decidimos usar para solução de cloridrato de guanidina, os valores dos parâmetros E'_0 , j_H , j_{OH} e pK_w determinados em solução de nitrato de sódio de mesma concentração.

Subramanion e outros (18) estudando os efeitos do cloridrato de guanidina sobre a água, têm concluído que este sal comporta-se como um sal normal. Dados de ressonância de transferência de próton têm mostrado que GuHCl tem um comportamento semelhante ao NaCl .

Usando os dados da tabela 05 e 06, os seguintes resultados foram obtidos, pelo método dos mínimos quadrados, para solução de nitrato de sódio 5,6 M : $E'_{0a} = 462,8 \text{ mV}$; $j_H = 0$; $E'_{0b} = -388,1 \text{ mV}$; $j_{OH} = -558,7 \text{ mV/M}$ e $pK_w = 14,383$.

Na titulação das proteínas em cloridrato de guanidina 5,6 M, a concentração hidrogeniônica foi calculada usando a equação :

$$E = E'_0 + 59,16 \log[H^+] - 558,7 [OH^-] \quad (11)$$

para E em milivolt e concentração em moles por litro. E'_0 foi determinado antes de cada titulação.

1.3 - PUREZA DA URÉIA E DO CLORIDRATO DE GUANIDINA

A determinação dos parâmetros acima citados, para soluções concentradas de uréia e de cloridrato de guanidina, tem como finalidade permitir usar estas soluções como meio titulante para proteínas. Contudo, torna-se ainda importante verificar a existência de impurezas tituláveis naqueles meios. Para isto, aplicamos o método da linearização da curva de titulação, aos dados da titulação do HCl em uréia 9,3 M e 0,10 M em KCl , e aos dados da titulação do HCl em cloridrato de gua-

midina 5,6 M, com solução padrão de NaOH.

Os resultados para uréia indicam a presença de uma impureza com pK_a 7,49 e na concentração de $2,805 \cdot 10^{-4}$ M.

Levy (19) mesmo após recristalização da uréia em álcool 60%, detectou a presença de impureza básica na concentração de 0,0001 equivalente de impureza por mol de uréia. Portanto, achamos que seria inútil tentar purificar a uréia. Devido a isto, nas titulações das proteínas em uréia, foi feita uma correção no cálculo do número de moles dos grupos amino, equivalente a quantidade de impureza presente.

No caso do cloridrato de guanidina detectamos a presença de impurezas com pK_a 4,02; 5,58; 9,02 e nas seguintes concentrações $1,749 \cdot 10^{-4}$ M; $2,046 \cdot 10^{-4}$ M e $1,749 \cdot 10^{-4}$ M.

O cloridrato de guanidina geralmente vem acompanhado de melamina (2,4,6-triamino-s-triazina), amelina (2,4-diamino-6-hidroxi-s-triazina) e amelida (2-amino-4,6-dihidroxi-s-triazina) produzidos durante o procedimento de obtenção da guanidina (20).

As constantes de dissociação para derivados da s-triazina foram determinadas espectrofotometricamente por Hirt e Schmitt (21). Os seguintes valores foram obtidos: para melamina $pK_1 \approx 0$; $pK_2 = 5,1$, para amelina $pK_1 = 4,5$; $pK_2 = 9,4$ e para amelida $pK_1 = 1,8$; $pK_2 = 6,9$ e $pK_3 \approx 13,5$.

Comparando os valores das constantes de dissociação obtidos por Hirt e Schmitt (21) com os aqui determinados, podemos concluir que uma das impurezas presente no cloridrato de guanidina utilizado é a amelina e a outra provavelmente a melamina. Nas titulações das proteínas em cloridrato de guanidina, foi feita uma correção no cálculo do número de moles dos grupos carboxílicos e amino, referente as quantidades de impurezas tituláveis naquelas regiões.

É importante observar que o método da linearização da

curva de titulação, aqui utilizado, pode se constituir num método bastante simples e de interesse na determinação de impurezas presentes nos sais de guanidônio, devido a importância destes sais como desnaturantes para proteínas.

1.4 - PROCEDIMENTO

Uma quantidade conhecida de proteína, dissolvida, conforme o caso, em água, em solução 10 M de uréia ou em solução 6M de cloridrato de guanidina, mais excesso de ácido forte é titulada num frasco fechado. Durante a titulação é borbulhado, acima da solução, N_2 livre de CO_2 . A força iônica é ajustada para 0,10 ou 1,0 M com KCl e no caso do cloridrato de guanidina para 6 M com $NaNO_3$. A temperatura da solução é mantida em $25 \pm 0,1^\circ C$ pela circulação de água na parte externa do frasco de titulação. O titulante é adicionado de uma micro bureta e após cada adição é medido o pH ou fem.

II - MÉTODO DE CÁLCULO

Neste trabalho utilizamos o mesmo método de cálculo descrito por Godinho e Aleixo (9), na linearização da curva da titulação potenciométrica da ovoalbumina. A solução de proteína mais excesso de ácido forte é tratada simplesmente como uma mistura de ácidos monopróticos, um ácido forte e vários ácidos fracos.

As seguintes equações foram obtidas, como descrito em (22) :

Para F_{HCl} :

$$\begin{aligned}
 V_{HCl} C_B - V C_B &= ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) - (V_{HA1} - V_{HCl}) \cdot \\
 &C_B K_{HA1} / ([H^+] + K_{HA1}) - (V_{HA2} - V_{HA1}) C_B K_{HA2} / ([H^+] + K_{HA2}) \\
 &- (V_{HA3} - V_{HA2}) C_B K_{HA3} / ([H^+] + K_{HA3}) - (V_{HA4} - V_{HA3}) K_{HA4} \cdot \\
 &C_B / ([H^+] + K_{HA4}) - (V_{HA5} - V_{HA4}) C_B K_{HA5} / ([H^+] + K_{HA5}) \quad (12)
 \end{aligned}$$

ou

$$V_{HCl} C_B - V C_B = F_{HCl} \quad (13)$$

Para F_{HA1} :

$$\begin{aligned}
 V_{HA1} K_{HA1} - V K_{HA1} &= ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) ([H^+] + K_{HA1}) / C_B \\
 &+ (V - V_{HCl}) [H^+] - (V_{HA2} - V_{HA1}) ([H^+] + K_{HA1}) K_{HA2} / ([H^+] + \\
 &K_{HA2}) - (V_{HA3} - V_{HA2}) ([H^+] + K_{HA1}) K_{HA3} / ([H^+] + K_{HA3}) - \\
 &(V_{HA4} - V_{HA3}) ([H^+] + K_{HA1}) K_{HA4} / ([H^+] + K_{HA4}) - (V_{HA5} - \\
 &V_{HA4}) ([H^+] + K_{HA1}) K_{HA5} / ([H^+] + K_{HA5})
 \end{aligned} \quad (14)$$

ou

$$V_{HA1} K_{HA1} - V K_{HA1} = F_{HA1} \quad (15)$$

Para F_{HA2} :

$$\begin{aligned}
 V_{HA2} K_{HA2} - V K_{HA2} &= ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) ([H^+] + K_{HA2}) / C_B \\
 &+ (V - V_{HA1}) [H^+] - (V_{HA3} - V_{HA2}) ([H^+] + K_{HA2}) K_{HA3} / ([H^+] \\
 &+ K_{HA3}) - (V_{HA4} - V_{HA3}) ([H^+] + K_{HA2}) K_{HA4} / ([H^+] + K_{HA4}) - \\
 &(V_{HA5} - V_{HA4}) ([H^+] + K_{HA2}) K_{HA5} / ([H^+] + K_{HA5})
 \end{aligned} \quad (16)$$

ou

$$V_{HA2} K_{HA2} - V K_{HA2} = F_{HA2} \quad (17)$$

Para F_{HA^+3} :

$$V_{HA^+3} K_{HA^+3} - V K_{HA^+3} = ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) ([H^+] + K_{HA^+3}) / C_B \\ + (V - V_{HA^+2}) [H^+] - (V_{HA^+4} - V_{HA^+3}) ([H^+] + K_{HA^+3}) K_{HA^+4} / ([H^+] \\ + K_{HA^+4}) - (V_{HA^+5} - V_{HA^+4}) ([H^+] + K_{HA^+3}) K_{HA^+5} / ([H^+] + K_{HA^+5}) \quad (18)$$

ou

$$V_{HA^+3} K_{HA^+3} - V K_{HA^+3} = F_{HA^+3} \quad (19)$$

Para F_{HA^+4} :

$$V_{HA^+4} K_{HA^+4} - V K_{HA^+4} = ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) ([H^+] + K_{HA^+4}) / C_B \\ + (V - V_{HA^+3}) [H^+] - (V_{HA^+5} - V_{HA^+4}) ([H^+] + K_{HA^+4}) K_{HA^+5} / ([H^+] \\ + K_{HA^+5}) \quad (20)$$

ou

$$V_{HA^+4} K_{HA^+4} - V K_{HA^+4} = F_{HA^+4} \quad (21)$$

Para F_{HA^+5} :

$$V_{HA^+5} K_{HA^+5} - V K_{HA^+5} = ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) ([H^+] + K_{HA^+5}) / C_B \\ + (V - V_{HA^+4}) [H^+] \quad (22)$$

ou

$$V_{HA^+5} K_{HA^+5} - V K_{HA^+5} = F_{HA^+5} \quad (23)$$

onde, F_{HCl} refere-se a titulação do excesso de ácido forte, F_{HA1} e F_{HA2} aos dois tipos de grupos carboxílicos, F_{HA^+3} e F_{HA^+4} as formas protonadas do imidazol e dos grupos amino. F_{HA^+5} foi colocado para o caso de ser titulado mais um outro grupo, tal como α -amino ou fenólico.

K_{HA1} , K_{HA2} , K_{HA^+3} , K_{HA^+4} e K_{HA^+5} são as constantes de dissociação dos ácidos correspondentes. V_0 o volume inicial da solução a ser titulada, V o volume de NaOH adicionado e C_B a concentração da base.

V_{HCl} , V_{HA1} , V_{HA2} , V_{HA^+3} , V_{HA^+4} e V_{HA^+5} são os volumes de titulante no ponto de equivalência do excesso de ácido forte e dos ácidos $HA1$, $HA2$, HA^+3 , HA^+4 e HA^+5 respectivamente.

De acordo com as equações 13, 15, 17, 19, 21 e 23, os gráficos de F_{HCl} , F_{HA1} , F_{HA2} , F_{HA^+3} , F_{HA^+4} e F_{HA^+5} em função de V são linhas retas com inclinação $-C_B$, $-K_{HA1}$, $-K_{HA2}$, $-K_{HA^+3}$, $-K_{HA^+4}$ e $-K_{HA^+5}$, e interceptam o eixo dos x em V_{HCl} , V_{HA1} , V_{HA2} , V_{HA^+3} , V_{HA^+4} e V_{HA^+5} respectivamente.

O programa de computador PROTE (22) foi modificado para poder resolver uma mistura de um ácido forte mais até cinco ácidos fracos. Com o método de cálculo usado neste programa é possível separar ácidos com diferença de pK_a superior a 0,5. Neste programa, o sistema de equações acima, é ajustado utilizando a técnica das aproximações sucessivas, até que a diferença entre os valores dos parâmetros V_{HAN} , K_{HAN} e V_{HCl} calculados nas interações m e $m+1$, seja menor ou igual a 1.10^{-5} .

Os dados fornecidos para processar os cálculos são V_0 , C_B , $V(N)$, $pH(N)$ (onde N é o número de dados) e os valores aproximados para K_{HAN} , atribuídos levando-se em consideração a natureza química do grupo que está sendo titulado. Para a titulação em força iônica 1,0 M, em uréia ou em cloridrato de

guanidina é fornecido ao invés de pH, E e ainda os valores de E_0 , j_H , j_{OH} e K_w . A atribuição do valor zero a K_{HAN-1} , significa para o programa que não existem os ácidos $HAN-1$ e HAN . Por exemplo, se é dado valor zero a K_{HA4} , os cálculos serão efetuados considerando uma mistura de um ácido forte e três ácidos fracos. Se K_{HA1} é igual a zero, o programa é processado considerando apenas a titulação de um ácido forte. Isto tornou o programa mais versátil, de modo que ele pode ser usado na titulação de apenas um ácido forte ou mistura de um ácido forte mais até cinco ácidos fracos.

Antes de iniciar o processo interativo, para resolver o sistema de equações, o programa calcula valores aproximados para V_{HAN} e V_{HCl} da seguinte maneira: Para obter V_{HCl} , F_{HCl} é calculado para os três primeiros pontos da titulação, usando somente o primeiro termo da equação 12. Pelo método dos mínimos quadrados é calculado V_{HCl} para a reta descrita por estes pontos. Para os primeiros pontos da titulação, onde $V > V_{HCl}$, é calculado F_{HA1} usando o primeiro termo da equação 14. Pelo método dos mínimos quadrados é calculado V_{HA1} e K_{HA1} para a reta descrita por aqueles pontos. De maneira semelhante é calculado V_{HA2} , K_{HA2} , V_{HA3} , K_{HA3} , V_{HA4} , K_{HA4} e V_{HA5} , K_{HA5} . Estes primeiros valores de V_{HAN} , K_{HAN} e V_{HCl} são utilizados para calcular valores mais refinados de F_{HCl} , usando a equação 12 na região da curva entre $0 < V < V_{HCl}$. Para este novo conjunto de valores de F_{HCl} é calculado pelo método dos mínimos quadrados, um valor mais refinado de V_{HCl} . Na região da curva entre $V_{HCl} < V < V_{HA1}$, são calculados valores mais refinados de F_{HA1} , usando o novo valor de V_{HCl} , os valores aproximados dos outros parâmetros e a equação 14. Com os novos valores de F_{HA1} são calculados valores mais refinados de V_{HA1} e K_{HA1} , e assim são determinados valores mais refinados para todos os V_{HAN} , K_{HAN} . Este processo interativo se repete até que a condição acima citada seja satisfeita.

Como resultado, o programa fornece os valores de F_{HAN} , V_{HAN} e K_{HAN} . Os pontos, dentro do intervalo de titulação de cada grupo, são escolhidos de modo que seja obtida a melhor reta correspondente a F_{HAN} .

Na listagem dos resultados, F_{HAN} aparece como FG refinada (função de Gran refinada) e FG ajustada refere-se aos valores das funções F_{HAN} , ajustados pelos mínimos quadrados.

É importante observar que os volumes de equivalência para HCl, HA1, HA2, HA⁺3, HA⁺4 e HA⁺5 são V_{HCl} , $V_{HA1} - V_{HCl}$, $V_{HA2} - V_{HA1}$, $V_{HA3} - V_{HA2}$, $V_{HA4} - V_{HA3}$ e $V_{HA5} - V_{HA4}$ respectivamente.

A função F_{SB} que aparece nas curvas de titulação linearizadas, corresponde a aplicação do método de Gran (23) (gráfico de $(V_0 + V) \cdot 10^{-pOH}$ versus V) ao excesso de base. É um método independente de determinação do ponto final da titulação da proteína. Para ácidos muito fracos, a reta torna-se ligeiramente curva, na região próxima ao ponto de equivalência. Rossotti e Rossotti (14) mostram que neste caso, o ponto de equivalência pode ser obtido pela extrapolação da região linear.

III - TITULAÇÃO DA LISOZIMA

3.1 - TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA LISOZIMA NATIVA

Fazendo o estudo da curva de titulação potenciométrica, da lisozima em força iônica 0,15 M, Tanford e Wagner (4) não puderam determinar o pK_a dos grupos carboxílicos, pois a equação de Lindstrom-Lang (3), neste caso, fornece valor muito elevado para o coeficiente de interação eletrostática, w , naquela região. Devido a isto, eles fazem referência a presença de anormalidades na região dos carboxílicos e sugerem a existência de dois tipos de grupos carboxílicos, como uma possível explicação da referida anormalidade. Indicam também, a possibilidade da ligação íon cloreto-lisozima, ser considerável na região ácido e não ter sido corretamente medida. Portanto, acham eles, que para o cálculo das constantes, a carga a cada pH, deve ser determinada mais exatamente.

Beichok e Warner (6), utilizando os dados da titulação de Tanford e Wagner (4) e o coeficiente de interação eletrostática, calculado a partir de medidas eletroforéticas, chegaram a conclusão da existência de metade dos grupos carboxílicos com pK_a igual a 3,53 e outra metade com pK_a 5,08.

Os dados da titulação da lisozima (27), em cloridrato de guanidina 8 M, têm indicado a presença de três grupos carboxílicos a mais, neste meio, em relação aos nove obtidos em solução 0,15 M de KCl. Denovan e outros (27), acham que isto pode ser uma indicação, da existência de grupos tituláveis com pK_a muito baixo, na proteína nativa.

Os resultados de Roxby e Tanford (28), para a titulação da lisozima em cloridrato de guanidina 6 M, indicam um total de dez grupos carboxílicos titulados.

Aune e Tanford (29) através do estudo da desnaturação da lisozima a 25°C, como função da concentração de cloridrato de guanidina e do pH, no intervalo de pH 1 - 4, têm mostrado que a diferença entre o número de prótons ligados, no estado desnaturado e nativo é aproximadamente dois. Eles acham possível que estes grupos sejam carboxílicos, que tinham pKa anormalmente baixo (~1,92) no estado nativo. Comparando estes resultados com os anteriormente obtidos a pH 5,5 (30), eles verificaram que era necessário se considerar mais um grupo ácido, na proteína nativa, como sendo anormal.

Resultados comparáveis aos de Aune e Tanford, foram obtidos por Sophianopoulos e Weiss (31), no estudo da desnaturação térmica da lisozima em força iônica 0,15 M, em função do pH. Os resultados deles, indicam que o processo de desnaturação está associado a três grupos carboxílicos, com pKa no intervalo de 1,4-1,8 na molécula nativa e este valor é aumentado para 3,4 na forma desnaturada.

Um método computacional foi desenvolvido, para calcular a curva de titulação de proteínas, usando a teoria de Tanford e Kirkwood (32). Quando aplicado a lisozima (33), em força iônica 0,10 e 1,0 M e a pH 2 e 6, indicou a presença de um grupo carboxílico com pKa muito baixo, na ordem de 1,2 - 1,7, como também um pKa 5,3 - 5,8 para o imidazol da histidina. Além disso, mostrou uma variação no pKa do grupo -COOH do resíduo aspártico, na ordem de 0,3 - 0,4 unidades, em função da posição deste na sequência de aminoácidos. Convém frisar que o modelo de Tanford e Kirkwood, funciona relativamente bem em relação a curva experimental da lisozima, somente se, um dos parâmetros da teoria assume um valor diferente do esperado, com base em estudos anteriores (33).

Achamos de interesse estudar a lisozima, usando o método da linearização da curva de titulação potenciométrica, em virtude das dificuldades encontradas, quando o modelo de Lindstrom-Lang foi usado na região ácida, da curva de titulação desta proteína.

Recentemente (9) foram caracterizados duas subclasses de grupos carboxílicos na ovoalbumina, com pK_a 3,48 e 5,15, valores muito próximos dos obtidos por Beichok e Werner (6) para a lisozima. Mesmo assim, para a ovoalbumina, considerando um só tipo de grupo carboxílico, a equação de Lindstrom-Lang funcionou bem (34). Por isso, parece que os problemas encontrados, no uso daquela equação para lisozima, não estão diretamente ligados a presença de duas subclasses de grupos carboxílicos, mas ao fato do comportamento da titulação da lisozima, deferir grandemente daquele previsto pela teoria de Lindstrom-Lang (33).

3.1.1 - Resultados e Discussão

As soluções de lisozima na concentração usada ($\sim 4 \cdot 10^{-4} M$), foram completamente transparentes em força iônica 0,10 M e ligeiramente turvas em força iônica 1,0 M. Em nenhum dos casos foi notado a presença de resíduo insolúvel. Para concentração de KCl superior a 1,0 M não foi possível dissolver a mesma quantidade de proteína correspondente a solução $\sim 4 \cdot 10^{-4} M$.

Nas tabelas 07 a 16 estão os dados da titulação da lisozima em força iônica 0,10 e 1,0 M, e os resultados obtidos da linearização da curva de titulação. Apesar dos valores de pH aparecerem nas tabelas como $-\log Q_{H^+}$ e $-\log [H^+]$ para força iônica 0,10 e 1,0 M respectivamente, pois assim o foram medidos, todos os cálculos são processados com $pH = -\log [H^+]$, portanto, as constantes obtidas referem-se a concentração.

TABELA 07

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de
solução contendo 0,14315 g de lisozima na presen-
ça de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. I=0,10 M

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.050	2.493	1.850	7.184
0.100	2.518	1.855	7.297
0.150	2.544	1.860	7.402
0.200	2.571	1.865	7.504
0.250	2.600	1.870	7.615
0.300	2.630	1.875	7.717
0.350	2.663	1.880	7.820
0.400	2.697	1.885	7.932
0.450	2.734	1.890	8.040
0.500	2.773	1.895	8.151
0.550	2.816	1.900	8.272
0.600	2.862	1.905	8.375
0.651	2.913	1.910	8.484
0.700	2.967	1.920	8.675
0.750	3.028	1.930	8.837
0.800	3.096	1.940	8.973
0.850	3.171	1.951	9.103
0.900	3.255	1.960	9.200
0.951	3.352	1.970	9.294
1.000	3.456	1.980	9.378
1.050	3.574	1.990	9.456
1.100	3.702	2.000	9.530
1.150	3.837	2.010	9.595
1.200	3.977	2.020	9.655
1.251	4.119	2.030	9.712
1.300	4.252	2.040	9.766
1.350	4.385	2.051	9.821
1.400	4.515	2.060	9.865
1.450	4.650	2.070	9.910
1.500	4.788	2.080	9.953
1.550	4.936	2.090	9.994
1.600	5.104	2.100	10.034
1.651	5.302	2.111	10.075
1.700	5.542	2.120	10.107
1.720	5.659	2.130	10.140
1.730	5.722	2.140	10.172
1.741	5.799	2.150	10.204
1.750	5.865	2.160	10.234
1.760	5.946	2.170	10.264
1.780	6.124	2.180	10.292
1.800	6.344	2.190	10.320
1.820	6.622	2.200	10.346
1.830	6.787	2.250	10.470
1.840	6.978	2.275	10.525
1.845	7.087	2.300	10.576

TABELA 08

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em força iônica 0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 07.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.493	1.139E-01	1.178E-01
0.100	2.518	1.075E-01	1.114E-01
0.150	2.544	1.011E-01	1.050E-01
0.200	2.571	9.485E-02	9.860E-02
0.250	2.600	8.850E-02	9.220E-02
0.300	2.630	8.233E-02	8.581E-02
0.350	2.663	7.596E-02	7.941E-02
0.400	2.697	6.983E-02	7.302E-02
0.450	2.734	6.362E-02	6.662E-02
0.500	2.773	5.756E-02	6.023E-02
0.550	2.816	5.139E-02	5.383E-02
0.600	2.862	4.533E-02	4.744E-02
0.651	2.913	3.919E-02	4.092E-02
0.700	2.967	3.329E-02	3.465E-02
0.750	3.028	2.725E-02	2.825E-02
0.800	3.096	2.118E-02	2.186E-02
0.850	3.171	1.516E-02	1.546E-02
0.900	3.255	9.090E-03	9.070E-03
0.951	3.352	2.755E-03	2.547E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA F/HCL = 0.971

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999956

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.000	3.456	6.800E-05	6.673E-05
1.050	3.574	5.829E-05	5.774E-05
1.100	3.702	4.837E-05	4.876E-05
1.150	3.837	3.869E-05	3.978E-05
1.200	3.977	2.939E-05	3.080E-05
1.251	4.119	2.070E-05	2.163E-05
1.300	4.252	1.306E-05	1.283E-05
1.350	4.385	5.630E-06	3.848E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.998626

VOLUME DE EQUIVALENCIA F/HA1 = 1.371

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.79654E-4

Continuação da TABELA 08

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.500	4.788	2.658E-06	2.919E-06
1.550	4.936	2.567E-06	2.466E-06
1.600	5.104	2.204E-06	2.012E-06
1.651	5.302	1.695E-06	1.549E-06
1.700	5.542	1.135E-06	1.105E-06
1.720	5.659	9.140E-07	9.232E-07
1.730	5.722	8.096E-07	8.325E-07
1.741	5.799	6.938E-07	7.327E-07
1.750	5.865	6.055E-07	6.511E-07
1.760	5.946	5.089E-07	5.603E-07
1.780	6.124	3.370E-07	3.789E-07
1.800	6.344	1.803E-07	1.974E-07
1.820	6.622	3.437E-08	1.595E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.992316

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.822

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 9.07290E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.850	7.184	2.145E-09	2.124E-09
1.853	7.297	1.936E-09	1.920E-09
1.860	7.462	1.724E-09	1.716E-09
1.865	7.581	1.518E-09	1.512E-09
1.870	7.615	1.278E-09	1.308E-09
1.875	7.717	1.078E-09	1.104E-09
1.880	7.820	8.537E-10	8.996E-10
1.885	7.932	6.770E-10	6.756E-10
1.890	8.040	4.918E-10	4.915E-10
1.895	8.151	3.077E-10	2.874E-10
1.900	8.272	1.075E-10	8.330E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999589

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.902

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 4.08172E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.930	8.837	4.452E-11	4.531E-11
1.940	8.973	4.397E-11	4.300E-11
1.951	9.103	4.158E-11	4.047E-11
1.960	9.200	3.896E-11	3.840E-11
1.970	9.294	3.612E-11	3.609E-11
1.980	9.378	3.352E-11	3.379E-11
1.990	9.456	3.091E-11	3.148E-11
2.000	9.530	2.825E-11	2.918E-11
2.010	9.595	2.605E-11	2.688E-11
2.020	9.655	2.400E-11	2.457E-11
2.030	9.712	2.198E-11	2.227E-11
2.040	9.766	2.003E-11	1.996E-11
2.051	9.821	1.803E-11	1.743E-11
2.060	9.865	1.636E-11	1.535E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997231

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.127

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 2.30411E-10

TABELA 09

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de
solução contendo 0,14316 g de lisozima na presen-
ça de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. $I=0,10$ M

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.050	2.449	1.760	5.540
0.100	2.471	1.780	5.665
0.150	2.494	1.800	5.808
0.200	2.519	1.820	5.971
0.251	2.545	1.830	6.065
0.300	2.571	1.835	6.117
0.350	2.599	1.840	6.168
0.400	2.629	1.845	6.223
0.450	2.661	1.850	6.283
0.500	2.695	1.855	6.343
0.550	2.732	1.860	6.408
0.600	2.771	1.866	6.491
0.650	2.813	1.870	6.549
0.700	2.859	1.875	6.625
0.750	2.909	1.880	6.711
0.800	2.963	1.885	6.800
0.850	3.023	1.890	6.892
0.900	3.090	1.895	6.989
0.951	3.167	1.900	7.100
1.000	3.249	1.905	7.196
1.050	3.345	1.910	7.295
1.104	3.460	1.915	7.397
1.150	3.572	1.920	7.488
1.200	3.704	1.925	7.582
1.250	3.847	1.930	7.676
1.300	3.994	1.935	7.769
1.320	4.053	1.940	7.865
1.340	4.113	1.945	7.965
1.360	4.171	1.950	8.062
1.380	4.229	1.960	8.257
1.400	4.287	1.970	8.385
1.425	4.358	1.980	8.553
1.450	4.429	1.990	8.697
1.475	4.500	2.001	8.853
1.500	4.571	2.020	9.056
1.525	4.642	2.040	9.238
1.551	4.718	2.060	9.388
1.575	4.791	2.080	9.517
1.600	4.870	2.100	9.633
1.625	4.951	2.120	9.731
1.650	5.039	2.140	9.825
1.675	5.133	2.160	9.910
1.700	5.236	2.200	10.061
1.720	5.328	2.300	10.357
1.740	5.429	2.400	10.579

TABELA 10

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em força iônica 0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 09.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.449	1.267E-01	1.318E-01
0.100	2.471	1.205E-01	1.255E-01
0.150	2.494	1.142E-01	1.191E-01
0.200	2.519	1.078E-01	1.127E-01
0.251	2.545	1.014E-01	1.061E-01
0.300	2.571	9.538E-02	9.987E-02
0.350	2.599	8.924E-02	9.348E-02
0.400	2.629	8.305E-02	8.708E-02
0.450	2.661	7.685E-02	8.069E-02
0.500	2.695	7.069E-02	7.429E-02
0.550	2.732	6.446E-02	6.790E-02
0.600	2.771	5.838E-02	6.150E-02
0.650	2.813	5.233E-02	5.511E-02
0.700	2.859	4.625E-02	4.871E-02
0.750	2.909	4.022E-02	4.232E-02
0.800	2.963	3.430E-02	3.592E-02
0.850	3.023	2.836E-02	2.953E-02
0.900	3.090	2.238E-02	2.313E-02
0.951	3.167	1.624E-02	1.661E-02
1.000	3.249	1.037E-02	1.034E-02
1.050	3.345	4.193E-03	3.947E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 1.081

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999957

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.150	3.572	5.528E-05	5.389E-05
1.200	3.704	4.537E-05	4.490E-05
1.250	3.847	3.531E-05	3.592E-05
1.300	3.994	2.593E-05	2.693E-05
1.320	4.053	2.238E-05	2.334E-05
1.340	4.113	1.884E-05	1.974E-05
1.360	4.171	1.555E-05	1.615E-05
1.380	4.229	1.232E-05	1.256E-05
1.400	4.287	9.123E-06	8.962E-06
1.425	4.358	5.276E-06	4.470E-06
1.450	4.429	1.443E-06	-2.264E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.998509

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.450

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.79700E-4

Continuação da TABELA 10

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.625	4.951	2.433E-06	2.501E-06
1.650	5.039	2.253E-06	2.240E-06
1.675	5.133	2.029E-06	1.979E-06
1.700	5.236	1.768E-06	1.717E-06
1.720	5.328	1.538E-06	1.508E-06
1.740	5.429	1.302E-06	1.299E-06
1.760	5.540	1.070E-06	1.090E-06
1.780	5.665	8.442E-07	8.815E-07
1.800	5.808	6.303E-07	6.725E-07
1.820	5.971	4.369E-07	4.636E-07
1.830	6.065	3.448E-07	3.591E-07
1.835	6.117	2.989E-07	3.069E-07
1.840	6.168	2.571E-07	2.546E-07
1.845	6.223	2.150E-07	2.024E-07
1.850	6.283	1.719E-07	1.502E-07
1.855	6.343	1.317E-07	9.791E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999114

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.864

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 1.04477E-5

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.915	7.397	2.264E-09	2.221E-09
1.920	7.488	1.975E-09	1.957E-09
1.925	7.582	1.681E-09	1.694E-09
1.930	7.676	1.401E-09	1.430E-09
1.935	7.769	1.140E-09	1.167E-09
1.940	7.865	8.818E-10	9.036E-10
1.945	7.965	6.221E-10	6.402E-10
1.950	8.062	3.804E-10	3.768E-10
1.960	8.257	-1.062E-10	-1.501E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999304

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.957

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 5.26850E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.990	8.697	7.492E-11	7.201E-11
2.001	8.853	6.926E-11	6.802E-11
2.020	9.056	6.120E-11	6.113E-11
2.040	9.238	5.162E-11	5.387E-11
2.060	9.388	4.377E-11	4.661E-11
2.080	9.517	3.704E-11	3.936E-11
2.100	9.633	3.088E-11	3.210E-11
2.120	9.731	2.595E-11	2.484E-11
2.140	9.825	2.088E-11	1.759E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.992932

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.188

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 3.62837E-10

TABELA 11

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de
solução contendo 0,14315 g de lisozima na presen-
ça de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. I=0,10 M

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.050	2.493	1.870	7.339
0.101	2.518	1.875	7.436
0.150	2.543	1.880	7.538
0.200	2.570	1.885	7.645
0.250	2.598	1.890	7.746
0.300	2.628	1.895	7.852
0.350	2.660	1.901	7.981
0.400	2.693	1.905	8.066
0.450	2.730	1.910	8.179
0.500	2.768	1.915	8.291
0.550	2.810	1.920	8.400
0.600	2.855	1.926	8.512
0.650	2.905	1.931	8.614
0.700	2.959	1.935	8.686
0.750	3.018	1.940	8.766
0.800	3.084	1.945	8.841
0.850	3.157	1.950	8.909
0.900	3.239	1.962	9.054
0.950	3.330	1.970	9.136
1.000	3.434	1.980	9.229
1.050	3.549	1.990	9.313
1.100	3.676	2.000	9.394
1.151	3.811	2.010	9.465
1.200	3.946	2.020	9.530
1.250	4.083	2.030	9.588
1.300	4.220	2.040	9.645
1.350	4.352	2.050	9.698
1.400	4.483	2.060	9.750
1.451	4.618	2.070	9.797
1.500	4.750	2.080	9.841
1.550	4.894	2.090	9.885
1.600	5.054	2.100	9.927
1.650	5.241	2.120	10.005
1.700	5.469	2.140	10.076
1.725	5.611	2.160	10.143
1.750	5.772	2.180	10.204
1.775	5.971	2.200	10.263
1.800	6.201	2.250	10.392
1.815	6.380	2.300	10.504
1.830	6.587	2.350	10.601
1.840	6.753	2.400	10.688
1.845	6.839	2.450	10.764
1.851	6.949	2.500	10.833
1.860	7.138	2.551	10.895
1.865	7.237	2.601	10.951

TABELA 12

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em força iônica 0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 11.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

VOLUME	PARA HCL		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.493	1.141E-01	1.197E-01
0.101	2.518	1.077E-01	1.132E-01
0.150	2.543	1.015E-01	1.069E-01
0.200	2.570	9.527E-02	1.005E-01
0.250	2.598	8.914E-02	9.411E-02
0.300	2.628	8.295E-02	8.772E-02
0.350	2.660	7.675E-02	8.132E-02
0.400	2.693	7.078E-02	7.493E-02
0.450	2.730	6.454E-02	6.853E-02
0.500	2.768	5.859E-02	6.214E-02
0.550	2.810	5.252E-02	5.574E-02
0.600	2.855	4.655E-02	4.935E-02
0.650	2.905	4.047E-02	4.295E-02
0.700	2.959	3.452E-02	3.656E-02
0.750	3.018	2.862E-02	3.016E-02
0.800	3.084	2.267E-02	2.377E-02
0.850	3.157	1.675E-02	1.737E-02
0.900	3.239	1.076E-02	1.098E-02
0.950	3.330	4.745E-03	4.581E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.986

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999959

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.000	3.434	6.624E-05	6.491E-05
1.050	3.549	5.796E-05	5.702E-05
1.100	3.676	4.891E-05	4.913E-05
1.151	3.811	4.010E-05	4.108E-05
1.200	3.946	3.183E-05	3.335E-05
1.250	4.083	2.412E-05	2.546E-05
1.300	4.220	1.684E-05	1.757E-05
1.350	4.352	1.022E-05	9.683E-06
1.400	4.483	3.779E-06	1.794E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.998327

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.411

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.57783E-4

Continuação da TABELA 12

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.550	4.894	2.217E-06	2.375E-06
1.600	5.054	2.051E-06	1.959E-06
1.650	5.241	1.670E-06	1.543E-06
1.700	5.469	1.184E-06	1.128E-06
1.725	5.611	9.218E-07	9.201E-07
1.750	5.772	6.792E-07	7.123E-07
1.775	5.971	4.486E-07	5.045E-07
1.800	6.201	2.605E-07	2.967E-07
1.815	6.380	1.523E-07	1.720E-07
1.830	6.587	5.334E-08	4.734E-08
1.840	6.753	-1.585E-08	-3.577E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.995467

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.836

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 8.31160E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.865	7.237	1.964E-09	1.984E-09
1.870	7.339	1.803E-09	1.795E-09
1.875	7.436	1.635E-09	1.606E-09
1.880	7.539	1.434E-09	1.417E-09
1.885	7.645	1.217E-09	1.227E-09
1.890	7.746	1.026E-09	1.038E-09
1.895	7.852	8.307E-10	8.493E-10
1.901	7.981	6.071E-10	6.224E-10
1.905	8.066	4.682E-10	4.711E-10
1.910	8.179	2.871E-10	2.821E-10
1.915	8.291	1.112E-10	9.298E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999635

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.917

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 3.78154E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.962	9.054	4.270E-11	4.205E-11
1.970	9.136	4.145E-11	4.055E-11
1.980	9.229	3.943E-11	3.869E-11
1.990	9.313	3.724E-11	3.680E-11
2.000	9.394	3.461E-11	3.493E-11
2.010	9.465	3.241E-11	3.305E-11
2.020	9.530	3.036E-11	3.118E-11
2.030	9.588	2.861E-11	2.930E-11
2.040	9.645	2.669E-11	2.743E-11
2.050	9.698	2.490E-11	2.556E-11
2.060	9.750	2.304E-11	2.368E-11
2.070	9.797	2.143E-11	2.181E-11
2.080	9.841	1.992E-11	1.993E-11

TABELA 13

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de
solução contendo 0,11298 g de lisozima na presen-
ça de HCl, com solução de NaOH 0,1203 M. I= 1,0 M

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	267.4	2.397	1.540	137.0	4.601
0.100	266.1	2.419	1.566	132.2	4.682
0.150	264.8	2.441	1.580	129.5	4.728
0.200	263.4	2.464	1.600	125.5	4.795
0.250	261.8	2.491	1.620	121.3	4.866
0.300	260.3	2.517	1.642	116.3	4.951
0.351	258.6	2.545	1.662	111.6	5.030
0.400	256.9	2.574	1.680	106.9	5.110
0.450	255.0	2.606	1.700	101.2	5.206
0.500	253.1	2.638	1.720	94.7	5.316
0.550	250.9	2.675	1.740	87.5	5.437
0.600	248.6	2.714	1.761	78.8	5.585
0.650	246.2	2.755	1.780	70.2	5.730
0.700	243.5	2.801	1.800	59.5	5.911
0.750	240.6	2.850	1.810	53.5	6.012
0.800	237.4	2.904	1.815	50.3	6.066
0.900	230.1	3.027	1.820	47.0	6.122
0.950	225.7	3.101	1.825	43.5	6.181
1.000	220.8	3.184	1.830	39.7	6.245
1.020	218.7	3.220	1.835	35.7	6.313
1.040	216.6	3.255	1.840	31.6	6.382
1.060	214.2	3.296	1.845	27.0	6.460
1.080	211.8	3.336	1.850	22.2	6.541
1.101	209.1	3.382	1.855	16.7	6.634
1.120	206.6	3.424	1.860	10.5	6.739
1.140	203.9	3.470	1.865	3.8	6.852
1.160	201.0	3.519	1.870	-3.3	6.972
1.180	198.1	3.568	1.875	-11.0	7.102
1.200	195.0	3.620	1.880	-19.4	7.244
1.220	191.8	3.674	1.885	-28.0	7.390
1.240	188.6	3.729	1.890	-36.4	7.532
1.261	185.1	3.788	1.895	-44.9	7.675
1.280	182.0	3.840	1.901	-53.9	7.828
1.300	178.6	3.898	1.910	-67.2	8.052
1.320	175.1	3.957	1.920	-78.8	8.248
1.340	171.7	4.014	1.930	-90.4	8.445
1.360	168.3	4.072	1.940	-98.0	8.573
1.380	164.9	4.129	1.952	-109.1	8.761
1.400	161.4	4.188	1.960	-116.4	8.884
1.420	158.0	4.246	1.970	-124.0	9.012
1.440	154.6	4.303	1.981	-131.3	9.136
1.465	150.3	4.376	1.990	-136.9	9.230
1.480	147.7	4.430	2.000	-142.0	9.322

Continuação da TABELA 13

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
2.030	-155.5	9.545	2.130	-183.7	10.021
2.040	-159.1	9.605	2.140	-185.8	10.056
2.050	-162.6	9.665	2.150	-187.8	10.090
2.060	-165.9	9.720	2.160	-189.8	10.123
2.070	-168.7	9.767	2.170	-191.6	10.154
2.080	-171.4	9.813	2.180	-193.3	10.182
2.090	-174.1	9.859	2.200	-196.7	10.240
2.100	-176.7	9.902	2.251	-204.5	10.371
2.110	-179.2	9.945	2.300	-210.7	10.475
2.120	-181.5	9.983	2.400	-221.1	10.649

TABELA 14

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em força iônica 1,0 M. Valores relativos aos dados da tabela 13.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.397	1.179E-01	1.221E-01
0.100	2.419	1.120E-01	1.161E-01
0.150	2.441	1.064E-01	1.100E-01
0.200	2.464	1.006E-01	1.040E-01
0.250	2.491	9.433E-02	9.801E-02
0.300	2.517	8.877E-02	9.199E-02
0.351	2.545	8.279E-02	8.586E-02
0.400	2.574	7.715E-02	7.996E-02
0.450	2.606	7.123E-02	7.395E-02
0.500	2.638	6.568E-02	6.793E-02
0.550	2.675	5.967E-02	6.192E-02
0.600	2.714	5.384E-02	5.590E-02
0.650	2.755	4.822E-02	4.989E-02
0.700	2.801	4.238E-02	4.387E-02
0.750	2.856	3.663E-02	3.766E-02
0.800	2.904	3.084E-02	3.184E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 1.065

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999989

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.120	3.424	7.222E-05	7.207E-05
1.140	3.470	6.676E-05	6.648E-05
1.160	3.519	6.086E-05	6.089E-05
1.180	3.568	5.538E-05	5.528E-05
1.200	3.620	4.953E-05	4.969E-05
1.220	3.674	4.372E-05	4.409E-05
1.240	3.729	3.821E-05	3.849E-05
1.261	3.788	3.230E-05	3.261E-05
1.280	3.840	2.734E-05	2.730E-05
1.300	3.898	2.193E-05	2.170E-05
1.320	3.957	1.645E-05	1.610E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999911

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.378

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 2.79852E-4

=====

Continuação da TABELA 14

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.580	4.728	3.934E-06	4.022E-06
1.600	4.795	3.669E-06	3.679E-06
1.620	4.866	3.370E-06	3.336E-06
1.642	4.951	3.002E-06	2.959E-06
1.662	5.030	2.670E-06	2.617E-06
1.680	5.110	2.346E-06	2.308E-06
1.700	5.206	1.981E-06	1.966E-06
1.720	5.316	1.605E-06	1.623E-06
1.740	5.437	1.248E-06	1.280E-06
1.761	5.585	8.867E-07	9.205E-07
1.780	5.730	5.957E-07	5.950E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999315

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.815

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 1.71343E-5

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.855	6.634	9.209E-09	9.016E-09
1.860	6.739	8.085E-09	7.930E-09
1.865	6.852	6.856E-09	6.845E-09
1.870	6.972	5.636E-09	5.759E-09
1.875	7.102	4.440E-09	4.673E-09
1.880	7.244	3.303E-09	3.588E-09
1.885	7.390	2.317E-09	2.502E-09
1.890	7.532	1.488E-09	1.416E-09
1.895	7.675	7.241E-10	3.306E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997143

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.897

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 2.17134E-7

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.981	9.136	5.460E-11	4.914E-11
1.990	9.230	4.717E-11	4.553E-11
2.000	9.323	4.057E-11	4.152E-11
2.010	9.404	3.533E-11	3.751E-11
2.020	9.477	3.091E-11	3.350E-11
2.030	9.545	2.688E-11	2.949E-11
2.040	9.605	2.340E-11	2.548E-11
2.050	9.665	1.993E-11	2.147E-11
2.060	9.720	1.665E-11	1.746E-11
2.070	9.767	1.402E-11	1.345E-11
2.080	9.813	1.138E-11	9.442E-12
2.090	9.859	8.608E-12	5.432E-12

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.984337

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.104

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 4.01015E-10

=====

TABELA 15

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,11298 g de lisozima na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1203 M. I= 1,0 M

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	269.8	2.397	1.560	136.3	4.653
0.100	268.5	2.419	1.580	132.5	4.717
0.150	267.1	2.442	1.600	128.6	4.783
0.250	264.2	2.491	1.620	124.4	4.854
0.300	262.7	2.517	1.640	120.0	4.929
0.350	261.0	2.545	1.660	115.3	5.008
0.400	259.3	2.574	1.681	110.0	5.098
0.450	257.4	2.606	1.700	104.8	5.186
0.500	255.4	2.640	1.720	98.4	5.294
0.551	253.2	2.677	1.740	91.5	5.410
0.600	251.0	2.714	1.760	83.6	5.544
0.650	248.6	2.755	1.780	74.7	5.694
0.700	245.9	2.801	1.801	63.9	5.877
0.750	243.0	2.850	1.805	61.5	5.918
0.800	239.9	2.902	1.810	58.6	5.967
0.851	236.3	2.963	1.815	55.6	6.017
0.905	232.1	3.034	1.820	52.5	6.070
1.000	223.4	3.181	1.825	49.2	6.125
1.020	221.2	3.218	1.830	45.8	6.183
1.050	218.0	3.272	1.835	42.1	6.245
1.060	216.8	3.292	1.840	38.2	6.311
1.080	214.4	3.333	1.845	34.0	6.382
1.100	211.9	3.375	1.850	29.6	6.457
1.120	209.2	3.421	1.855	24.7	6.540
1.140	206.5	3.467	1.860	19.5	6.627
1.160	203.6	3.516	1.880	-8.9	7.108
1.180	200.7	3.565	1.890	-26.6	7.407
1.200	197.6	3.617	1.900	-43.2	7.687
1.220	194.5	3.669	1.910	-58.2	7.941
1.245	190.5	3.737	1.920	-72.0	8.174
1.260	188.0	3.779	1.936	-92.0	8.512
1.280	184.7	3.835	1.945	-102.2	8.685
1.301	181.2	3.894	1.960	-112.8	8.864
1.321	177.7	3.953	1.971	-120.8	8.999
1.340	174.5	4.007	1.980	-126.9	9.102
1.360	171.1	4.065	1.990	-132.8	9.202
1.380	167.7	4.122	2.000	-138.1	9.291
1.400	164.3	4.180	2.010	-143.4	9.381
1.420	160.8	4.239	2.020	-147.9	9.457
1.440	157.5	4.295	2.030	-152.1	9.528
1.461	153.8	4.357	2.040	-156.0	9.594
1.480	150.6	4.411	2.050	-159.5	9.653
1.500	147.1	4.471	2.060	-162.8	9.708
1.520	143.5	4.531	2.070	-165.8	9.759
1.540	140.0	4.591	2.080	-168.6	9.806

Continuação da TABELA 15

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
2.090	-171.4	9.854	2.160	-186.7	10.112
2.100	-174.0	9.897	2.170	-188.6	10.144
2.110	-176.4	9.938	2.180	-190.4	10.174
2.120	-178.4	9.972	2.190	-192.1	10.203
2.130	-180.7	10.010	2.201	-194.0	10.235
2.140	-182.8	10.046	2.250	-201.5	10.361
2.150	-184.7	10.078	2.300	-208.0	10.470

TABELA 16

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em força iônica 1,0 M. Valores relativos aos dados da tabela 15.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.397	1.176E-01	1.207E-01
0.100	2.419	1.117E-01	1.146E-01
0.150	2.442	1.056E-01	1.086E-01
0.250	2.491	9.394E-02	9.659E-02
0.300	2.517	8.835E-02	9.058E-02
0.350	2.545	8.235E-02	8.456E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 1.053

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.99996

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.120	3.421	7.934E-05	7.855E-05
1.140	3.467	7.295E-05	7.233E-05
1.160	3.516	6.615E-05	6.612E-05
1.180	3.565	5.984E-05	5.990E-05
1.200	3.617	5.317E-05	5.369E-05
1.220	3.669	4.691E-05	4.747E-05
1.245	3.737	3.914E-05	3.970E-05
1.260	3.779	3.440E-05	3.504E-05
1.280	3.835	2.839E-05	2.883E-05
1.301	3.894	2.220E-05	2.230E-05
1.321	3.953	1.607E-05	1.609E-05
1.340	4.007	1.065E-05	1.018E-05
1.360	4.065	4.957E-06	3.969E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999736

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.373

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 3.10741E-4

Continuação da TABELA 16.

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.600	4.783	3.850E-06	3.883E-06
1.620	4.854	3.530E-06	3.525E-06
1.640	4.929	3.192E-06	3.167E-06
1.660	5.008	2.836E-06	2.810E-06
1.681	5.098	2.453E-06	2.434E-06
1.700	5.186	2.105E-06	2.094E-06
1.720	5.294	1.710E-06	1.737E-06
1.740	5.410	1.345E-06	1.379E-06
1.760	5.544	9.892E-07	1.021E-06
1.780	5.694	6.585E-07	6.635E-07
1.801	5.877	3.311E-07	2.880E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.99973

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.817

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 1.78835E-5

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.855	6.540	1.083E-08	1.086E-08
1.860	6.627	9.978E-09	9.677E-09
1.880	7.108	4.583E-09	4.963E-09
1.890	7.407	2.280E-09	2.606E-09
1.900	7.687	6.803E-10	2.490E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.996803

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.901

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 2.35696E-7

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.990	9.202	4.842E-11	4.492E-11
2.000	9.291	4.247E-11	4.109E-11
2.010	9.381	3.640E-11	3.727E-11
2.020	9.457	3.179E-11	3.344E-11
2.030	9.528	2.759E-11	2.961E-11
2.040	9.594	2.376E-11	2.578E-11
2.050	9.653	2.044E-11	2.196E-11
2.060	9.708	1.732E-11	1.813E-11
2.070	9.759	1.451E-11	1.430E-11
2.080	9.806	1.185E-11	1.047E-11
2.090	9.854	9.053E-12	6.647E-12

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.988893

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.107

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 3.82733E-10

=====

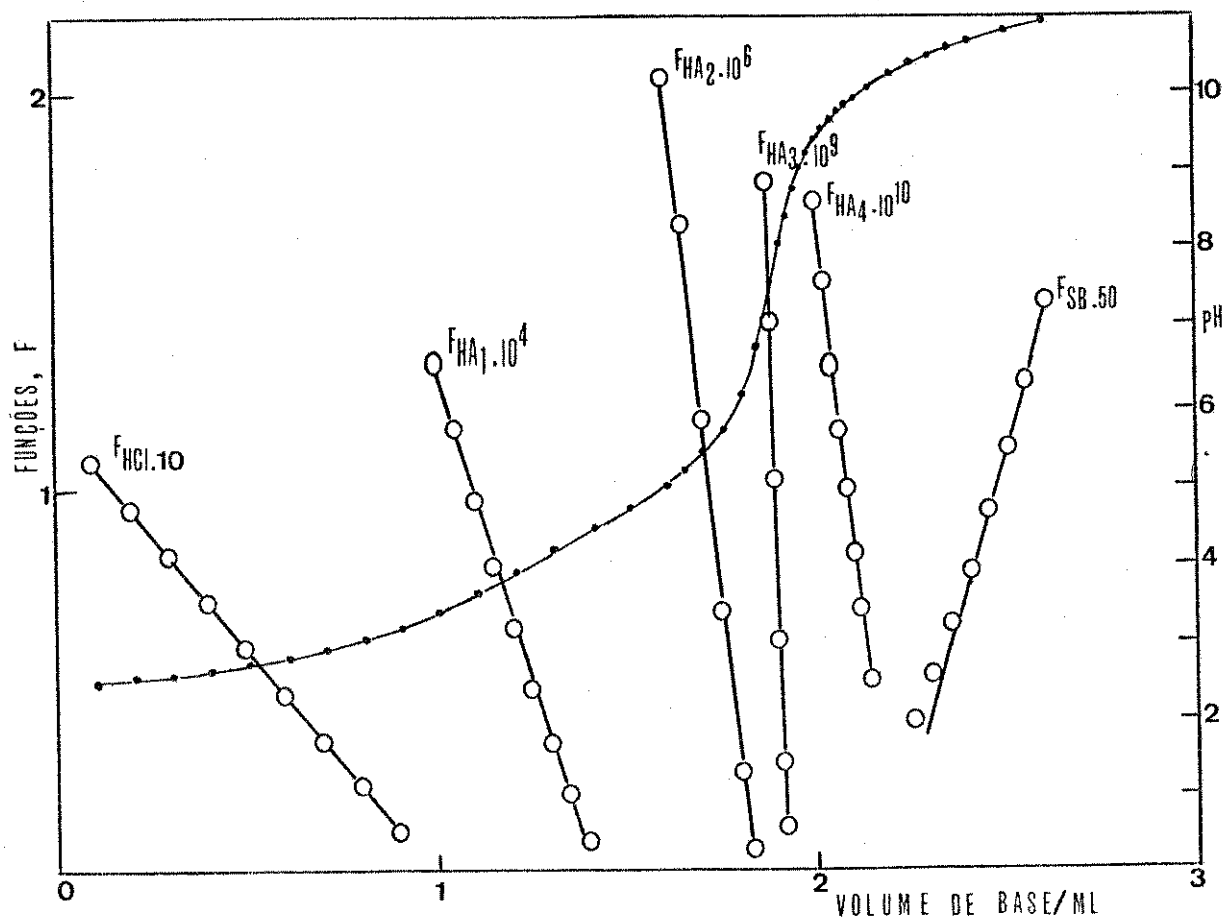


Figura 01 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,14315 g de lisozima na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. $I = 0,10$ M.

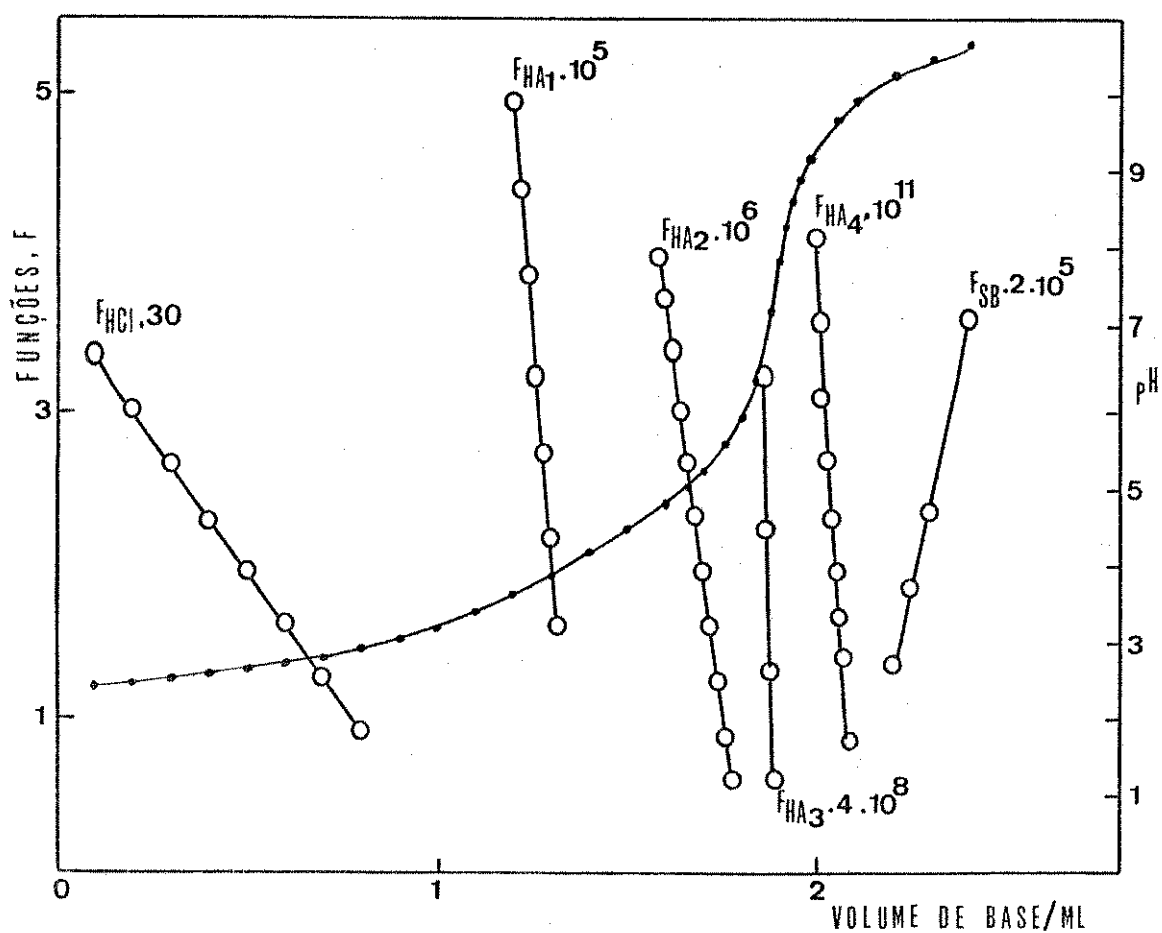


Figura 02 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,11298 g de lisozima na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1203 M. $I = 1,0$ M.

TABELA 17

Valores obtidos para a estequiometria dos grupos tituláveis da Lisozima Nativa

Número de moles do grupo titulado por mol de liso- zima (a) .				
	Este trabalho (b)		Outra re- ferência (c)	Sequência Aminoácido (d)
	I = 0,10 M	I = 1,0 M		
Carboxílicos				
HA ₁	5,16 ± 0,17	4,89 ± 0,05	-	-
HA ₂	5,57 ± 0,12	6,80 ± 0,05	-	-
Total	10,73	11,69	10,5	11 ^e
Imidazol				
HA ₃ ⁺	1,10 ± 0,04	1,29 ± 0,02	1	1
Amino				
HA ₄ ⁺	3,13 ± 0,14	3,19 ± 0,01	-	-
α-amino	-	-	1	1
ε-amino	-	-	5-6	6

(a) Peso Molecular da lisozima usado nos cálculos - 14500.

(b) Média de três determinações.

(c) Dados da referência (4).

(d) Dados da referência (35).

(e) 8 aspártico, 2 glutâmico e 1 α-carboxílico.

TABELA 18

Valores obtidos para o pKa dos grupos tituláveis
da Lisozima Nativa.

	Este trabalho ^a		Outras referências
	I = 0,10 M	I = 1,0 M	I = 0,15 M
Carboxílicos			
HA ₁	3,77 ± 0,01	3,53 ± 0,02	3,53 ^b
HA ₂	5,03 ± 0,02	4,76 ± 0,01	5,08 ^b
Imidazol			
HA ₃ ⁺	7,36 ± 0,03	6,65 ± 0,02	6,5-7,5 ^c
Amino			
HA ₄ ⁺	9,60 ± 0,07	9,41 ± 0,01	-
α-amino	-	-	7,5-7,9 ^c
ε-amino	-	-	10,27-10,6 ^c

(a) Média de três determinações.

(b) Dados da referência (6).

(c) Dados da referência (4).

As figuras 01 e 02 mostram um exemplo das curvas de titulação linearizadas. As funções F_{HCl} , F_{HA1} , F_{HA2} , F_{HA3} e F_{HA4} foram obtidas como descrito anteriormente, aparecem nas tabelas como FG modificadas e correspondem a titulação do excesso de ácido forte, dos dois tipos de grupos carboxílicos, do imidazol e dos grupos amino respectivamente.

Nas tabelas 17 e 18 estão o número de moles de cada grupo titulado por mol da lisozima e o respectivo pKa em força iônica 0,10 e 1,0 M. Para efeito de comparação juntamos às tabelas valores de outras referências. Podemos verificar que, em relação ao número total de grupos carboxílicos, existe uma boa concordância entre os nossos resultados, os de Tanford e Wagner (4) e a sequência de aminoácidos (35). Contudo, a separação das duas subclasses de carboxílicos, não corresponde aos resíduos aspártico e glutâmico, indicados pela sequência de aminoácidos. Isto provavelmente é devido a fortes efeitos locais, que fazem com que alguns grupos aspárticos sejam titulados, com pKa acima do valor normalmente esperado (36).

Na região alcalina, existem algumas diferenças entre os nossos resultados e os de Tanford e Wagner (4). Eles indicam que na região de pH 6 a 9 foram titulados dois grupos, um α -amino e um imidazol e na região de pH 9 a 12 oito ou nove grupos, dos quais três são fenólicos e o restante ϵ -amino. Os dados da linearização da curva de titulação, mostram que, o ponto final da titulação da lisozima ocorre em torno de pH 10 e concorda muito bem com o valor obtido quando o método de Gran (23) é aplicado ao excesso de base. De acordo com os nossos cálculos, na região de pH 6 a 8 é titulado um grupo, com pKa 7,37 e 6,65 em força iônica 0,10 e 1,0 M respectivamente. Como estes valores de pKa estão dentro do intervalo esperado para o imidazol (4), assumimos como sendo este grupo o imidazol.

Se o α -amino fosse titulado com o pKa indicado (7,5-7,9),

deveria, de acordo com a capacidade de separação do nosso método ($\Delta pK_a > 0,5$), aparecer em força iônica 0,10 M, junto com o imidazol e independente deste, como mais uma reta na curva linearizada, em força iônica 1,0 M. É importante observar que quando na linearização da curva de titulação, uma reta corresponde a dois grupos tituláveis de pK_a muito próximo ($< 0,5$), ocorre um desvio na linearidade, que aumenta a medida que cresce o ΔpK_a .

Quanto a HA_4^+ , como pode ser visto na tabela 17, aí está a maior discrepância entre os nossos resultados e os da literatura. De acordo com a sequência de aminoácidos, era esperado que nesta região fosse titulado nove grupos, seis amino e três fenólicos. Como todas as proteínas citadas em (1,2) mostram ϵ -amino titulável e em algumas é indicado a inacessibilidade total ou parcial dos grupos fenólicos à titulação, assumimos HA_4^+ como sendo grupos amino. Não está descartada a possibilidade de ser grupos fenólicos mais amino, mas é muito remota a possibilidade de ser somente fenólicos.

Testes de reatividade mostraram que quatro dos grupos amino reagem com o ácido β -naftoquinona-4-sulfônico a baixas concentrações, um reage a concentração elevada e o restante não reage (39). Somente três dos grupos amino reagem com o ácido monoclorotrifluor- p -benzóico (40,41). É provável que esta diferença de reatividade esteja relacionada com a localização da lisina na molécula da lisozima.

O fato de se ter identificado na lisozima, uma região hidrofóbica e um número de cadeias laterais fortemente hidrofóbicas, sobre a superfície molecular (38), pode justificar a titulação parcial dos grupos amino e a não titulação dos grupos fenólicos. Isto é corroborado pelos resultados da titulação da lisozima em uréia, onde foi obtido número de moles se-
is para os grupos amino.

Os resultados da titulação espectrofotométrica de Tojo e outros (37), mostraram a presença de três diferentes estágios de ionização dos grupos fenólicos. O primeiro ocorre entre pH 8 e 11,3; o segundo entre pH 11,3 e 12,3; e o terceiro acima de pH 12,3. Foram obtidos os valores 9,95; 11,6 e 12,6 para o pKa destes grupos. Sendo assim, existe a possibilidade de que um grupo fenólico, seja titulado junto com os grupos amino em força iônica 0,10 M. Por outro lado, se assim fosse, deveríamos ter obtido número de moles sete, para os grupos amino na titulação da lisozima em uréia.

Como já comentamos anteriormente, quando se usa a equação de Lindstrom-Lang, atribui-se um valor a N_i , e este valor é considerado correto se a equação é ajustada num certo intervalo da curva de titulação, neste caso, de pH 9 a 12. Mihalyi (42) comentando sobre a determinação dos grupos fenólicos e aminos, na titulação do fibrinogênio bovino, afirma que o fato da equação ser ajustada para um certo valor de N_i , não significa uma prova, de que os parâmetros assim obtidos estejam corretos.

Achamos importante lembrar, que além da diferença entre o nosso método de cálculo e o de Tanford e Wagner (4), existe também diferença entre os nossos métodos de titulação. Aqueles autores titulam soluções de lisozima com solução de HCl até aproximadamente pH 2 e com solução de NaOH até pH 12. O conjunto das duas titulações compõe toda a curva de titulação da proteína.

Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos em força iônica 0,10 e 1,0 M, chama-nos mais atenção a diferença entre a estequiometria dos grupos carboxílicos e entre os pKa do imidazol. No entanto, até o momento, não encontramos para isto, alguma explicação aceitável que possa ser proposta.

3.2 - TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA LISOZIMA DESNATURADA

A lisozima quando dissolvida em solução concentrada de uréia ou cloridrato de guanidina, sofre uma substancial perda da estrutura nativa, adquirindo uma conformação " desenrolada ", articulada através das quatro ligações dissulfeto, que permanecem intactas (30,43). Acompanhando a desnaturação com medidas de rotação ótica, verifica-se que o estado de equilíbrio é alcançado em soluções de cloridrato de guanidina 5 M e uréia acima de 8 M (24).

O exato mecanismo da desnaturação de proteínas ainda não está bem definido. Acredita-se que reagentes tipo uréia e cloridrato de guanidina, podem exercer seus efeitos pela interação com a amida, grupos peptídicos e grupos hidrofóbicos não polares (18). Acha-se também, que a uréia e cloridrato de guanidina comportam-se como "quebradores" da estrutura da água. (18).

Abu-Hamidayyah (25) por outro lado, conclui a partir de algumas propriedades em soluções aquosas, que a uréia " aumenta" a estrutura da água.

Como pode ser visto, a natureza da interação uréia -água ainda não está claramente estabelecida.

É importante aqui relembrar a classificação das estruturas da proteína, proposta por Lindstrom-Lang (26). A estrutura primária é a estrutura resultante das ligações químicas, entre os aminoácidos ao longo da cadeia peptídica, incluindo as ligações dissulfeto. A estrutura secundária é a configuração da cadeia peptídica, decorrente de ligações hidrogênio entre o peptídio N - H e os grupos C = O. A estrutura terciária é o modelo de acordo com o qual, as estruturas secundárias são empacotadas, na molécula da proteína nativa. Toda proteína contém uma proporção relativamente elevada, de aminoácidos com cadeias laterais não polares. Estas cadeias laterais não po-

TABELA 19

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,15502 g de lisozima em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1274 M.

I = 0,10 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	170.0	2.492	1.775	-108.8	7.220
0.100	168.6	2.516	1.801	-122.4	7.449
0.200	165.8	2.565	1.810	-126.3	7.515
0.300	162.5	2.623	1.825	-132.3	7.617
0.400	159.0	2.683	1.835	-135.9	7.678
0.500	155.0	2.752	1.850	-140.9	7.762
0.600	150.4	2.831	1.865	-145.5	7.840
0.700	145.2	2.921	1.880	-149.8	7.913
0.800	139.2	3.023	1.901	-155.5	8.009
0.900	132.2	3.143	1.911	-158.0	8.051
1.000	124.1	3.280	1.920	-160.1	8.087
1.025	121.9	3.318	1.935	-163.7	8.148
1.050	119.7	3.355	1.950	-166.9	8.202
1.075	117.3	3.396	1.960	-169.0	8.237
1.100	114.9	3.437	1.971	-170.7	8.265
1.125	112.4	3.479	1.990	-174.6	8.331
1.150	109.8	3.523	2.005	-177.7	8.384
1.175	107.1	3.567	2.050	-186.6	8.535
1.200	104.3	3.616	2.100	-196.1	8.695
1.225	101.4	3.666	2.150	-205.1	8.848
1.250	98.5	3.715	2.200	-213.8	8.995
1.275	95.3	3.769	2.250	-222.2	9.137
1.300	92.1	3.823	2.300	-230.5	9.278
1.325	88.7	3.881	2.350	-238.3	9.410
1.350	85.1	3.941	2.400	-245.2	9.527
1.375	81.3	4.006	2.450	-252.1	9.644
1.400	77.4	4.072	2.500	-258.4	9.751
1.425	72.9	4.148	2.550	-263.9	9.844
1.450	68.5	4.222	2.600	-268.9	9.930
1.475	63.4	4.309	2.650	-273.4	10.006
1.500	57.9	4.402	2.700	-277.4	10.075
1.525	51.3	4.513	2.750	-281.0	10.136
1.550	44.5	4.628	2.801	-284.3	10.193
1.575	36.2	4.769	2.850	-287.0	10.240
1.600	26.2	4.938	2.900	-289.6	10.284
1.625	13.9	5.146	2.950	-292.0	10.326
1.650	-2.0	5.414	3.000	-294.1	10.362
1.675	-22.8	5.766	3.100	-298.1	10.431
1.700	-46.1	6.160	3.200	-301.6	10.492
1.725	-69.4	6.554	3.300	-304.3	10.540
1.750	-91.2	6.922	3.400	-306.9	10.585

TABELA 20

Resultados da linearização da curva de titulação
da lisozima em uréia 9,3 M. Valores relativos aos
dados da tabela 19.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.492	8.940E-02	1.059E-01
0.100	2.516	8.385E-02	9.950E-02
0.200	2.565	7.354E-02	8.676E-02
0.300	2.623	6.254E-02	7.402E-02
0.400	2.683	5.207E-02	6.128E-02
0.500	2.752	4.136E-02	4.854E-02
0.600	2.831	3.043E-02	3.580E-02
0.700	2.921	1.950E-02	2.306E-02
0.800	3.023	8.319E-03	1.032E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.881

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999963

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.025	3.318	1.594E-04	1.602E-04
1.050	3.355	1.529E-04	1.526E-04
1.075	3.396	1.453E-04	1.451E-04
1.100	3.437	1.380E-04	1.376E-04
1.125	3.479	1.305E-04	1.300E-04
1.150	3.523	1.229E-04	1.223E-04
1.175	3.569	1.151E-04	1.150E-04
1.200	3.616	1.073E-04	1.074E-04
1.225	3.666	9.949E-05	9.990E-05
1.250	3.715	9.221E-05	9.237E-05
1.275	3.769	8.427E-05	8.484E-05
1.300	3.823	7.692E-05	7.730E-05
1.325	3.881	6.949E-05	6.977E-05
1.350	3.941	6.209E-05	6.224E-05
1.375	4.006	5.484E-05	5.470E-05
1.400	4.072	4.803E-05	4.717E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999927

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.557

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 3.01324E-4

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.625	5.146	4.973E-07	4.999E-07
1.650	5.414	3.468E-07	3.381E-07
1.675	5.766	1.664E-07	1.763E-07
1.700	6.160	1.822E-08	1.454E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO =-0.999257

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.702

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2= 6.47090E-6

=====

Continuação da TABELA 20

=====

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.750	6.922	3.372E-09	3.334E-09
1.775	7.220	1.153E-09	1.229E-09
1.801	7.449	-9.219E-10	-9.591E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999531

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.790

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 8.41707E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.971	8.266	9.504E-10	9.290E-10
1.990	8.332	8.986E-10	8.913E-10
2.005	8.384	8.529E-10	8.437E-10
2.050	8.535	7.181E-10	7.307E-10
2.100	8.695	5.752E-10	6.051E-10
2.150	8.848	4.493E-10	4.795E-10
2.200	8.995	3.365E-10	3.540E-10
2.250	9.137	2.351E-10	2.284E-10
2.300	9.278	1.387E-10	1.029E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.99692

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.341

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 2.51114E-9

=====

TABELA 21

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,14168 g de lisozima em uréia 9,3 M , na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1274 M.

I = 0,10 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.100	172.6	2.453	1.680	-69.1	6.555
0.200	169.7	2.504	1.691	-79.1	6.724
0.300	166.5	2.560	1.700	-86.5	6.849
0.400	162.9	2.622	1.710	-93.7	6.971
0.500	158.9	2.691	1.720	-100.4	7.084
0.600	154.4	2.769	1.730	-106.4	7.185
0.700	149.1	2.860	1.740	-111.8	7.277
0.800	143.0	2.965	1.750	-116.6	7.358
0.900	135.9	3.086	1.760	-121.0	7.432
1.000	127.6	3.227	1.770	-125.0	7.500
1.035	124.4	3.282	1.780	-128.6	7.561
1.055	122.4	3.316	1.790	-132.0	7.618
1.100	117.9	3.392	1.800	-135.2	7.672
1.125	115.2	3.438	1.820	-141.3	7.775
1.150	112.4	3.485	1.840	-147.0	7.872
1.175	109.5	3.534	1.860	-152.2	7.959
1.200	106.5	3.585	1.881	-157.4	8.047
1.225	103.4	3.638	1.900	-162.0	8.125
1.255	99.4	3.706	1.920	-166.5	8.201
1.275	96.7	3.751	1.940	-170.7	8.272
1.300	93.1	3.812	1.961	-175.1	8.347
1.325	89.2	3.878	1.982	-179.3	8.418
1.350	85.1	3.948	2.000	-183.0	8.480
1.375	80.9	4.019	2.051	-192.3	8.637
1.400	76.2	4.098	2.100	-201.3	8.790
1.425	71.2	4.183	2.150	-210.4	8.944
1.450	65.5	4.279	2.200	-219.0	9.089
1.475	59.3	4.384	2.250	-227.6	9.235
1.500	52.1	4.506	2.300	-235.9	9.375
1.525	44.0	4.643	2.350	-243.6	9.506
1.550	33.9	4.814	2.400	-250.5	9.623
1.560	29.4	4.890	2.451	-257.1	9.735
1.571	23.9	4.983	2.500	-262.6	9.829
1.580	19.0	5.066	2.600	-272.1	9.991
1.590	12.7	5.172	2.700	-279.5	10.117
1.600	5.8	5.289	2.800	-285.4	10.218
1.610	-2.2	5.424	2.900	-290.1	10.299
1.620	-10.5	5.564	3.000	-294.2	10.370
1.630	-20.0	5.725	3.100	-297.7	10.431
1.640	-30.1	5.896	3.200	-300.7	10.483
1.650	-40.2	6.066	3.300	-303.3	10.529
1.660	-50.0	6.232	3.400	-305.7	10.571
1.670	-59.9	6.399	3.504	-307.8	10.608

TABELA 22

Resultados da linearização da curva de titulação
da lisozima em uréia 9,3 M. Valores relativos aos
dados da tabela 21.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	2.453	9.964E-02	1.060E-01
0.200	2.504	8.751E-02	9.323E-02
0.300	2.560	7.548E-02	8.049E-02
0.400	2.622	6.341E-02	6.775E-02
0.500	2.691	5.156E-02	5.501E-02
0.600	2.769	3.984E-02	4.227E-02
0.700	2.860	2.782E-02	2.953E-02
0.800	2.965	1.583E-02	1.679E-02
0.900	3.086	3.722E-03	4.053E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.932

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.9999993

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.055	3.316	1.538E-04	1.534E-04
1.100	3.392	1.392E-04	1.385E-04
1.125	3.438	1.305E-04	1.302E-04
1.150	3.485	1.219E-04	1.219E-04
1.175	3.534	1.133E-04	1.136E-04
1.200	3.585	1.049E-04	1.053E-04
1.225	3.638	9.661E-05	9.706E-05
1.255	3.706	8.637E-05	8.712E-05
1.275	3.751	7.998E-05	8.049E-05
1.300	3.812	7.183E-05	7.221E-05
1.325	3.878	6.352E-05	6.393E-05
1.350	3.948	5.549E-05	5.565E-05
1.375	4.019	4.803E-05	4.737E-05
1.400	4.099	4.031E-05	3.909E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999863

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.518

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 3.31264E-4

PARA ACIDO HA2			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.590	5.172	4.841E-07	4.868E-07
1.600	5.289	4.093E-07	4.048E-07
1.610	5.424	3.219E-07	3.228E-07
1.620	5.564	2.407E-07	2.407E-07
1.630	5.725	1.567E-07	1.587E-07
1.640	5.896	7.776E-08	7.669E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO =-0.999855

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.649

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2= 8.20233E-6

=====

Continuação da TABELA 22

=====

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.700	6.849	4.109E-09	4.120E-09
1.710	6.971	3.006E-09	2.985E-09
1.720	7.084	1.839E-09	1.850E-09
1.730	7.185	7.154E-10	7.153E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999946

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.736

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 1.13481E-7

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.840	7.872	1.366E-09	1.381E-09
1.860	7.959	1.329E-09	1.315E-09
1.881	8.047	1.267E-09	1.246E-09
1.900	8.125	1.195E-09	1.183E-09
1.920	8.201	1.122E-09	1.117E-09
1.940	8.272	1.052E-09	1.051E-09
1.961	8.347	9.726E-10	9.815E-10
1.982	8.418	8.973E-10	9.122E-10
2.000	8.480	8.279E-10	8.527E-10
2.051	8.637	6.704E-10	6.843E-10
2.100	8.790	5.219E-10	5.225E-10
2.150	8.944	3.830E-10	3.574E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.998745

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.258

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 3.30216E-9

=====

TABELA 23

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,12028 g de lisozima em cloridrato de guanidina 5,6 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,09898 M . I = 6,0 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	304.3	2.520	1.551	162.1	4.924
0.100	303.0	2.542	1.560	161.0	4.942
0.150	301.4	2.569	1.571	159.3	4.971
0.200	299.6	2.599	1.580	158.2	4.990
0.250	297.8	2.630	1.590	157.0	5.010
0.300	295.9	2.662	1.600	155.8	5.030
0.350	293.8	2.697	1.610	154.6	5.050
0.400	291.6	2.735	1.620	153.4	5.071
0.460	288.5	2.787	1.630	152.3	5.089
0.500	286.4	2.823	1.640	151.0	5.111
0.550	283.6	2.870	1.650	149.8	5.132
0.600	280.4	2.924	1.660	148.8	5.148
0.650	277.1	2.980	1.670	147.6	5.169
0.700	273.2	3.046	1.682	146.0	5.196
0.750	268.6	3.123	1.690	145.1	5.211
0.800	263.3	3.213	1.700	143.7	5.235
0.850	257.3	3.314	1.710	142.5	5.255
0.900	250.6	3.428	1.725	141.1	5.279
0.950	242.8	3.560	1.730	140.1	5.295
0.975	238.8	3.627	1.740	138.6	5.321
1.000	234.7	3.696	1.750	137.3	5.343
1.025	230.6	3.766	1.760	136.0	5.365
1.050	226.5	3.835	1.770	134.5	5.390
1.075	222.6	3.901	1.780	133.1	5.414
1.100	218.5	3.970	1.790	131.8	5.436
1.125	214.6	4.036	1.800	130.3	5.461
1.150	211.0	4.097	1.810	128.9	5.485
1.175	207.4	4.156	1.820	127.3	5.512
1.200	203.9	4.217	1.830	125.8	5.537
1.225	200.7	4.271	1.840	124.1	5.566
1.250	197.2	4.330	1.851	122.4	5.595
1.275	194.0	4.384	1.861	120.6	5.625
1.300	190.8	4.438	1.870	119.0	5.652
1.325	187.8	4.489	1.880	117.1	5.684
1.350	184.8	4.540	1.890	115.3	5.715
1.375	182.0	4.587	1.900	113.2	5.750
1.400	179.0	4.638	1.910	111.2	5.784
1.425	176.3	4.684	1.920	109.2	5.818
1.450	173.5	4.731	1.930	107.0	5.855
1.475	170.8	4.777	1.940	104.4	5.899
1.500	167.9	4.826	1.950	101.8	5.943
1.510	166.7	4.846	1.960	99.1	5.989
1.520	165.5	4.866	1.971	96.0	6.041
1.530	164.5	4.883	1.980	93.1	6.090
1.540	163.4	4.902	1.990	89.8	6.146

Continuação da TABELA 23

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
2.000	86.0	6.210	2.300	-123.7	9.754
2.020	77.7	6.350	2.325	-130.1	9.862
2.040	67.0	6.531	2.350	-135.3	9.950
2.060	53.6	6.758	2.375	-139.8	10.026
2.080	37.6	7.028	2.400	-143.6	10.090
2.100	19.6	7.332	2.450	-150.6	10.209
2.120	1.3	7.642	2.500	-156.4	10.307
2.140	-18.3	7.973	2.550	-161.1	10.386
2.160	-37.9	8.304	2.600	-165.1	10.453
2.181	-57.8	8.641	2.650	-169.0	10.519
2.200	-75.2	8.935	2.700	-172.4	10.576
2.225	-93.0	9.236	2.800	-178.0	10.671
2.250	-106.3	9.460	2.900	-182.8	10.751
2.275	-116.0	9.624	3.000	-187.1	10.824

TABELA 24

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em cloridrato de guanidina. Valores relativos aos dados da tabela 23.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.520	8.960E-02	8.715E-02
0.100	2.542	8.521E-02	8.221E-02
0.150	2.569	8.005E-02	7.726E-02
0.200	2.599	7.458E-02	7.231E-02
0.250	2.630	6.946E-02	6.736E-02
0.300	2.662	6.440E-02	6.241E-02
0.350	2.697	5.919E-02	5.746E-02
0.400	2.735	5.414E-02	5.251E-02
0.460	2.787	4.764E-02	4.657E-02
0.500	2.823	4.363E-02	4.261E-02
0.550	2.870	3.871E-02	3.766E-02
0.600	2.924	3.363E-02	3.272E-02
0.650	2.980	2.892E-02	2.777E-02
0.700	3.046	2.396E-02	2.282E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.931

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.99992

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.950	3.560	3.017E-05	2.951E-05
0.975	3.627	2.763E-05	2.733E-05
1.000	3.696	2.512E-05	2.515E-05
1.025	3.766	2.275E-05	2.298E-05
1.050	3.835	2.043E-05	2.080E-05
1.075	3.901	1.838E-05	1.863E-05
1.100	3.970	1.601E-05	1.645E-05
1.125	4.036	1.385E-05	1.428E-05
1.150	4.097	1.195E-05	1.210E-05
1.175	4.158	9.957E-06	9.924E-06
1.200	4.217	7.991E-06	7.748E-06
1.225	4.271	6.240E-06	5.573E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.998754

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.289

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 8.70327E-5

=====

Continuação da TABELA 24

=====

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.590	5.010	2.990E-06	3.089E-06
1.600	5.030	2.946E-06	3.025E-06
1.610	5.050	2.899E-06	2.961E-06
1.620	5.071	2.851E-06	2.898E-06
1.630	5.089	2.811E-06	2.834E-06
1.640	5.111	2.749E-06	2.770E-06
1.650	5.132	2.696E-06	2.706E-06
1.660	5.148	2.664E-06	2.643E-06
1.670	5.169	2.609E-06	2.579E-06
1.682	5.196	2.527E-06	2.502E-06
1.690	5.211	2.488E-06	2.451E-06
1.700	5.235	2.414E-06	2.387E-06
1.710	5.255	2.359E-06	2.324E-06
1.725	5.279	2.312E-06	2.228E-06
1.730	5.295	2.248E-06	2.196E-06
1.740	5.321	2.168E-06	2.132E-06
1.750	5.343	2.106E-06	2.069E-06
1.760	5.365	2.044E-06	2.005E-06
1.770	5.390	1.968E-06	1.941E-06
1.780	5.414	1.902E-06	1.877E-06
1.790	5.436	1.844E-06	1.813E-06
1.800	5.461	1.774E-06	1.750E-06
1.810	5.485	1.712E-06	1.686E-06
1.820	5.512	1.638E-06	1.622E-06
1.830	5.537	1.574E-06	1.558E-06
1.840	5.566	1.500E-06	1.495E-06
1.851	5.595	1.431E-06	1.424E-06
1.861	5.625	1.357E-06	1.361E-06
1.870	5.652	1.294E-06	1.303E-06
1.880	5.684	1.222E-06	1.239E-06
1.890	5.715	1.158E-06	1.176E-06
1.900	5.750	1.083E-06	1.112E-06
1.910	5.784	1.010E-06	1.048E-06
1.920	5.818	9.554E-07	9.843E-07
1.930	5.855	8.897E-07	9.206E-07
1.940	5.899	8.150E-07	8.568E-07
1.950	5.943	7.461E-07	7.930E-07

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO = -0.998407

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 2.074

CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO P/HA2 = 6.37783E-6

=====

Continuação da TABELA 24

=====			
PARA ACIDO HA3			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.140	7.973	6.432E-10	6.322E-10
2.160	8.304	3.334E-10	3.548E-10
2.181	8.641	7.387E-11	6.343E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997881			
VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 2.186			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 1.38732E-8			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.250	9.460	2.084E-11	2.034E-11
2.275	9.624	1.970E-11	1.952E-11
2.300	9.754	1.854E-11	1.870E-11
2.325	9.862	1.746E-11	1.789E-11
2.350	9.950	1.668E-11	1.707E-11
2.375	10.026	1.600E-11	1.625E-11
2.400	10.090	1.550E-11	1.543E-11
2.450	10.209	1.427E-11	1.379E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.986251			
VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.871			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 3.27474E-11			
=====			

Obs.: Não foi possível ajustar a função P_{HA4} com pontos mais próximos do ponto de equivalência, devido a decomposição do $GnHCl$ em meio alcalino.

TABELA 25

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,12028 g de lisozima em cloridrato de guanidina 5,6 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,09898 M. $I = 6,0$ M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	304.5	2.517	1.530	164.5	4.883
0.100	303.0	2.542	1.540	163.4	4.902
0.150	301.3	2.571	1.550	162.0	4.925
0.200	299.4	2.603	1.560	160.9	4.944
0.250	297.5	2.635	1.570	159.9	4.961
0.300	295.7	2.665	1.580	158.8	4.979
0.350	293.9	2.696	1.590	157.6	5.000
0.400	291.5	2.736	1.600	156.4	5.020
0.450	289.3	2.774	1.610	155.3	5.039
0.500	286.8	2.816	1.620	154.1	5.059
0.550	284.1	2.861	1.630	152.8	5.081
0.600	280.7	2.919	1.640	151.5	5.103
0.650	277.1	2.980	1.650	150.2	5.125
0.700	273.2	3.046	1.660	148.8	5.148
0.750	268.8	3.120	1.670	147.7	5.167
0.800	263.8	3.205	1.680	146.5	5.187
0.825	260.9	3.254	1.690	145.1	5.211
0.850	257.9	3.304	1.700	143.9	5.231
0.875	254.7	3.358	1.710	142.7	5.252
0.900	251.0	3.421	1.720	141.5	5.272
0.925	247.4	3.482	1.730	140.1	5.295
0.950	243.5	3.548	1.740	138.9	5.316
0.975	239.5	3.615	1.750	137.6	5.338
1.000	235.4	3.685	1.760	136.3	5.360
1.025	231.5	3.751	1.770	134.9	5.383
1.050	227.4	3.820	1.780	133.5	5.407
1.075	223.2	3.891	1.791	131.9	5.434
1.100	219.2	3.958	1.800	130.6	5.456
1.125	215.4	4.023	1.810	129.2	5.480
1.190	206.0	4.182	1.820	127.8	5.503
1.200	204.6	4.205	1.830	126.4	5.527
1.225	201.3	4.261	1.840	124.6	5.557
1.250	197.7	4.322	1.850	122.8	5.588
1.275	194.6	4.374	1.860	121.2	5.615
1.300	191.5	4.427	1.870	119.5	5.644
1.325	188.4	4.479	1.881	117.5	5.677
1.350	185.3	4.531	1.890	115.8	5.706
1.375	182.2	4.584	1.900	113.9	5.738
1.400	179.3	4.633	1.910	111.8	5.774
1.425	176.3	4.684	1.920	109.8	5.808
1.450	173.5	4.731	1.930	107.6	5.845
1.475	170.8	4.777	1.940	105.3	5.884
1.500	167.8	4.827	1.950	102.7	5.928
1.510	166.8	4.844	1.960	100.0	5.973
1.520	165.5	4.866	1.970	97.1	6.022

Continuação da TABELA 25

=====					
VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
1.980	94.1	6.073	2.220	-88.3	9.156
1.990	90.7	6.131	2.240	-100.3	9.359
2.000	87.1	6.191	2.260	-109.7	9.518
2.020	78.6	6.335	2.280	-117.0	9.641
2.040	68.1	6.513	2.300	-123.2	9.746
2.060	54.8	6.737	2.325	-129.4	9.851
2.080	39.0	7.004	2.350	-134.7	9.940
2.090	30.5	7.148	2.375	-139.3	10.018
2.100	21.4	7.302	2.400	-143.3	10.085
2.110	12.2	7.457	2.450	-150.0	10.199
2.120	2.8	7.616	2.500	-155.8	10.296
2.140	-16.4	7.941	2.550	-160.6	10.377
2.160	-36.3	8.277	2.600	-164.8	10.448
2.180	-55.0	8.593	2.650	-168.7	10.514
2.200	-73.3	8.903	2.700	-172.1	10.571
=====					

TABELA 26

Resultados da linearização da curva de titulação da lisozima em cloridrato de guanidina. Valores relativos aos dados da tabela 25.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

VOLUME	PARA HCL		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.517	9.035E-02	8.777E-02
0.100	2.542	8.524E-02	8.282E-02
0.150	2.571	7.976E-02	7.787E-02
0.200	2.603	7.402E-02	7.292E-02
0.250	2.635	6.866E-02	6.797E-02
0.300	2.665	6.392E-02	6.302E-02
0.350	2.696	5.948E-02	5.807E-02
0.400	2.736	5.396E-02	5.312E-02
0.450	2.774	4.931E-02	4.818E-02
0.500	2.816	4.443E-02	4.323E-02
0.550	2.861	3.962E-02	3.828E-02
0.600	2.919	3.415E-02	3.333E-02
0.650	2.980	2.899E-02	2.838E-02
0.700	3.046	2.404E-02	2.343E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.937

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999792

VOLUME	PARA ACIDO HA1		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.950	3.548	3.056E-05	2.996E-05
0.975	3.615	2.819E-05	2.797E-05
1.000	3.685	2.587E-05	2.599E-05
1.025	3.751	2.401E-05	2.400E-05
1.050	3.820	2.185E-05	2.201E-05
1.075	3.891	1.956E-05	2.002E-05
1.100	3.958	1.752E-05	1.804E-05
1.125	4.023	1.567E-05	1.605E-05
1.190	4.182	1.100E-05	1.088E-05
1.200	4.205	1.028E-05	1.009E-05
1.225	4.261	8.628E-06	8.102E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.998744

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.327

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 7.94837E-5

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.590	5.000	2.681E-06	2.794E-06
1.600	5.020	2.653E-06	2.738E-06
1.610	5.039	2.632E-06	2.683E-06
1.620	5.059	2.598E-06	2.627E-06
1.630	5.081	2.551E-06	2.572E-06
1.640	5.103	2.503E-06	2.516E-06
1.650	5.125	2.454E-06	2.461E-06
1.660	5.148	2.394E-06	2.405E-06
1.670	5.167	2.361E-06	2.350E-06
1.680	5.187	2.317E-06	2.294E-06
1.690	5.211	2.255E-06	2.239E-06
1.700	5.231	2.210E-06	2.184E-06
1.710	5.252	2.165E-06	2.128E-06
1.720	5.272	2.119E-06	2.073E-06
1.730	5.295	2.057E-06	2.017E-06
1.740	5.316	2.011E-06	1.962E-06
1.750	5.338	1.957E-06	1.906E-06
1.760	5.360	1.903E-06	1.851E-06
1.770	5.383	1.843E-06	1.795E-06
1.780	5.407	1.784E-06	1.740E-06
1.791	5.434	1.717E-06	1.679E-06
1.800	5.456	1.663E-06	1.629E-06
1.810	5.480	1.608E-06	1.574E-06
1.820	5.503	1.553E-06	1.518E-06
1.830	5.527	1.500E-06	1.463E-06
1.840	5.557	1.426E-06	1.407E-06
1.850	5.586	1.355E-06	1.352E-06
1.860	5.615	1.297E-06	1.296E-06
1.870	5.644	1.236E-06	1.241E-06
1.881	5.677	1.166E-06	1.180E-06
1.890	5.706	1.109E-06	1.130E-06
1.900	5.738	1.047E-06	1.075E-06
1.910	5.774	9.813E-07	1.019E-06
1.920	5.808	9.228E-07	9.637E-07
1.930	5.845	8.607E-07	9.083E-07
1.940	5.884	7.992E-07	8.528E-07
1.950	5.928	7.332E-07	7.974E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997572

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 2.094

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2= 5.54485E-6

Continuação da TABELA 26

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.140	7.941	4.881E-10	4.833E-10
2.160	8.277	2.866E-10	2.962E-10
2.180	8.593	1.140E-10	1.092E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999001

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 2.192

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 9.35150E-9

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.240	9.359	1.970E-11	1.975E-11
2.260	9.518	1.925E-11	1.916E-11
2.280	9.641	1.865E-11	1.856E-11
2.300	9.746	1.787E-11	1.797E-11
2.325	9.851	1.716E-11	1.723E-11
2.350	9.940	1.646E-11	1.648E-11
2.375	10.018	1.581E-11	1.574E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.998428

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.904

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 2.97338E-11

Obs.: Não foi possível ajustar a função F_{HA4}^+ com pontos mais próximos do ponto de equivalência, devido a decomposição do $GnHCl$ em meio alcalino.

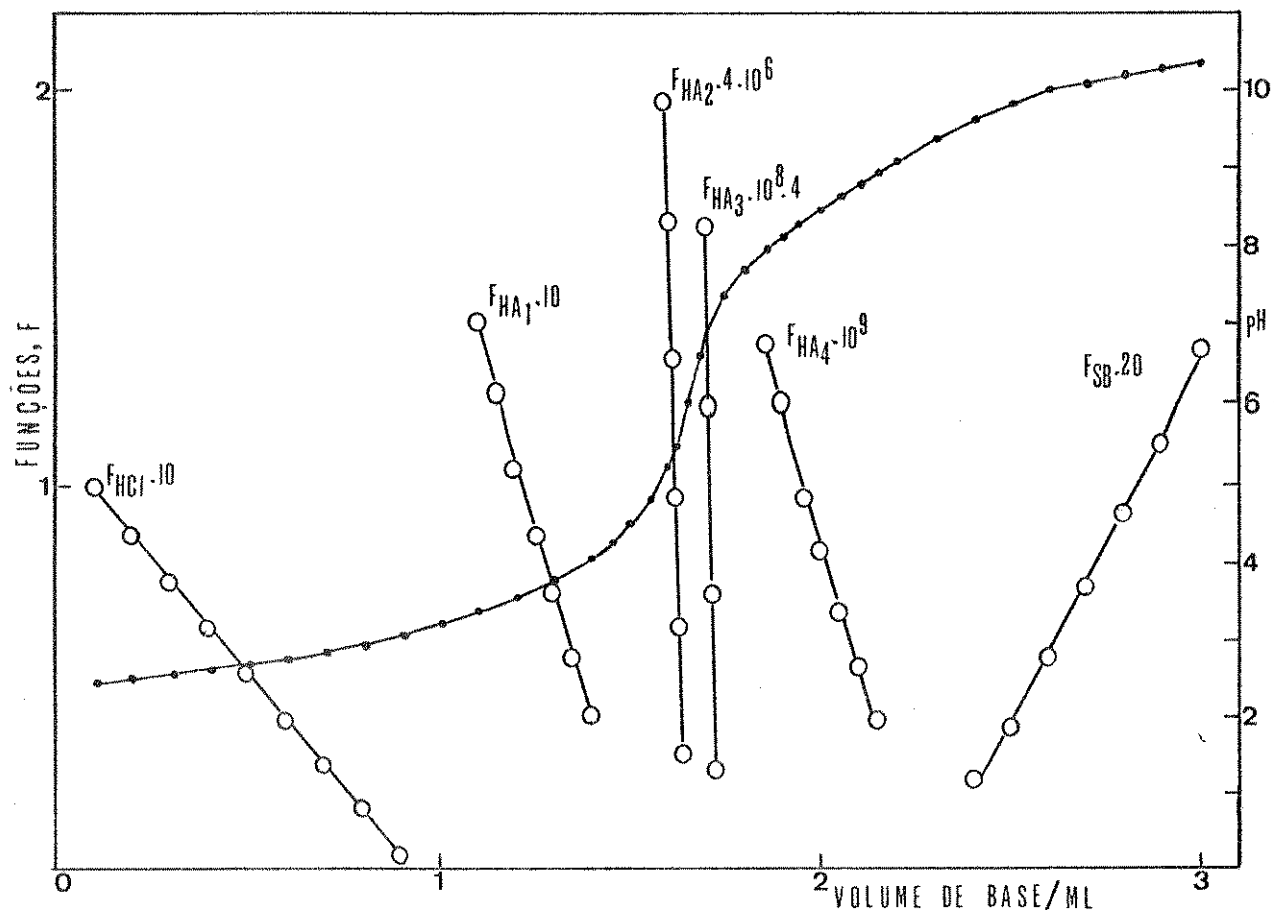


Figura 03 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,1417 g de lisozima em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1274 M. $I = 0,10$ M.

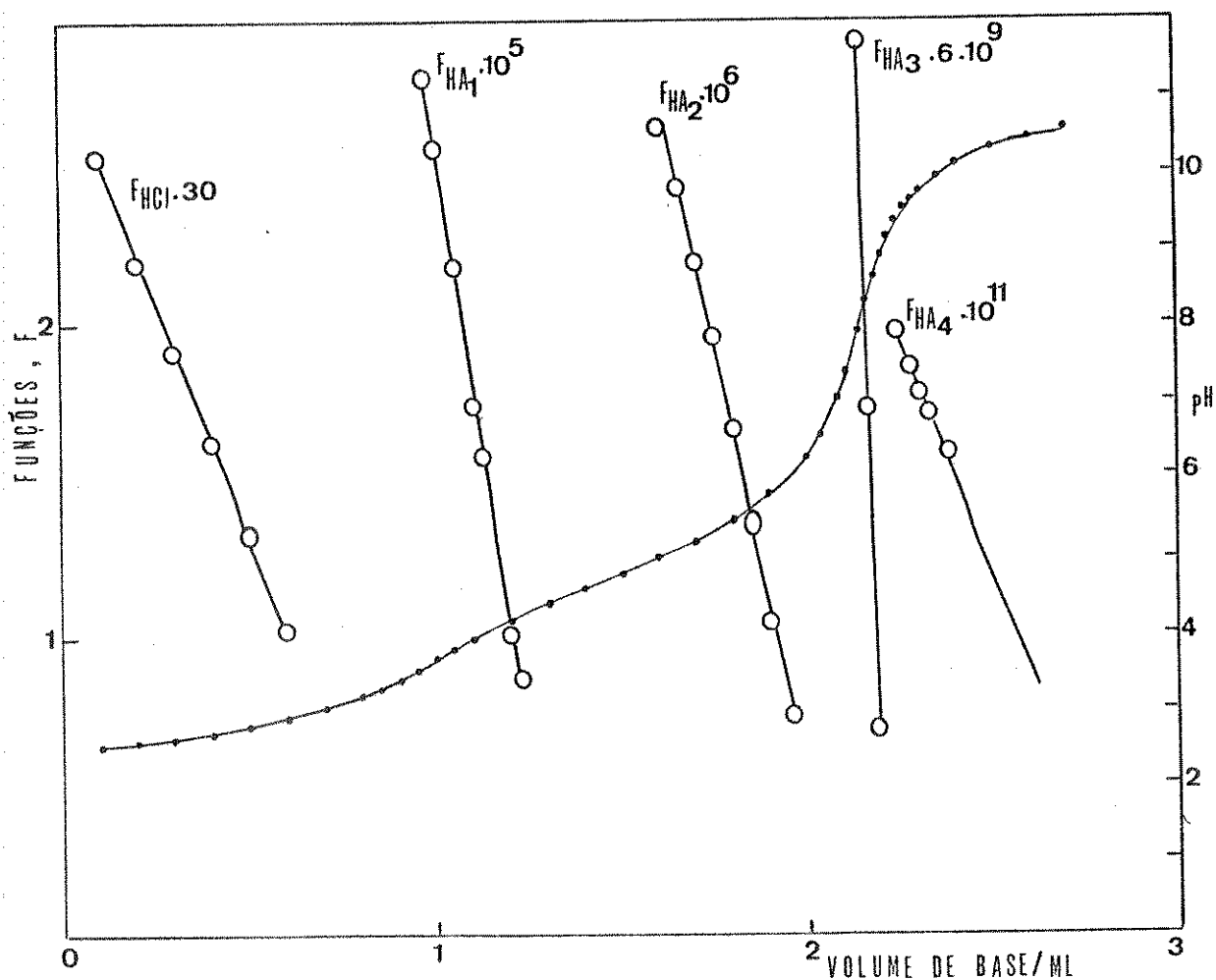


Figura 04 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,12028 g de lisozima em cloridrato de guanidina 5,6 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,09898M.

TABELA 27

Valores obtidos para estequiometria e pKa dos grupos tituláveis da Lisozima em Uréia 9,3 M

Número de moles do grupo titulado por mol de liso- zima (a)			Valor do pKa
Este trabalho (b)	Sequência Aminoácidos (c)	Este trabalho (b)	
I = 0,10 M		I = 0,10 M	
Carboxílicos			
HA ₁	7,85 ± 0,21	8 ASP	3,50 ± 0,02
HA ₂	1,72 ± 0,01	2 GLU	5,14 ± 0,05
Imidazol			
HA ₃ ⁺	1,09 ± 0,04	1 HIS	7,01 ± 0,06
Amino			
HA ₄ ⁺	5,77 ± 0,08	6 LIS	8,54 ± 0,06

(a) Peso Molecular da lisozima usado nos cálculos - 14500.

(b) Média de duas determinações.

(c) Dados da referência (35). ASP = aspártico, GLU = glutâmico, HIS = histidina, LIS = lisina .

TABELA 28

Valores obtidos para estequiometria e pKa dos grupos tituláveis da Lisozima em Cloridrato de Guanidina 5,6 M

Número de moles do grupo titulado por mol de lisozima(a)		Valor do pKa		
	Este trabalho (b)	Sequência Aminoácido (c)	Este trabalho (b)	Outra referência (d)
Carboxílicos				
HA ₁	3,83 ± 0,19	-	4,08 ± 0,02	-
^e HA ₂	8,52 ± 0,11	-	5,23 ± 0,03	-
Total	12,35	11		
α-COOH	-	-	-	3,4
γ-COOH	-	-	-	4,35
Imidazol	-	1	-	6,5
α- Amino				
HA ₃ ⁺	1,26 ± 0,09	1	7,96 ± 0,07	7,6
ε-Amino+Fenol				
HA ₄ ⁺	7,71 ± 0,16	-	10,51 ± 0,02	-
ε-amino	-	6	-	10,35
fenol	-	3	-	9,9

(a) Peso Molecular da lisozima usado nos cálculos - 14500.

(b) Média de duas determinações.

(c) Dados da referência (35).

(d) Dados da referência (28)

lares têm pouca afinidade por água. Na proteína, aquelas configurações da cadeia peptídica, que contém grande número de grupos não polares, tendem a agrupar-se com a finalidade de remove-los da fase aquosa. A tendência destes grupos não polares, de ligar-se um ao outro na fase aquosa é chamada de ligação hidrofóbica.

3.2.1 - Resultados e Discussão

Nas tabelas 19 a 26 estão os dados da titulação da lisozima desnaturada com uréia e cloridrato da guanidina, e os resultados da linearização da curva de titulação. Nas figuras 03 e 04 mostramos um exemplo das curvas de titulação linearizadas. Os resultados que aparecem nas tabelas 27 e 28, estão corrigidos das impurezas encontradas nas soluções de uréia e cloridrato de guanidina respectivamente. Correspondem a média da titulação de duas soluções diferentes de lisozima. Para efeito de comparação, juntamos àquelas tabelas os números de grupos esperados com base na sequência de aminoácidos (35), e no caso do cloridrato de guanidina, os resultados obtidos por Roxby e Tanford (28).

Como podemos observar, em uréia, a separação das duas subclasses de carboxílicos, concorda razoavelmente bem, com o número de resíduos aspárticos e glutâmicos indicados pela sequência de aminoácidos. O α -COOH, neste meio, não aparece titulado junto com os grupos aspárticos e glutâmicos, como aconteceu em força iônica 0,10 e 1,0 M. Contudo existe a possibilidade dele ter sido titulado junto com o excesso de ácido forte, assim sendo, deve ter um pKa anormalmente baixo.

Em relação ao imidazol e grupos amino, os valores obti-

tante observar mais uma vez, que neste meio, diferentemente do que ocorreu em força iônica 0,10 e 1,0 M, todos os grupos amino foram titulados. Este fato vem confirmar a hipótese de que no estado nativo, três destes grupos estão localizados numa região hidrofóbica. (ver tabela 27)

Quanto as constantes de dissociação, observa-se uma variação em todas elas, em relação aos valores obtidos em força iônica 0,10 M na ausência de uréia. Diferenças entre os pKa dos grupos carboxílicos da proteína nativa e desnaturada, são esperados, devido as mudanças de interação, tipo ligação hidrogênio. Diferenças mais consideráveis são esperadas para os grupos, localizados na molécula nativa, numa região inacessível a fase aquosa (26). Parece-nos que este é o caso dos grupos amino. (ver tabela 27)

De acordo com Léonis (43), o aumento da viscosidade da lisozima, que é observado quando da desnaturação com uréia, pode ser indicativo, entre outros fatores, do aumento da hidratação. Muitos pesquisadores acham que a uréia age destruindo a estrutura da água e portanto, deixando as moléculas dela mais livres para a hidratação (18). Este aumento de hidratação, pode ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças entre os valores das constantes de dissociação, dos grupos tituláveis, na proteína nativa e desnaturada.

Como vimos, no início deste capítulo é indicado que a lisozima, desnaturada com cloridrato de guanidina, deve apresentar três grupos carboxílicos tituláveis, a mais, em relação a proteína nativa. Estes três grupos teriam no estado nativo um pKa anormalmente baixo. Baseado nisto, a lisozima titulada por Tanford e Wagner (4), que apresenta no estado nativo, um valor 10,5 para a estequiometria dos carboxílicos, deveria ter

van e outros (27) acham que na lisozima usada por Tanford e Wagner (4), o número de grupos carboxílicos a mais, poderia ser devido a hidrólise de alguns grupos amida, durante a preparação da amostra. No nosso caso, apesar de termos encontrado 10,73 para a estequiometria dos carboxílicos, em força iônica 0,10 M, aquela hipótese está descartada, pois usamos em todas as titulações aqui efetuadas, lisozima do mesmo lote, e o valor obtido para o número de grupos carboxílicos, após desnaturação com cloridrato de guanidina foi 12,35.

Uma análise dos dados da tabela 28 leva-nos as seguintes conclusões: (1) a diferença entre o número de grupos carboxílicos titulados, no estado nativo e desnaturado é aproximadamente 1. (2) O valor do pKa obtido para HA_3^+ é bastante elevado para se considerar este grupo como imidazol, por isso assumimos HA_3^+ como α -amino. (3) Descartada a possibilidade do cloridrato de guanidina reagir com a proteína, produzindo novos grupos tituláveis, não presentes na proteína nativa, uma explicação possível é que o grupo titulado a mais, junto com os carboxílicos, seja o imidazol, com um pKa anormalmente baixo. Esta hipótese é fortalecida, pelo fato da separação das duas subclasses de carboxílicos, não corresponder ao número de resíduos aspárticos e glutâmicos, o que denota a presença de interações não eletrostáticas, que impedem que cada grupo titulável, comporte-se independentemente dos outros, com um pKa idêntico ao esperado, a partir de cálculos com modelos adequados (33).

Comparando a estequiometria do HA_4^+ em cloridrato de guanidina com o resultado obtido em uréia, podemos considerar que o valor obtido neste meio, corresponde a titulação de seis aminos da lisina e dois grupos fenólicos da tirosina.

Os valores dos pKa obtidos por Roxby e Tanford (28), que

$[A]/[HA]$). Para poder compara-los com os nossos valores, é necessário transforma-los em pKa concentração. Para fazer isto, basta adicionar a todos aqueles valores $\sim 0,58$, que é o $\log \gamma_{H^+}$ naquelas condições (17). Podemos verificar que existe uma razoável concordância entre os nossos resultados e os obtidos por eles, para os pKa dos grupos α -amino, α -COOH, γ -COOH e ϵ -amino. A maior discrepância em relação ao pKa dos grupos amino, provavelmente é devido ao fato, daqueles autores, indicarem os três grupos fenólicos com pKa diferente dos grupos amino, enquanto nós titulamos apenas dois grupos fenólicos com o mesmo pKa dos aminos. É possível que o nosso resultado seja uma média do pKa dos grupos amino mais fenólicos.

Comparando o número total de grupos titulados em uréia e cloridrato de guanidina, podemos observar que em uréia foi titulado 80 % do total titulado em cloridrato de guanidina. Léon^{is} (43) comparando os resultados da desnaturação da lisozima em uréia 10 M, com os obtidos em cloridrato de guanidina 5 M, indica que a variação da viscosidade em uréia, corresponde a 90 % da obtida em cloridrato de guanidina. Podemos considerar como boa a concordância entre estes resultados, se levamos em consideração o fato de que, devido a adição do HCl às soluções de lisozima, a concentração final da solução de uréia e cloridrato de guanidina é respectivamente 9,3 e 5,6 M.

Uma última observação a fazer, é que em uréia, os resultados obtidos estão melhores correlacionados, com a composição de aminoácidos da proteína, do que os obtidos em força iônica 0,10 M, 1,0 M e em cloridrato de guanidina. Observação semelhante a esta foi feita por Righetti e outros (44), quando da "titulação eletroforética" de cadeias peptídicas em uréia 8 M .

IV - TITULAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA

4.1 - TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA β -LACTOGLOBULINA NATIVA E DESNATURADA

O estudo da curva de titulação da β -lactoglobulina foi realizado pela primeira vez por Cannan e outros (45). Este trabalho junto com o da titulação da ovoalbumina (34), foram os primeiros trabalhos realizados sobre titulação de proteínas.

Nozaki e outros (46), reestudando esta titulação, apresentam uma interpretação dos resultados um pouco diferente da aquela dada por Cannan e colaboradores (45). Eles indicam que na região neutra de pH, são titulados 8 grupos; 4 imidazol, 2 α -amino e 2 carboxílicos anômalos, ao contrário dos 5,3 encontrados por Cannan e outros (45).

Os estudos de rotação ótica específica em função do pH, têm mostrado que a β -lactoglobulina nativa (N), sofre uma transição para uma nova conformação (R) perto de pH 7,5 a 25°C (47). Com base neste fato, Tanford e Taggart (48) propõem a seguinte explicação para a titulação de grupos carboxílicos na região neutra de pH : na conformação N os grupos carboxílicos anômalos encontram-se escondidos dentro da molécula da proteína. Na conformação R estes grupos são expostos ao solvente. Todos os carboxílicos expostos são ionizados no pH de transição.

TABELA 29

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,09471 g de β -lactoglobulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. I = 0,10M

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0,070	2,437	1,400	5,074	1,750	9,707
0,130	2,457	1,405	5,144	1,810	9,800
0,186	2,474	1,400	5,207	1,870	9,872
0,240	2,470	1,475	5,358	1,990	9,905
0,250	2,470	1,500	5,466	2,010	9,947
0,301	2,517	1,525	5,586	2,070	10,023
0,301	2,550	1,550	5,717	2,050	10,075
0,350	2,577	1,575	5,844	2,075	10,142
0,350	2,567	1,600	5,955	2,100	10,200
0,401	2,614	1,625	6,251	2,125	10,343
0,450	2,674	1,650	6,344	2,150	10,393
0,500	2,717	1,675	6,575	2,175	10,334
0,550	2,750	1,700	6,687	2,200	10,777
0,600	2,814	1,725	6,777	2,225	10,817
0,650	2,841	1,750	6,901	2,250	10,849
0,700	2,877	1,775	7,052	2,275	10,608
0,750	2,901	1,800	7,181	2,300	10,472
0,800	2,931	1,825	7,505	2,410	10,715
0,850	2,950	1,850	7,672	2,500	10,787
0,900	2,961	1,875	7,874	2,550	10,832
0,950	2,974	1,900	7,691	2,600	10,857
1,000	2,981	1,925	7,770	2,650	10,935
1,050	2,959	1,950	7,912	2,700	10,950
1,075	2,901	1,975	8,015	2,750	11,023
1,000	2,973	1,990	8,170	2,801	11,044
1,025	2,926	2,000	8,237	2,850	11,101
1,000	2,970	2,010	8,394	2,900	11,136
1,070	2,950	2,020	8,542	2,950	11,169
1,100	2,919	2,030	8,705	3,000	11,201
1,105	2,903	2,040	8,858	3,050	11,231
1,101	2,954	2,050	9,013		
1,170	2,917	2,060	9,162		
1,200	2,955	2,070	9,261		
1,205	2,914	2,080	9,352		
1,200	2,900	2,090	9,432		
1,205	2,959	2,100	9,505		
1,200	2,964	2,110	9,568		
1,205	2,939	2,120	9,624		
1,200	2,913	2,130	9,679		
1,205	2,976	2,140	9,717		

TABELA 30

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em força iônica 0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 29.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.627	8.047E-02	8.205E-02
0.100	2.659	7.418E-02	7.566E-02
0.150	2.694	6.774E-02	6.926E-02
0.200	2.730	6.155E-02	6.287E-02
0.250	2.770	5.516E-02	5.647E-02
0.301	2.813	4.879E-02	4.995E-02
0.350	2.858	4.264E-02	4.368E-02
0.400	2.908	3.634E-02	3.729E-02
0.450	2.962	3.011E-02	3.089E-02
0.500	3.021	2.388E-02	2.450E-02
0.550	3.084	1.778E-02	1.810E-02
0.600	3.154	1.158E-02	1.171E-02
0.650	3.230	5.390E-03	5.313E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.692

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999987

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.750	3.405	1.028E-04	1.018E-04
0.775	3.453	9.681E-05	9.582E-05
0.800	3.504	9.032E-05	8.985E-05
0.825	3.556	8.404E-05	8.389E-05
0.850	3.609	7.793E-05	7.792E-05
0.875	3.665	7.148E-05	7.195E-05
0.901	3.724	6.504E-05	6.574E-05
0.925	3.781	5.894E-05	6.001E-05
0.950	3.839	5.317E-05	5.404E-05
0.975	3.901	4.703E-05	4.807E-05
1.000	3.963	4.121E-05	4.210E-05
1.025	4.026	3.552E-05	3.613E-05
1.050	4.090	2.995E-05	3.016E-05
1.075	4.155	2.448E-05	2.419E-05
1.100	4.219	1.930E-05	1.822E-05
1.125	4.285	1.405E-05	1.225E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999521

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.176

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 2.38778E-4

Continuação da TABELA 30

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.325	4.838	2.705E-06	2.865E-06
1.350	4.913	2.633E-06	2.647E-06
1.376	4.996	2.481E-06	2.420E-06
1.400	5.076	2.299E-06	2.211E-06
1.425	5.164	2.077E-06	1.992E-06
1.450	5.257	1.837E-06	1.774E-06
1.475	5.358	1.582E-06	1.556E-06
1.500	5.466	1.330E-06	1.338E-06
1.525	5.586	1.078E-06	1.120E-06
1.550	5.717	8.441E-07	9.016E-07
1.575	5.866	6.239E-07	6.835E-07
1.600	6.035	4.261E-07	4.653E-07
1.625	6.231	2.487E-07	2.472E-07
1.650	6.461	8.573E-08	2.899E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997127

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.653

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 8.72659E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.740	7.554	2.851E-09	2.690E-09
1.751	7.681	2.377E-09	2.333E-09
1.760	7.790	1.996E-09	2.041E-09
1.770	7.912	1.615E-09	1.717E-09
1.780	8.036	1.274E-09	1.393E-09
1.790	8.170	9.475E-10	1.069E-09
1.800	8.282	7.188E-10	7.446E-10
1.810	8.396	5.033E-10	4.205E-10
1.820	8.548	2.222E-10	9.629E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.992653

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.823

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 3.24171E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.870	9.261	2.668E-11	2.642E-11
1.880	9.358	2.565E-11	2.574E-11
1.890	9.432	2.528E-11	2.507E-11
1.900	9.505	2.432E-11	2.439E-11
1.910	9.568	2.355E-11	2.372E-11
1.920	9.626	2.273E-11	2.304E-11
1.930	9.679	2.195E-11	2.237E-11
1.940	9.719	2.177E-11	2.169E-11
1.950	9.757	2.152E-11	2.102E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.987683

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.261

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 6.75455E-11

=====

TABELA 31

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,08857 g de β -lactoglobulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. I = 0,10M.

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.050	2.598	1.375	4.941	1.870	9.449
0.101	2.629	1.400	5.027	1.881	9.520
0.150	2.660	1.425	5.118	1.890	9.577
0.201	2.696	1.450	5.214	1.900	9.628
0.250	2.732	1.475	5.318	1.910	9.680
0.300	2.771	1.501	5.436	1.920	9.726
0.351	2.814	1.525	5.555	1.930	9.768
0.400	2.860	1.535	5.608	1.940	9.812
0.450	2.910	1.550	5.693	1.950	9.856
0.500	2.964	1.560	5.751	1.960	9.898
0.550	3.023	1.570	5.815	1.970	9.931
0.600	3.089	1.581	5.890	1.980	9.966
0.650	3.160	1.590	5.953	1.990	9.994
0.700	3.238	1.600	6.027	2.000	10.025
0.725	3.279	1.610	6.109	2.025	10.102
0.752	3.327	1.620	6.192	2.050	10.170
0.775	3.369	1.630	6.281	2.075	10.229
0.800	3.417	1.640	6.379	2.100	10.284
0.825	3.467	1.650	6.487	2.151	10.390
0.850	3.519	1.660	6.600	2.180	10.444
0.875	3.574	1.670	6.727	2.210	10.498
0.900	3.630	1.680	6.849	2.250	10.562
0.925	3.688	1.690	6.988	2.280	10.605
0.950	3.748	1.700	7.127	2.310	10.647
0.975	3.809	1.710	7.266	2.350	10.702
1.000	3.872	1.720	7.395	2.401	10.766
1.025	3.937	1.730	7.518	2.450	10.825
1.050	4.002	1.740	7.645	2.500	10.879
1.075	4.070	1.751	7.785	2.550	10.927
1.100	4.137	1.760	7.903	2.600	10.973
1.125	4.206	1.770	8.040	2.650	11.014
1.150	4.274	1.780	8.184	2.700	11.055
1.175	4.345	1.790	8.344	2.755	11.097
1.200	4.416	1.800	8.515	2.800	11.130
1.225	4.487	1.810	8.692	2.850	11.163
1.250	4.558	1.820	8.858	2.900	11.196
1.275	4.628	1.830	9.003		
1.300	4.703	1.840	9.144		
1.326	4.783	1.850	9.263		
1.350	4.858	1.860	9.365		

TABELA 32

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em força iônica 0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 31.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.598	8.745E-02	9.036E-02
0.101	2.629	8.103E-02	8.384E-02
0.150	2.660	7.500E-02	7.757E-02
0.201	2.696	6.844E-02	7.105E-02
0.250	2.732	6.233E-02	6.478E-02
0.300	2.771	5.619E-02	5.839E-02
0.351	2.814	4.991E-02	5.186E-02
0.400	2.860	4.373E-02	4.560E-02
0.450	2.910	3.757E-02	3.920E-02
0.500	2.964	3.149E-02	3.281E-02
0.550	3.023	2.542E-02	2.641E-02
0.600	3.089	1.924E-02	2.002E-02
0.650	3.160	1.319E-02	1.362E-02
0.700	3.238	7.106E-03	7.225E-03
0.725	3.279	4.105E-03	4.028E-03
0.752	3.327	7.328E-04	5.743E-04

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.756

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999981

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.850	3.519	7.905E-05	7.759E-05
0.875	3.574	7.363E-05	7.267E-05
0.900	3.630	6.837E-05	6.776E-05
0.925	3.688	6.304E-05	6.284E-05
0.950	3.748	5.767E-05	5.792E-05
0.975	3.809	5.245E-05	5.301E-05
1.000	3.872	4.723E-05	4.809E-05
1.025	3.937	4.202E-05	4.317E-05
1.050	4.002	3.711E-05	3.826E-05
1.075	4.070	3.212E-05	3.334E-05
1.100	4.137	2.749E-05	2.842E-05
1.125	4.206	2.289E-05	2.351E-05
1.150	4.274	1.857E-05	1.859E-05
1.175	4.345	1.416E-05	1.368E-05
1.200	4.416	9.899E-06	8.759E-06
1.225	4.487	5.746E-06	3.842E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.99908

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.245

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.96654E-4

=====

Continuação da TABELA 32

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.375	4.941	1.863E-06	1.992E-06
1.400	5.027	1.802E-06	1.813E-06
1.425	5.118	1.683E-06	1.634E-06
1.450	5.214	1.527E-06	1.454E-06
1.475	5.318	1.340E-06	1.275E-06
1.501	5.436	1.129E-06	1.089E-06
1.525	5.555	9.319E-07	9.167E-07
1.535	5.608	8.505E-07	8.450E-07
1.550	5.693	7.292E-07	7.374E-07
1.560	5.751	6.540E-07	6.657E-07
1.570	5.815	5.762E-07	5.940E-07
1.581	5.890	4.932E-07	5.151E-07
1.590	5.953	4.303E-07	4.506E-07
1.600	6.027	3.629E-07	3.789E-07
1.610	6.109	2.955E-07	3.072E-07
1.620	6.192	2.346E-07	2.355E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.996489

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.653

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 7.17045E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.710	7.266	3.677E-09	3.571E-09
1.720	7.395	3.195E-09	3.168E-09
1.730	7.518	2.747E-09	2.765E-09
1.740	7.645	2.291E-09	2.363E-09
1.751	7.785	1.834E-09	1.920E-09
1.760	7.903	1.485E-09	1.557E-09
1.770	8.040	1.124E-09	1.155E-09
1.780	8.184	7.894E-10	7.519E-10
1.790	8.344	4.564E-10	3.492E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997752

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.799

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 4.02721E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.860	9.365	2.733E-11	2.669E-11
1.870	9.449	2.588E-11	2.594E-11
1.881	9.520	2.515E-11	2.511E-11
1.890	9.577	2.422E-11	2.442E-11
1.900	9.628	2.371E-11	2.367E-11
1.910	9.680	2.285E-11	2.291E-11
1.920	9.726	2.216E-11	2.216E-11
1.930	9.768	2.155E-11	2.140E-11
1.940	9.812	2.064E-11	2.064E-11
1.950	9.856	1.962E-11	1.989E-11
1.960	9.898	1.862E-11	1.913E-11
1.970	9.931	1.807E-11	1.837E-11
1.980	9.966	1.732E-11	1.762E-11
1.990	9.994	1.691E-11	1.686E-11
2.000	10.025	1.625E-11	1.610E-11
2.025	10.102	1.439E-11	1.421E-11
2.050	10.170	1.276E-11	1.232E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997768

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.213

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 7.56443E-11

TABELA 33

Dados da titulação potenciométrica de 27,00 ml de solução contendo 0,08148 g de β -lactoglobulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. I = 0,10M.

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.050	2.981	1.120	7.001
0.101	3.047	1.130	7.155
0.150	3.121	1.140	7.304
0.200	3.205	1.150	7.432
0.250	3.297	1.160	7.573
0.300	3.397	1.170	7.700
0.350	3.510	1.180	7.840
0.400	3.631	1.190	7.980
0.450	3.762	1.200	8.119
0.475	3.833	1.210	8.285
0.500	3.903	1.220	8.468
0.525	3.972	1.230	8.634
0.550	4.044	1.240	8.833
0.575	4.121	1.250	8.995
0.601	4.198	1.260	9.138
0.625	4.271	1.270	9.272
0.650	4.345	1.280	9.380
0.675	4.425	1.291	9.471
0.700	4.505	1.301	9.543
0.725	4.582	1.310	9.604
0.750	4.663	1.320	9.663
0.775	4.744	1.330	9.713
0.800	4.830	1.340	9.764
0.825	4.918	1.350	9.808
0.851	5.015	1.360	9.846
0.876	5.112	1.370	9.882
0.901	5.218	1.380	9.917
0.925	5.330	1.395	9.972
0.950	5.452	1.410	10.019
0.960	5.508	1.430	10.082
0.970	5.566	1.450	10.140
0.980	5.625	1.475	10.207
0.990	5.685	1.500	10.266
1.000	5.751	1.525	10.324
1.010	5.822	1.550	10.371
1.020	5.898	1.575	10.423
1.030	5.974	1.600	10.471
1.040	6.056	1.650	10.560
1.050	6.148	1.702	10.650
1.060	6.237	1.750	10.719
1.070	6.346	1.800	10.787
1.080	6.459	1.850	10.848
1.090	6.576	1.901	10.907
1.100	6.712	1.960	10.957
1.110	6.844	2.000	11.008

TABELA 34

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em força iônica 0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 33.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.981	2.614E-02	2.803E-02
0.101	3.047	2.029E-02	2.151E-02
0.150	3.121	1.437E-02	1.524E-02
0.200	3.205	8.285E-03	8.847E-03
0.250	3.297	2.231E-03	2.452E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.269

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999935

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.350	3.510	7.106E-05	7.031E-05
0.400	3.631	6.080E-05	6.019E-05
0.450	3.762	5.005E-05	5.008E-05
0.475	3.833	4.436E-05	4.502E-05
0.500	3.903	3.916E-05	3.996E-05
0.525	3.972	3.436E-05	3.490E-05
0.550	4.044	2.945E-05	2.985E-05
0.575	4.121	2.430E-05	2.479E-05
0.601	4.198	1.950E-05	1.953E-05
0.625	4.271	1.508E-05	1.467E-05
0.650	4.345	1.078E-05	9.612E-06

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999419

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 0.698

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 2.02330E-4

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.851	5.015	1.827E-06	1.880E-06
0.876	5.112	1.686E-06	1.671E-06
0.901	5.218	1.496E-06	1.461E-06
0.925	5.330	1.284E-06	1.260E-06
0.950	5.452	1.068E-06	1.051E-06
0.960	5.508	9.723E-07	9.673E-07
0.970	5.566	8.788E-07	8.836E-07
0.980	5.625	7.906E-07	7.998E-07
0.990	5.685	7.077E-07	7.161E-07
1.000	5.751	6.222E-07	6.324E-07
1.010	5.822	5.379E-07	5.487E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO =-0.99855

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.076

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2= 8.37281E-6

Continuação da TABELA 34.

=====

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.160	7.573	2.649E-09	2.592E-09
1.170	7.700	2.186E-09	2.184E-09
1.180	7.840	1.714E-09	1.776E-09
1.190	7.980	1.310E-09	1.368E-09
1.200	8.119	9.680E-10	9.595E-10
1.210	8.285	6.035E-10	5.514E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.997746

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.224

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 4.08117E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.280	9.380	2.431E-11	2.403E-11
1.291	9.471	2.330E-11	2.320E-11
1.301	9.543	2.243E-11	2.244E-11
1.310	9.604	2.151E-11	2.176E-11
1.320	9.663	2.070E-11	2.100E-11
1.330	9.713	2.016E-11	2.024E-11
1.340	9.764	1.934E-11	1.949E-11
1.350	9.808	1.875E-11	1.873E-11
1.360	9.846	1.834E-11	1.797E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.994022

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 1.597

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 7.57435E-11

=====

TABELA 35

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,07200 g de β -lactoglobulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1203 M. I = 1,0 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.051	275.6	2.476	1.400	144.2	4.697
0.100	274.1	2.501	1.425	140.0	4.768
0.150	272.4	2.530	1.450	135.5	4.844
0.200	270.6	2.561	1.475	130.7	4.925
0.250	268.7	2.593	1.500	125.8	5.008
0.300	266.7	2.626	1.525	120.3	5.101
0.350	264.5	2.664	1.550	114.4	5.201
0.400	262.1	2.704	1.575	107.9	5.311
0.450	259.6	2.746	1.600	100.6	5.434
0.500	256.7	2.795	1.620	93.8	5.549
0.525	255.3	2.819	1.640	86.0	5.681
0.551	253.7	2.846	1.661	76.3	5.845
0.575	252.1	2.873	1.680	65.6	6.026
0.600	250.4	2.902	1.700	51.9	6.257
0.625	248.5	2.934	1.720	34.9	6.545
0.650	246.6	2.966	1.740	15.3	6.876
0.675	244.5	3.002	1.760	-4.2	7.206
0.700	242.4	3.037	1.780	-22.5	7.515
0.725	240.2	3.074	1.800	-40.4	7.817
0.751	237.6	3.118	1.820	-61.4	8.172
0.775	235.2	3.159	1.840	-88.6	8.632
0.800	232.5	3.205	1.860	-114.1	9.063
0.825	229.6	3.254	1.880	-130.8	9.345
0.850	226.6	3.304	1.900	-142.3	9.540
0.875	223.5	3.357	1.920	-150.8	9.683
0.900	220.2	3.412	1.940	-157.7	9.800
0.925	216.7	3.472	1.960	-163.5	9.897
0.950	213.2	3.531	1.980	-168.4	9.980
0.975	209.5	3.593	2.000	-172.7	10.053
1.000	205.9	3.654	2.025	-177.4	10.132
1.025	202.1	3.718	2.050	-181.5	10.201
1.051	198.1	3.786	2.075	-185.3	10.265
1.075	194.5	3.847	2.100	-188.5	10.319
1.100	190.7	3.911	2.125	-191.5	10.369
1.125	186.8	3.977	2.150	-193.8	10.408
1.150	183.0	4.041	2.175	-196.4	10.451
1.176	179.1	4.107	2.200	-198.7	10.490
1.200	175.4	4.170	2.225	-201.1	10.530
1.225	171.6	4.234	2.250	-203.2	10.565
1.250	167.8	4.298	2.275	-205.3	10.600
1.275	164.0	4.362	2.300	-207.2	10.632
1.300	160.2	4.427	2.325	-209.0	10.662
1.325	156.3	4.493	2.350	-210.7	10.691
1.350	152.4	4.558	2.375	-212.3	10.717
1.376	148.2	4.629	2.400	-213.9	10.744

Continuação da TABELA 35.

=====					
VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
2.425	-215.2	10.766	2.850	-236.3	11.114
2.450	-216.8	10.792	2.900	-238.0	11.142
2.475	-218.2	10.816	2.950	-239.7	11.170
2.500	-219.7	10.841	3.000	-241.4	11.198
2.525	-212.1	10.714	3.100	-244.4	11.246
2.550	-222.4	10.885	3.203	-247.2	11.292
2.575	-223.8	10.909	3.300	-249.5	11.328
2.600	-225.1	10.930	3.400	-251.8	11.365
2.625	-226.4	10.952	3.500	-253.9	11.399
2.650	-227.7	10.973	3.601	-255.8	11.429
2.700	-230.0	11.011	3.700	-257.6	11.457
2.750	-232.2	11.047	3.800	-259.3	11.484
2.800	-234.3	11.082	3.901	-260.8	11.508
=====					

TABELA 36

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em força iônica 1,0 M. Valores referentes aos dados da tabela 35.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.051	2.476	9.817E-02	9.890E-02
0.100	2.501	9.250E-02	9.301E-02
0.150	2.530	8.641E-02	8.700E-02
0.200	2.561	8.035E-02	8.098E-02
0.250	2.593	7.436E-02	7.497E-02
0.300	2.626	6.847E-02	6.895E-02
0.350	2.664	6.243E-02	6.294E-02
0.400	2.704	5.635E-02	5.692E-02
0.450	2.746	5.051E-02	5.091E-02
0.500	2.795	4.432E-02	4.489E-02
0.525	2.819	4.153E-02	4.188E-02
0.551	2.846	3.850E-02	3.875E-02
0.575	2.873	3.560E-02	3.587E-02
0.600	2.902	3.269E-02	3.286E-02
0.625	2.934	2.959E-02	2.985E-02
0.650	2.966	2.667E-02	2.685E-02
0.675	3.002	2.361E-02	2.384E-02
0.700	3.037	2.071E-02	2.083E-02
0.725	3.074	1.785E-02	1.782E-02
0.751	3.118	1.465E-02	1.469E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.873

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999994

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.900	3.412	5.816E-05	5.770E-05
0.925	3.472	5.411E-05	5.405E-05
0.950	3.531	5.045E-05	5.040E-05
0.975	3.593	4.649E-05	4.676E-05
1.000	3.654	4.302E-05	4.311E-05
1.025	3.718	3.921E-05	3.946E-05
1.051	3.786	3.530E-05	3.566E-05
1.075	3.847	3.199E-05	3.216E-05
1.100	3.911	2.853E-05	2.851E-05
1.125	3.977	2.498E-05	2.486E-05
1.150	4.041	2.165E-05	2.121E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999754

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.295

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.45964E-4

Continuação da TABELA 36.

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.450	4.844	2.296E-06	2.445E-06
1.475	4.925	2.193E-06	2.220E-06
1.500	5.008	2.050E-06	1.994E-06
1.525	5.101	1.847E-06	1.768E-06
1.550	5.201	1.621E-06	1.543E-06
1.575	5.311	1.375E-06	1.317E-06
1.600	5.434	1.122E-06	1.091E-06
1.620	5.549	9.112E-07	9.108E-07
1.640	5.681	7.061E-07	7.303E-07
1.661	5.845	5.012E-07	5.407E-07
1.680	6.026	3.286E-07	3.692E-07
1.700	6.257	1.667E-07	1.887E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.996156

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.721

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 9.02667E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.780	7.515	1.769E-09	1.763E-09
1.800	7.817	1.148E-09	1.159E-09
1.820	8.172	5.621E-10	5.562E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999857

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.838

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 3.01612E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.900	9.540	1.247E-11	1.195E-11
1.920	9.683	1.135E-11	1.112E-11
1.940	9.800	1.026E-11	1.029E-11
1.960	9.897	9.231E-12	9.466E-12
1.980	9.980	8.335E-12	8.640E-12
2.000	10.053	7.491E-12	7.813E-12
2.025	10.132	6.510E-12	6.779E-12
2.050	10.201	5.605E-12	5.746E-12
2.075	10.265	4.648E-12	4.712E-12
2.100	10.319	3.875E-12	3.679E-12
2.125	10.369	3.065E-12	2.646E-12

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.99536

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.189

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 4.13377E-11

=====

TABELA 37

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,07200 g de β -lactoglobulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1203 M. I = 1,0 M.

=====					
VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	276.6	2.476	1.630	92.4	5.590
0.100	275.0	2.503	1.650	84.2	5.728
0.150	273.3	2.532	1.675	71.8	5.938
0.200	271.6	2.561	1.700	55.8	6.208
0.250	269.7	2.593	1.725	34.7	6.565
0.300	267.6	2.628	1.750	9.6	6.989
0.350	265.5	2.664	1.760	-0.4	7.158
0.400	263.1	2.704	1.770	-9.9	7.319
0.450	260.6	2.746	1.780	-18.7	7.468
0.500	257.8	2.794	1.790	-28.0	7.625
0.550	254.7	2.846	1.800	-37.2	7.780
0.600	251.4	2.902	1.810	-46.6	7.939
0.650	247.7	2.965	1.820	-57.1	8.117
0.700	243.5	3.036	1.835	-76.0	8.436
0.750	238.9	3.113	1.846	-91.9	8.705
0.800	233.6	3.203	1.860	-109.9	9.009
0.850	227.8	3.301	1.880	-127.7	9.310
0.900	221.4	3.409	1.900	-139.8	9.514
0.925	218.0	3.467	1.920	-148.8	9.666
0.950	214.4	3.527	1.940	-155.9	9.786
0.975	210.8	3.588	1.960	-161.9	9.887
1.000	207.1	3.651	1.980	-166.9	9.972
1.025	203.4	3.713	2.000	-171.4	10.047
1.050	199.6	3.778	2.020	-175.3	10.113
1.075	195.8	3.842	2.040	-178.8	10.172
1.100	192.0	3.906	2.060	-182.0	10.226
1.125	188.1	3.972	2.080	-184.9	10.275
1.150	184.3	4.036	2.100	-187.6	10.320
1.175	180.6	4.099	2.125	-190.6	10.371
1.200	176.7	4.165	2.150	-193.5	10.419
1.225	172.9	4.229	2.175	-196.1	10.463
1.250	169.2	4.291	2.200	-198.4	10.502
1.275	165.4	4.356	2.250	-202.8	10.575
1.300	161.6	4.420	2.300	-206.9	10.644
1.351	153.6	4.555	2.350	-210.6	10.706
1.375	149.8	4.619	2.400	-213.8	10.759
1.400	145.7	4.689	2.450	-216.8	10.809
1.425	141.4	4.761	2.500	-219.6	10.856
1.450	137.0	4.836	2.550	-222.3	10.900
1.475	132.3	4.915	2.600	-224.9	10.943
1.500	127.4	4.998	2.650	-227.3	10.983
1.525	122.1	5.088	2.700	-229.6	11.021
1.550	116.3	5.186	2.750	-231.7	11.055
1.575	109.9	5.294	2.800	-233.7	11.088
1.600	102.6	5.417	2.850	-235.6	11.119
=====					

TABELA 38

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em força iônica 1,0 M. Valores referentes aos dados da tabela 37.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.476	9.819E-02	9.937E-02
0.100	2.503	9.215E-02	9.335E-02
0.150	2.532	8.609E-02	8.734E-02
0.200	2.561	8.039E-02	8.132E-02
0.250	2.593	7.440E-02	7.531E-02
0.300	2.628	6.822E-02	6.929E-02
0.350	2.664	6.248E-02	6.328E-02
0.400	2.704	5.640E-02	5.726E-02
0.450	2.746	5.057E-02	5.125E-02
0.500	2.794	4.458E-02	4.523E-02
0.550	2.846	3.856E-02	3.922E-02
0.600	2.902	3.275E-02	3.320E-02
0.650	2.965	2.689E-02	2.719E-02
0.700	3.036	2.094E-02	2.117E-02
0.750	3.113	1.510E-02	1.516E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.876

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999993

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.900	3.409	5.781E-05	5.751E-05
0.925	3.467	5.422E-05	5.397E-05
0.950	3.527	5.032E-05	5.042E-05
0.975	3.588	4.674E-05	4.687E-05
1.000	3.651	4.309E-05	4.333E-05
1.025	3.713	3.960E-05	3.978E-05
1.050	3.778	3.602E-05	3.623E-05
1.075	3.842	3.254E-05	3.269E-05
1.100	3.906	2.915E-05	2.914E-05
1.125	3.972	2.567E-05	2.560E-05
1.150	4.036	2.243E-05	2.205E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999825

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.305

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.41843E-4

Continuação da TABELA 38

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.450	4.836	2.193E-06	2.366E-06
1.475	4.915	2.122E-06	2.154E-06
1.500	4.998	1.998E-06	1.942E-06
1.525	5.088	1.824E-06	1.730E-06
1.550	5.186	1.614E-06	1.519E-06
1.575	5.294	1.380E-06	1.307E-06
1.600	5.417	1.130E-06	1.095E-06
1.630	5.590	8.296E-07	8.405E-07
1.650	5.728	6.328E-07	6.711E-07
1.675	5.938	4.046E-07	4.592E-07
1.700	6.208	2.030E-07	2.473E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.993535

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.729

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 8.47446E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.780	7.468	1.699E-09	1.675E-09
1.790	7.625	1.404E-09	1.410E-09
1.800	7.780	1.127E-09	1.145E-09
1.810	7.939	8.686E-10	8.806E-10
1.820	8.117	6.117E-10	6.157E-10
1.835	8.436	2.360E-10	2.184E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999493

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.843

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 2.64877E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.900	9.514	1.211E-11	1.166E-11
1.920	9.666	1.103E-11	1.084E-11
1.940	9.786	1.003E-11	1.002E-11
1.960	9.887	9.019E-12	9.201E-12
1.980	9.972	8.164E-12	8.381E-12
2.000	10.047	7.272E-12	7.562E-12
2.020	10.113	6.487E-12	6.742E-12
2.040	10.172	5.739E-12	5.922E-12
2.060	10.226	5.004E-12	5.102E-12
2.080	10.275	4.310E-12	4.283E-12
2.100	10.320	3.616E-12	3.463E-12
2.125	10.371	2.836E-12	2.438E-12

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.996484

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.184

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 4.09858E-11

=====

TABELA 39

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,10503 g de β -lactoglobulina em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1274M.
I = 0,10 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	161.5	2.624	1.620	-10.9	5.549
0.100	159.7	2.655	1.631	-19.1	5.688
0.150	157.9	2.686	1.640	-26.3	5.809
0.200	156.0	2.719	1.650	-34.5	5.948
0.250	154.1	2.752	1.665	-47.7	6.171
0.300	152.0	2.788	1.680	-61.1	6.398
0.350	149.7	2.827	1.690	-70.0	6.548
0.401	147.4	2.867	1.700	-78.3	6.688
0.450	145.0	2.908	1.710	-86.1	6.820
0.501	142.4	2.953	1.720	-93.3	6.942
0.550	139.8	2.997	1.730	-99.7	7.050
0.600	137.0	3.045	1.740	-105.6	7.150
0.651	133.9	3.098	1.750	-110.9	7.239
0.700	130.9	3.149	1.760	-115.8	7.322
0.750	127.6	3.205	1.770	-120.3	7.398
0.800	124.2	3.263	1.780	-124.4	7.468
0.850	120.6	3.324	1.790	-128.2	7.532
0.900	116.9	3.387	1.800	-131.7	7.591
0.950	112.9	3.455	1.825	-139.8	7.728
1.000	108.8	3.524	1.850	-147.2	7.853
1.050	104.6	3.596	1.875	-153.8	7.965
1.100	99.9	3.675	1.900	-159.9	8.068
1.151	95.1	3.756	1.925	-165.5	8.162
1.200	90.0	3.843	1.950	-170.7	8.250
1.251	84.3	3.939	1.975	-175.6	8.333
1.300	78.3	4.041	2.000	-180.2	8.411
1.325	75.0	4.097	2.050	-188.7	8.555
1.355	70.8	4.168	2.075	-192.7	8.622
1.375	67.7	4.220	2.101	-196.6	8.688
1.400	63.6	4.289	2.151	-203.9	8.812
1.425	59.2	4.364	2.200	-210.5	8.923
1.450	54.3	4.447	2.250	-217.1	9.035
1.475	48.8	4.540	2.300	-223.4	9.142
1.500	42.4	4.648	2.350	-229.6	9.247
1.510	39.7	4.694	2.400	-235.6	9.348
1.520	36.7	4.744	2.450	-241.5	9.448
1.531	33.1	4.805	2.500	-247.2	9.545
1.540	30.0	4.858	2.550	-252.6	9.637
1.550	26.4	4.918	2.600	-257.9	9.727
1.560	22.4	4.986	2.650	-262.9	9.812
1.570	18.0	5.060	2.700	-267.5	9.890
1.580	13.2	5.142	2.800	-275.8	10.032
1.590	7.9	5.231	2.900	-282.5	10.146
1.600	2.2	5.328	3.000	-288.2	10.244
1.610	-3.9	5.431	3.100	-292.9	10.325

Continuação da TABELA 39

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
3.200	-296.9	10.395	4.000	-315.8	10.727
3.305	-300.5	10.457	4.100	-317.2	10.752
3.403	-303.5	10.509	4.201	-318.6	10.777
3.501	-306.0	10.553	4.300	-319.8	10.799
3.600	-308.4	10.595	4.400	-321.0	10.820
3.701	-310.5	10.632	4.500	-322.1	10.840
3.801	-312.4	10.666	4.607	-323.2	10.860
3.908	-314.3	10.700	4.700	-324.1	10.877

TABELA 40

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em uréia 9,3 M. Valores relativos aos dados da tabela 39.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.624	5.432E-02	6.049E-02
0.100	2.655	4.838E-02	5.412E-02
0.150	2.686	4.273E-02	4.775E-02
0.200	2.719	3.704E-02	4.138E-02
0.250	2.752	3.160E-02	3.501E-02
0.300	2.788	2.585E-02	2.864E-02
0.350	2.827	1.983E-02	2.227E-02
0.401	2.867	1.408E-02	1.577E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.525

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999953

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.750	3.205	2.892E-04	2.848E-04
0.800	3.263	2.701E-04	2.661E-04
0.850	3.324	2.500E-04	2.474E-04
0.900	3.387	2.303E-04	2.287E-04
0.950	3.455	2.092E-04	2.101E-04
1.000	3.524	1.891E-04	1.914E-04
1.050	3.596	1.699E-04	1.727E-04
1.100	3.675	1.493E-04	1.540E-04
1.151	3.756	1.305E-04	1.349E-04
1.200	3.843	1.120E-04	1.166E-04
1.251	3.939	9.366E-05	9.758E-05
1.300	4.041	7.663E-05	7.927E-05
1.325	4.097	6.822E-05	6.993E-05
1.355	4.168	5.841E-05	5.872E-05
1.375	4.220	5.172E-05	5.124E-05
1.400	4.289	4.360E-05	4.190E-05
1.425	4.364	3.571E-05	3.256E-05
1.450	4.447	2.777E-05	2.322E-05
1.475	4.540	1.976E-05	1.388E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999229

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.512

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 3.73667E-4

Continuação da TABELA 40

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.590	5.231	4.602E-07	4.585E-07
1.600	5.328	4.099E-07	4.029E-07
1.610	5.431	3.541E-07	3.473E-07
1.620	5.549	2.899E-07	2.917E-07
1.631	5.688	2.221E-07	2.305E-07
1.640	5.809	1.694E-07	1.804E-07
1.650	5.948	1.167E-07	1.249E-07
1.665	6.171	4.210E-08	4.143E-08
1.680	6.398	-2.885E-08	-4.198E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.998804

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.672

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 5.56070E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.720	6.942	4.262E-09	4.248E-09
1.730	7.050	3.869E-09	3.840E-09
1.740	7.150	3.427E-09	3.432E-09
1.750	7.239	3.002E-09	3.024E-09
1.760	7.322	2.580E-09	2.616E-09
1.770	7.398	2.177E-09	2.208E-09
1.780	7.468	1.801E-09	1.800E-09
1.790	7.532	1.439E-09	1.392E-09

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999567

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.824

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 4.08011E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.000	8.411	6.536E-10	6.477E-10
2.050	8.555	5.979E-10	5.888E-10
2.075	8.622	5.651E-10	5.594E-10
2.101	8.688	5.322E-10	5.289E-10
2.151	8.812	4.646E-10	4.701E-10
2.200	8.923	4.036E-10	4.124E-10
2.250	9.035	3.414E-10	3.536E-10
2.300	9.142	2.838E-10	2.948E-10
2.350	9.247	2.282E-10	2.360E-10
2.400	9.348	1.758E-10	1.772E-10
2.450	9.448	1.249E-10	1.184E-10
2.500	9.545	7.572E-11	5.956E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.998918

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.551

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 1.17621E-9

=====

TABELA 41

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,10638 g de β -lactoglobulina em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1274M.

I = 0,10 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	157.2	2.622	1.620	2.1	5.255
0.100	155.5	2.652	1.640	-10.0	5.459
0.150	153.7	2.683	1.660	-24.3	5.701
0.200	151.9	2.714	1.680	-40.5	5.975
0.250	149.9	2.748	1.700	-58.1	6.272
0.300	147.8	2.784	1.710	-67.0	6.423
0.350	145.7	2.821	1.720	-75.7	6.570
0.400	143.4	2.860	1.730	-84.2	6.714
0.450	141.0	2.901	1.740	-92.3	6.851
0.500	138.6	2.942	1.750	-99.5	6.972
0.550	136.0	2.987	1.760	-106.3	7.087
0.600	133.2	3.035	1.770	-112.2	7.187
0.650	130.3	3.084	1.780	-117.8	7.282
0.700	127.3	3.135	1.790	-122.7	7.364
0.750	124.1	3.190	1.800	-127.2	7.441
0.800	120.8	3.246	1.810	-131.6	7.515
0.850	117.3	3.305	1.820	-135.5	7.581
0.900	113.7	3.367	1.830	-139.2	7.643
0.950	109.9	3.431	1.840	-142.7	7.703
1.000	105.9	3.499	1.850	-146.0	7.758
1.025	103.9	3.533	1.860	-149.1	7.811
1.052	101.5	3.573	1.870	-152.1	7.861
1.075	99.5	3.607	1.880	-155.0	7.910
1.100	97.3	3.645	1.890	-157.7	7.956
1.125	95.0	3.684	1.900	-160.3	8.000
1.150	92.7	3.723	1.920	-165.3	8.085
1.175	90.3	3.763	1.940	-170.0	8.164
1.200	87.7	3.807	1.960	-174.3	8.237
1.225	85.1	3.851	1.980	-178.4	8.306
1.250	82.4	3.897	2.000	-182.2	8.370
1.276	79.5	3.946	2.020	-185.8	8.431
1.300	76.6	3.995	2.040	-189.3	8.490
1.325	73.5	4.048	2.060	-192.6	8.546
1.350	70.3	4.102	2.080	-195.8	8.600
1.375	66.8	4.161	2.100	-198.9	8.653
1.400	63.0	4.225	2.125	-202.6	8.715
1.425	59.0	4.293	2.150	-206.2	8.776
1.450	54.6	4.367	2.175	-209.7	8.835
1.475	49.8	4.448	2.200	-213.1	8.893
1.500	44.3	4.541	2.225	-216.3	8.947
1.525	38.1	4.646	2.250	-219.6	9.003
1.551	30.7	4.771	2.275	-222.7	9.055
1.570	24.3	4.880	2.301	-225.9	9.109
1.585	18.5	4.978	2.325	-228.8	9.159
1.600	12.1	5.086	2.350	-231.8	9.209

Continuação da TABELA 41.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
2.375	-234.8	9.260	2.750	-274.3	9.931
2.400	-237.8	9.311	2.775	-276.3	9.965
2.425	-240.7	9.360	2.800	-278.3	9.999
2.451	-243.6	9.409	2.850	-282.0	10.062
2.475	-246.4	9.457	2.900	-285.4	10.121
2.500	-249.3	9.506	2.950	-288.5	10.174
2.525	-252.0	9.552	3.000	-291.3	10.222
2.550	-254.8	9.599	3.101	-296.2	10.306
2.575	-257.5	9.645	3.200	-300.3	10.377
2.600	-260.1	9.689	3.302	-303.9	10.440
2.625	-262.7	9.733	3.400	-307.0	10.494
2.650	-265.2	9.776	3.500	-309.8	10.543
2.675	-267.6	9.817	3.600	-312.2	10.585
2.700	-269.9	9.856	3.700	-314.4	10.624
2.725	-272.2	9.895	3.800	-316.4	10.659

TABELA 42

Resultados da linearização da curva de titulação da β -lactoglobulina em uréia 9,3 M. Valores relativos aos dados da tabela 41.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.622	5.328E-02	5.905E-02
0.100	2.652	4.759E-02	5.268E-02
0.150	2.683	4.183E-02	4.631E-02
0.200	2.714	3.632E-02	3.994E-02
0.250	2.748	3.046E-02	3.357E-02
0.300	2.784	2.459E-02	2.720E-02
0.350	2.821	1.894E-02	2.083E-02
0.400	2.860	1.305E-02	1.446E-02
0.450	2.901	7.142E-03	8.090E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.513

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.99997

PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.750	3.190	3.139E-04	3.078E-04
0.800	3.246	2.934E-04	2.879E-04
0.850	3.305	2.717E-04	2.680E-04
0.900	3.367	2.505E-04	2.480E-04
0.950	3.431	2.288E-04	2.281E-04
1.000	3.499	2.070E-04	2.082E-04
1.025	3.533	1.968E-04	1.982E-04
1.052	3.573	1.844E-04	1.874E-04
1.075	3.607	1.747E-04	1.783E-04
1.100	3.645	1.645E-04	1.683E-04
1.125	3.684	1.542E-04	1.583E-04
1.150	3.723	1.444E-04	1.484E-04
1.175	3.763	1.346E-04	1.384E-04
1.200	3.807	1.243E-04	1.284E-04
1.225	3.851	1.147E-04	1.185E-04
1.250	3.897	1.052E-04	1.085E-04
1.276	3.946	9.572E-05	9.815E-05
1.300	3.995	8.669E-05	8.858E-05
1.325	4.048	7.773E-05	7.861E-05
1.350	4.102	6.916E-05	6.865E-05
1.375	4.161	6.040E-05	5.868E-05
1.400	4.225	5.163E-05	4.872E-05
1.425	4.293	4.320E-05	3.875E-05
1.450	4.367	3.472E-05	2.878E-05
1.475	4.448	2.632E-05	1.882E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.998939

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.522

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 3.98643E-4

=====

Continuação da TABELA 42.

=====

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.585	4.978	6.945E-07	7.316E-07
1.600	5.086	6.564E-07	6.381E-07
1.620	5.255	5.463E-07	5.135E-07
1.640	5.459	3.992E-07	3.889E-07
1.660	5.701	2.517E-07	2.643E-07
1.680	5.975	1.254E-07	1.396E-07
1.700	6.272	1.775E-08	1.501E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.996072

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.702

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 6.23137E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.760	7.087	3.529E-09	3.487E-09
1.770	7.187	3.117E-09	3.094E-09
1.780	7.282	2.666E-09	2.702E-09
1.790	7.364	2.274E-09	2.310E-09
1.800	7.441	1.899E-09	1.918E-09
1.810	7.515	1.497E-09	1.525E-09
1.820	7.581	1.142E-09	1.133E-09
1.830	7.643	7.869E-10	7.408E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999369

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.849

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 3.92277E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.000	8.370	6.161E-10	6.264E-10
2.020	8.431	6.050E-10	6.049E-10
2.040	8.490	5.880E-10	5.835E-10
2.060	8.546	5.693E-10	5.620E-10
2.080	8.600	5.480E-10	5.405E-10
2.100	8.653	5.253E-10	5.191E-10
2.125	8.715	4.968E-10	4.922E-10
2.150	8.776	4.671E-10	4.654E-10
2.175	8.835	4.372E-10	4.386E-10
2.200	8.893	4.078E-10	4.118E-10
2.225	8.947	3.808E-10	3.849E-10
2.250	9.003	3.514E-10	3.581E-10
2.275	9.055	3.249E-10	3.313E-10
2.301	9.109	2.974E-10	3.034E-10
2.325	9.159	2.727E-10	2.776E-10
2.350	9.209	2.472E-10	2.508E-10
2.375	9.260	2.218E-10	2.239E-10
2.400	9.311	1.966E-10	1.971E-10
2.425	9.360	1.726E-10	1.703E-10
2.451	9.409	1.491E-10	1.424E-10
2.475	9.457	1.258E-10	1.166E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999391

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.584

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 1.07324E-9

=====

teína, quando KCl ou CaCl_2 é adicionado. Por outro lado a conclusão de Cannan e outros (45), é de que o ponto iso-iônico é independente da força iônica. Se é assumido que o ponto iso-iônico, é independente da força iônica, então a variação de pH observada, quando a proteína é dissolvida em soluções aquosas de KCl, de diferentes concentrações, deve-se ao fato da proteína, apresentar diferente número de prótons dissociados, dependendo da força iônica (46).

Quanto a estabilidade das soluções de β -lactoglobulina, Groves e outros (49) indicam que elas sofrem desnaturação irreversível em meio alcalino. Acima de pH 9,5; o processo de desnaturação dura algumas horas, já perto de pH 10; a velocidade de desnaturação é apreciável. Os efeitos do pH, sobre a desnaturação desta proteína, são parcialmente consistentes com a idéia, de que a desnaturação está associada com a ionização de grupos amino. Em uréia, a desnaturação ocorre instantaneamente, em soluções de concentração superior a 6 M (50).

4.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 29 a 42 estão os dados da titulação da β -lactoglobulina em força iônica 0,10 M, 1,0 M e em uréia, e os resultados obtidos da linearização da curva de titulação. Os dados da tabela 29, correspondem a titulação de uma solução de proteína após ser mantida em refrigerador por dez dias. Os resultados da linearização da curva desta titulação, mostram que a solução permaneceu estável durante este período, pelo menos em relação aos grupos tituláveis. (ver tabela 30)

Durante a titulação em força iônica 0,10 e 1,0 M, como era esperado, na região alcalina o pH não permaneceu tão estável quanto na região ácida. Por isto, nesta região, as leituras de pH foram feitas logo após a adição da base. Mesmo as-

sim, no cálculo dos grupos amino, quando era usado pontos após pH 10, o volume de equivalência obtido, variava em função do número de pontos tomados e era muito discordante do valor calculado pelo método de Gran (23), para o excesso de base. Devido a isto, no cálculo destes grupos foi somente utilizado pontos até aproximadamente pH 10.

As figuras 05, 06 e 07 mostram um exemplo das curvas de titulação linearizadas, em força iônica 0,10 M, 1,0 M e em uréia. As funções F_{HCl} , F_{HA1} , F_{HA2} e F_{HA4} correspondem a titulação do excesso de ácido forte, das duas subclasses de grupos carboxílicos e dos grupos amino respectivamente. F_{HA3} para a titulação em força iônica 0,10 e 1,0 M corresponde a titulação do imidazol mais α -amino mais grupos carboxílicos anômalos. Na titulação em solução de uréia, F_{HA3} corresponde a titulação do imidazol mais α -amino.

As tabelas 43, 44 e 45 mostram o número de grupos titulados por mol de β -lactoglobulina e o respectivo pKa em força iônica 0,10 M, 1,0 M e em solução de uréia 9,3 M. Nestas tabelas os dados são comparados com outros dados da literatura. Infelizmente, não dispomos de uma sequência de aminoácidos bem estabelecida, para poder comparar os nossos resultados. A mais nova de que temos conhecimento, feita por Frank e Braunitzer (51) para a variante A, apresenta dúvidas quanto ao número de resíduos aspártico e glutâmico.

A análise de aminoácidos (52) indica um total de 52 grupos carboxílicos ($2 \alpha\text{-COOH} + 50 \beta \text{ e } \gamma\text{-COOH}$), enquanto que os resultados de Nozaki e outros (46) mostram um total de 53 grupos ($2 \alpha\text{-COOH} + 49 \beta \text{ e } \gamma\text{-COOH} + 2$ carboxílicos anômalos). Os resultados aqui obtidos mostram que em força iônica 0,1 M foram titulados 48 grupos carboxílicos (46 normais + 2 anômalos) e em força iônica 1,0 M 51 (50 normais + 1 anômalo). Estes resultados estão de acordo com a conclusão de Cannan e outros (

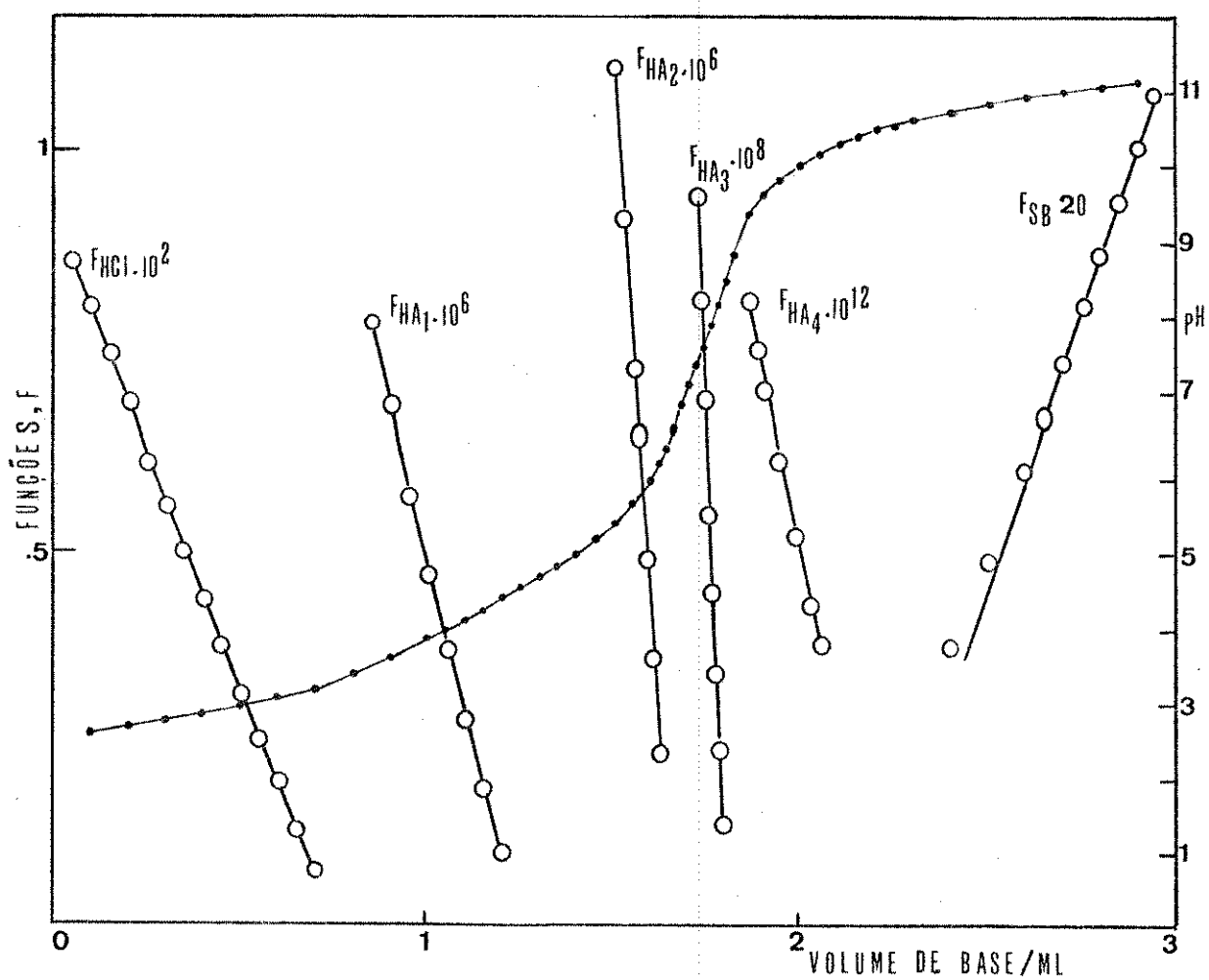


Figura 05 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,08857 g de β -Lacto - globulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1279 M. $I = 0,10$ M.

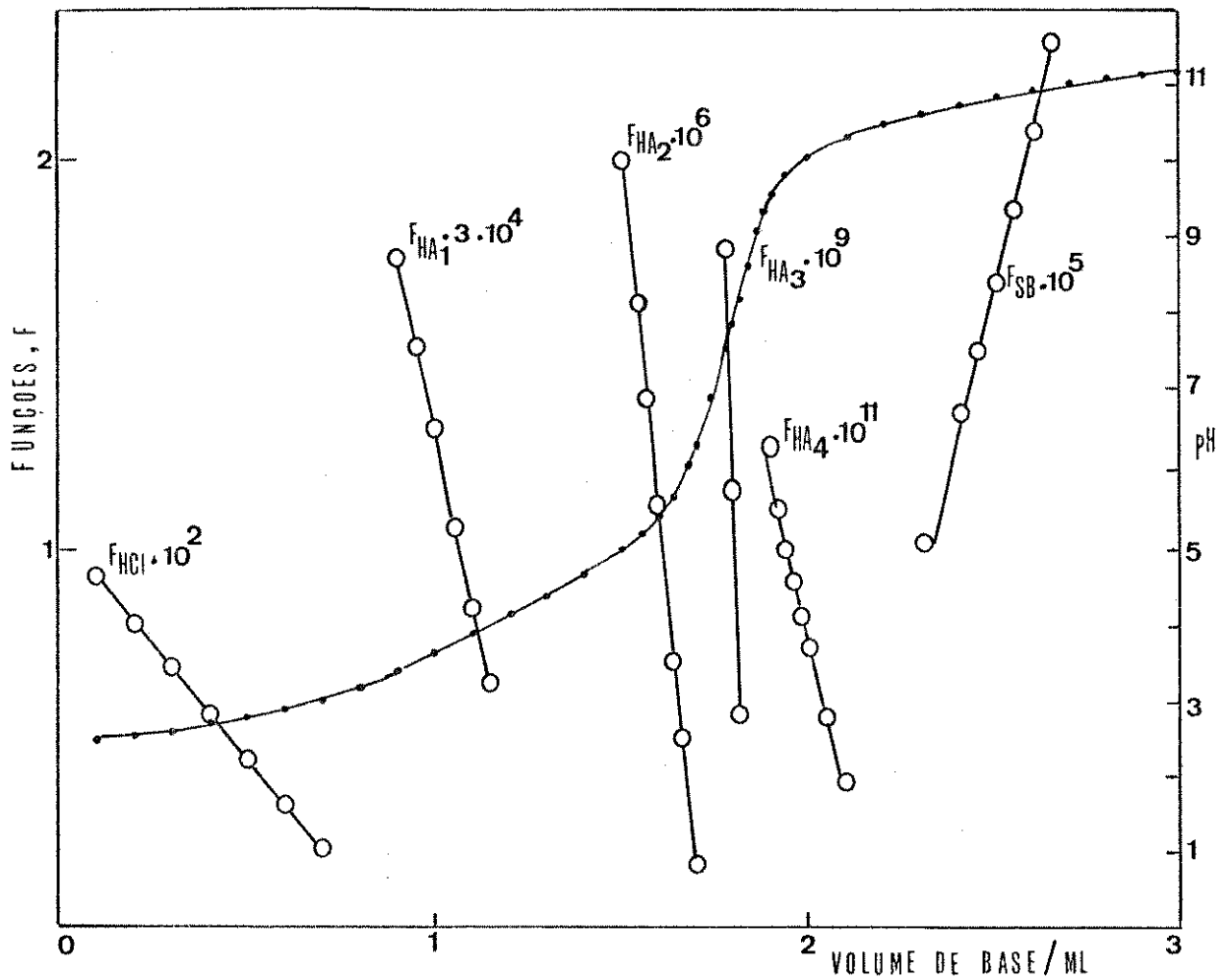


Figura 06 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,07200 g de β -lacto-globulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1203 M. $I = 1,0$ M.

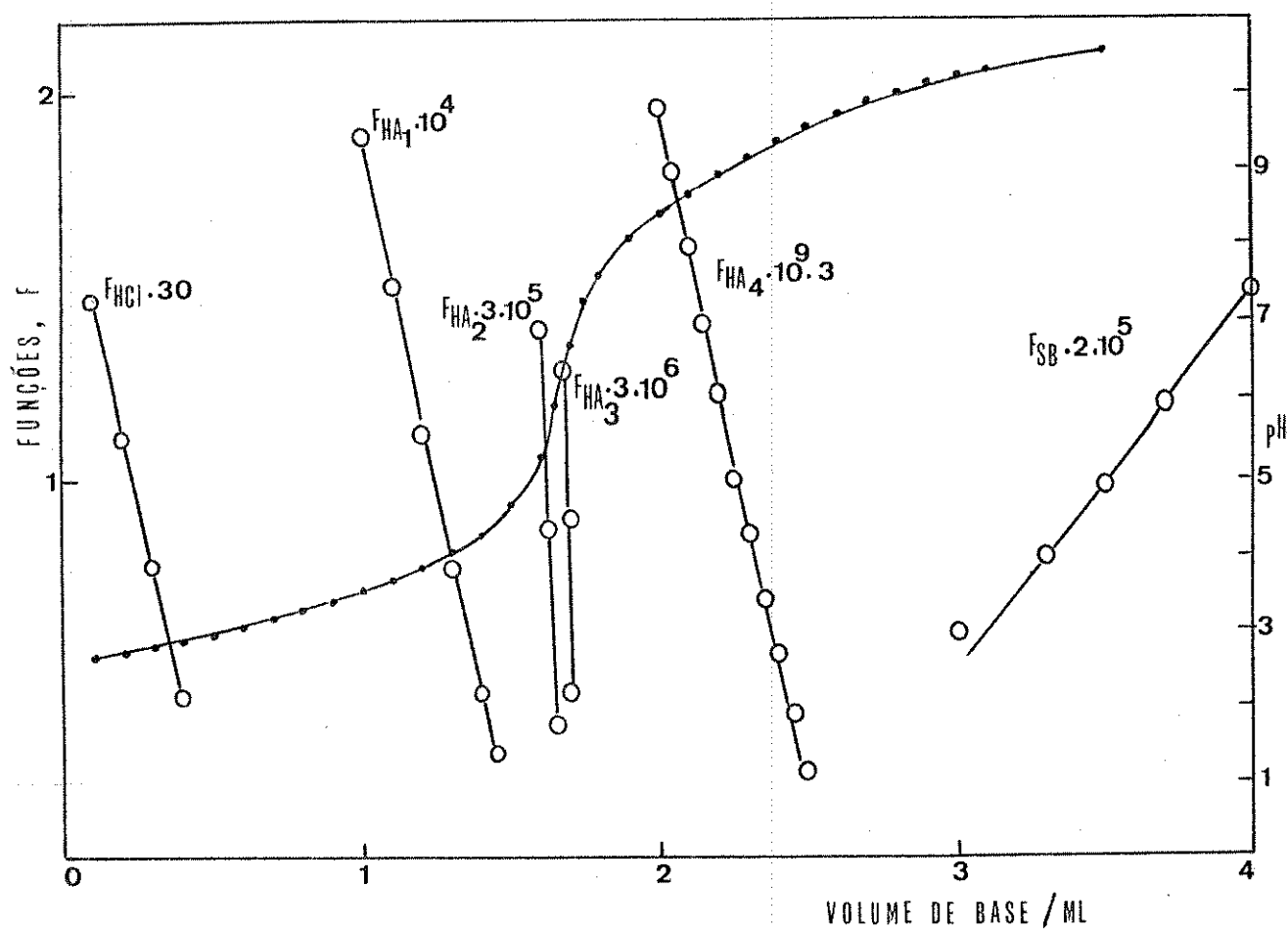


Figura 07 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,10500 g de β -lacto - globulina em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1274 M. $I = 0,10M$.

TABELA 43

Valores obtidos para estequiometria dos grupos
tituláveis da β -Lactoglobulina Nativa

Número de moles do grupo titulado por mol de lac- toglobulina (a).					
	Este trabalho (b)		Outras re- ferências (c)	(d)	Análise Aminoácido (e)
	I = 0,10 M	I = 1,0 M			
Carboxílicos					
HA ₁	23,85 ± 0,65	25,24 ± 0,21	-	-	-
HA ₂	21,93 ± 0,94	25,21 ± 0,06	-	-	-
Total	45,88	50,45	51	51,5	50
Imidazol +				5,3	4
ε-Amino +					2
Carboxílico (anormal)					2
HA ₃ ⁺	8,01 ± 0,14	6,85 ± 0,09	8		
ε-Amino					
HA ₄ ⁺	21,01 ± 0,01	20,53 ± 0,30	28	30,2	28

(a) Peso Molecular usado nos cálculos - 35500.

(b) Média de três determinações.

(c) Dados da referência (46).

(d) Dados da referência (45).

(e) Dados da referência (52).

TABELA 44

Valores obtidos para o pKa dos grupos tituláveis
da β -Lactoglobulina Nativa.

	Este trabalho ^a		Outra re ^b ferência
	I = 0,10 M	I = 1,0 M	I = 0,15 M
Carboxílicos			
HA ₁	3,66 ± 0,04	3,85 ± 0,01	-
HA ₂	5,09 ± 0,03	5,06 ± 0,01	-
Total			4,69
Imidazol + α -Amino + Carboxílico (anormal)			
HA ₃ ⁺	7,44 ± 0,05	7,55 ± 0,03	7,45
ϵ -Amino			
HA ₄ ⁺	10,16 ± 0,01	10,39 ± 0,01	9,95

(a) Média de três determinações.

(b) Dados da referência (46).

TABELA 45

Valores obtidos para estequiometria e pKa dos grupos tituláveis da Lactoglobulina em Uréia 9,3 M.

=====			
	Número de moles do grupo titulado por mol de β -lac- toglobulina (a)		Valor do pKa
	Este trabalho (b)	Análise Aminoácido (c)	Este trabalho (b)
	I = 0,10 M		I = 0,10 M
Carboxílicos			
HA ₁	42,70 ± 0,20	-	3,42 ± 0,02
HA ₂	7,27 ± 0,38	-	5,23 ± 0,02
Total	49,97	52	
Imidazol +			
α-Amino			
HA ₃ ⁺	6,40 ± 0,15	6	7,40 ± 0,01
ε-Amino			
HA ₄ ⁺	28,46 ± 0,02	30 - 28 ^d	8,95 ± 0,02
=====			

(a) Peso Molecular usado nos cálculos - 35500.

(b) Média de duas determinações.

(c) Dados da referência (52).

(d) Dado da referência (46).

45), de que o ponto iso-iônico é independente da força iônica. Fato este que corresponde a admitir, como afirmaram Nozaki e outros (46), que o decréscimo de pH das soluções de β -lactoglobulina, com o aumento da concentração de KCl, observada por eles, é devido ao diferente número de prótons dissociados dependendo da força iônica.

Em uréia, os nossos resultados apresentam um total de 50 grupos carboxílicos titulados, deixando de existir os grupos anômalos em virtude das modificações provocadas pela desnaturação. Parece que aqui também, semelhante ao que ocorreu no caso da lisozima, não foram titulados ou foram titulados juntos com o excesso de ácido forte, os α -COOH. Neste meio a separação das duas subclasses de carboxílicos é completamente diferente daquela conseguida em força iônica 0,10 e 1,0 M. Provavelmente deve corresponder ao número de resíduos aspártico e glutâmico, como aconteceu no caso da lisozima. As dúvidas existentes na sequência de aminoácidos impede-nos de comprovar isto. Achamos que é importante esclarecer se a separação das duas subclasses de carboxílicos, concordante com o número de resíduos aspártico e glutâmico, obtida na titulação da lisozima em uréia, foi mera coincidência ou será sempre uma característica das titulações de proteínas neste meio. Estudos neste sentido já estão em andamento utilizando proteínas de sequência de aminoácidos bem conhecidas. A importância disto, reside no fato da possibilidade de utilização deste método de titulação, como uma alternativa na sequenciação de proteínas, para determinação dos resíduos aspártico e glutâmico, principalmente em casos como o da β -lactoglobulina, onde os métodos convencionais levam a resultados duvidosos.

Quanto ao número de grupos titulados na região alcalina, como aconteceu com a lisozima, não titulamos os grupos fenólicos, o que está de acordo com os resultados de Cannan e outros (45). Já em relação aos grupos amino, obtivemos em for-

ça iônica 0,10 e 1,0 M, um número de moles inferior aos relatados por Nozaki e outros (46) e Cannan e outros (45). Mas na titulação em solução de uréia, a estequiometria dos amino é bem concordante com aqueles valores e com os da análise de aminoácidos (52). As observações feitas em relação a titulação dos grupos amino e fenólicos na lisozima, são válidas aqui.

Em relação aos valores dos pKa obtidos em força iônica 0,10 e 1,0 M, vemos que diferentemente do que ocorreu no caso da lisozima, eles são, em geral, maiores em força iônica 1,0M. Isto provavelmente é devido a quantidade diferente de ions K^+ , ligados a proteína em força iônica 0,10 e 1,0 M. Tanford (2) indica que em força iônica 0,15 M, a correção devido a ligação dos ions K^+ a β -lactoglobulina, aumente de 0,15 unidades os valores dos pKa.

Na titulação em uréia, observa-se que os valores das constantes de dissociação, são menores em relação aos obtidos em força iônica 0,10 M sem uréia, exceto o pKa do grupo HA_2 . Aqui a concentração dos ions K^+ é a mesma que em força iônica 0,10 M. Portanto, a diferença nas constantes de dissociação deve-se as modificações provocadas pela desnaturação. Como no caso da lisozima, verifica-se também aqui, uma variação mais acentuada na constante de dissociação dos grupos amino.

V - TITULAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA

5.1 - TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA IMUNOGLOBULINA HUMANA (IgG1) NATIVA E DESNATURADA

Quando uma substância estranha antigênica é introduzida no corpo, o sistema imune do corpo responderá especificamente com a produção de proteínas capazes de reconhecer os grupos determinantes do correspondente antígeno. A proteína é chamada de anticorpo.

Nos seres humanos são conhecidas cinco classes de proteínas com atividade anticórpica, denominadas imunoglobulinas. A imunoglobulina G, IgG, quantitativamente é a mais importante das imunoglobulinas séricas e possui quatro subclasses antigenicamente distintas, das quais a IgG1 é a subclasse que representa 70 % da IgG total. A heterogeneidade das imunoglobulinas nos soros normais tornou bastante difícil o seu estudo estrutural. No entanto, a ocorrência de imunoglobulinas homogêneas no sangue e urina de pacientes com mielomatose, propiciou uma fonte de obtenção de grandes quantidades de material para o estudo da estrutura de imunoglobulinas.

A principal função da IgG é neutralizar vírus e toxinas bacterianas, e ligar e opsonizar bactérias (isto é, facilitar sua fagocitose e eliminação). A IgG é a única imunoglobulina humana capaz de atravessar a placenta e representa por isso, o mecanismo de defesa mais importante contra infecções nos primeiros meses de vida da criança.

Em face da indiscutível importância destas proteínas, a-

chamos que seria interessante titular a IgG1, já que as informações obtidas da linearização da curva de titulação podem ser útil na elucidação de sua estrutura e propriedades.

É sabido a partir dos trabalhos de Porter e Edelman (53), que a molécula de uma imunoglobulina é composta de quatro cadeias peptídicas, duas idênticas cadeias leves e duas idênticas cadeias pesadas. Cada cadeia pesada está ligada a cadeia leve por ligações dissulfeto e os dois pares idênticos estão ligados um ao outro por ligações dissulfeto, formando a molécula completa, como mostra a figura 08.

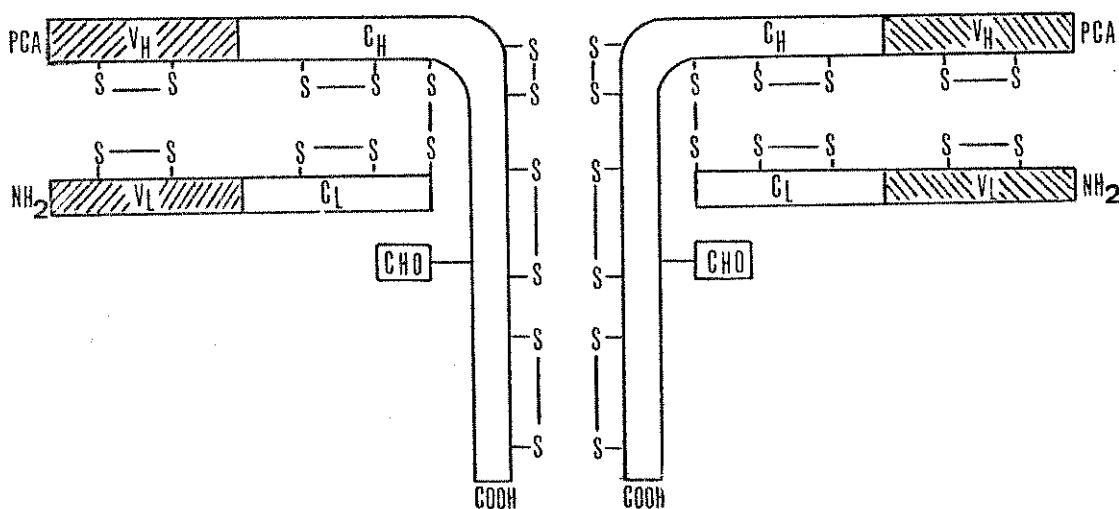


Fig. 08 - Arranjo completo de cadeias e ligações dissulfeto da IgG1 EU (55). PCA: ácido pirrolideno-carboxílico. CHO : carboidrato. V_H : região variável da cadeia pesada. V_L : região variável da cadeia leve. C_L : região constante da cadeia leve. C_H : região constante da cadeia pesada.

TABELA 46

Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,10190 g de imunoglobulina, IgG1 (JJ0) na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1137M.

I = 0,10 M.

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.100	2.362	1.930	6.025	2.425	10.259
0.200	2.397	1.940	6.130	2.450	10.338
0.300	2.434	1.950	6.229	2.475	10.409
0.400	2.473	1.960	6.318	2.500	10.475
0.500	2.516	1.970	6.402	2.525	10.534
0.600	2.563	1.980	6.480	2.550	10.586
0.700	2.614	1.990	6.553	2.575	10.637
0.800	2.672	2.000	6.623	2.600	10.680
0.900	2.735	2.010	6.692	2.625	10.723
1.000	2.808	2.020	6.757	2.650	10.761
1.100	2.891	2.030	6.820	2.675	10.797
1.200	2.988	2.040	6.883	2.700	10.832
1.300	3.104	2.050	6.946	2.725	10.864
1.400	3.244	2.060	7.008	2.750	10.894
1.501	3.423	2.071	7.077	2.775	10.922
1.526	3.476	2.080	7.133	2.800	10.950
1.550	3.531	2.090	7.196	2.850	11.000
1.575	3.594	2.100	7.265	2.900	11.045
1.600	3.662	2.120	7.412	2.950	11.087
1.625	3.738	2.140	7.579	3.000	11.126
1.650	3.822	2.160	7.782		
1.675	3.913	2.181	8.058		
1.701	4.018	2.200	8.381		
1.720	4.105	2.220	8.739		
1.740	4.204	2.240	9.038		
1.760	4.314	2.260	9.276		
1.780	4.436	2.270	9.380		
1.800	4.570	2.280	9.471		
1.810	4.646	2.290	9.554		
1.820	4.727	2.301	9.641		
1.830	4.811	2.310	9.706		
1.840	4.904	2.320	9.773		
1.850	5.009	2.330	9.835		
1.860	5.117	2.340	9.892		
1.870	5.239	2.350	9.944		
1.880	5.369	2.360	9.994		
1.890	5.505	2.371	10.047		
1.901	5.658	2.380	10.086		
1.910	5.781	2.390	10.127		
1.920	5.907	2.400	10.168		

TABELA 47

Resultados da linearização da curva de titulação
da imunoglobulina, IgG1 (JJ0), em força iônica
0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 46.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

VOLUME	PARA HCL		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	2.362	1.529E-01	1.484E-01
0.200	2.397	1.409E-01	1.370E-01
0.300	2.434	1.290E-01	1.256E-01
0.400	2.473	1.174E-01	1.143E-01
0.500	2.516	1.057E-01	1.029E-01
0.600	2.563	9.390E-02	9.151E-02
0.700	2.614	8.231E-02	8.014E-02
0.800	2.672	7.044E-02	6.877E-02
0.900	2.735	5.897E-02	5.740E-02
1.000	2.808	4.725E-02	4.603E-02
1.100	2.891	3.567E-02	3.466E-02
1.200	2.988	2.410E-02	2.329E-02
1.300	3.104	1.247E-02	1.192E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 1.405

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999992

VOLUME	PARA ACIDO HA1		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.526	3.476	1.611E-04	1.597E-04
1.550	3.531	1.448E-04	1.441E-04
1.575	3.594	1.276E-04	1.279E-04
1.600	3.662	1.109E-04	1.116E-04
1.625	3.738	9.409E-05	9.535E-05
1.650	3.822	7.769E-05	7.909E-05
1.675	3.913	6.219E-05	6.283E-05
1.701	4.018	4.664E-05	4.592E-05
1.720	4.105	3.524E-05	3.357E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999674

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.772

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 6.50391E-4

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.820	4.727	1.269E-06	1.337E-06
1.830	4.811	1.196E-06	1.191E-06
1.840	4.904	1.081E-06	1.044E-06
1.850	5.009	9.315E-07	8.974E-07
1.860	5.117	7.815E-07	7.508E-07
1.870	5.239	6.142E-07	6.041E-07
1.880	5.369	4.498E-07	4.575E-07
1.890	5.505	2.924E-07	3.109E-07
1.901	5.658	1.276E-07	1.496E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO =-0.9965

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.911

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2= 1.46630E-5

Continuação da TABELA 47

=====

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.970	6.402	2.808E-08	2.896E-08
1.980	6.480	2.743E-08	2.768E-08
1.990	6.553	2.653E-08	2.640E-08
2.000	6.623	2.543E-08	2.512E-08
2.010	6.692	2.413E-08	2.384E-08
2.020	6.757	2.286E-08	2.256E-08
2.030	6.820	2.158E-08	2.127E-08
2.040	6.883	2.022E-08	1.999E-08
2.050	6.946	1.883E-08	1.871E-08
2.060	7.008	1.748E-08	1.743E-08
2.071	7.077	1.599E-08	1.602E-08
2.080	7.133	1.483E-08	1.487E-08
2.090	7.196	1.356E-08	1.359E-08
2.100	7.265	1.218E-08	1.231E-08
2.120	7.412	9.520E-09	9.743E-09
2.140	7.579	6.968E-09	7.181E-09
2.160	7.782	4.511E-09	4.618E-09
2.181	8.058	2.075E-09	1.928E-09

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.999335

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 2.196

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 1.28123E-7

=====

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.240	9.038	4.258E-11	4.063E-11
2.260	9.276	3.383E-11	3.372E-11
2.270	9.380	2.950E-11	3.026E-11
2.280	9.471	2.582E-11	2.681E-11
2.290	9.554	2.243E-11	2.335E-11
2.301	9.641	1.868E-11	1.955E-11
2.310	9.706	1.588E-11	1.645E-11
2.320	9.773	1.294E-11	1.299E-11
2.330	9.835	1.016E-11	9.538E-12
2.340	9.892	7.555E-12	6.084E-12

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.995549

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.358

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 3.45421E-10

=====

TABELA 48

Dados da titulação potenciométrica da 30,00 ml de solução contendo 0,10190 g de imunoglobulina, IgG1(JJO) na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1137 M.

I = 0,10 M.

VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH	VOLUME/ML	PH
0.050	2.345	1.675	3.924	2.200	8.362
0.100	2.362	1.701	4.030	2.210	8.545
0.150	2.378	1.720	4.118	2.220	8.721
0.200	2.396	1.740	4.219	2.230	8.882
0.250	2.414	1.760	4.330	2.240	9.027
0.300	2.433	1.780	4.456	2.250	9.152
0.350	2.453	1.800	4.594	2.260	9.266
0.400	2.473	1.820	4.754	2.270	9.372
0.450	2.494	1.840	4.938	2.280	9.464
0.500	2.516	1.860	5.157	2.290	9.547
0.550	2.539	1.881	5.431	2.300	9.625
0.600	2.563	1.900	5.687	2.310	9.697
0.650	2.588	1.920	5.934	2.320	9.763
0.700	2.614	1.930	6.044	2.330	9.824
0.750	2.642	1.940	6.148	2.340	9.882
0.800	2.672	1.950	6.241	2.350	9.935
0.850	2.703	1.960	6.328	2.361	9.989
0.900	2.736	1.970	6.411	2.370	10.030
0.950	2.771	1.980	6.487	2.380	10.072
1.000	2.808	1.990	6.558	2.395	10.134
1.050	2.848	2.000	6.628	2.400	10.152
1.100	2.891	2.010	6.694	2.410	10.190
1.150	2.937	2.020	6.756	2.420	10.226
1.201	2.989	2.030	6.819	2.430	10.260
1.250	3.043	2.040	6.881	2.440	10.292
1.300	3.105	2.050	6.942	2.450	10.323
1.325	3.137	2.060	7.004	2.460	10.352
1.350	3.171	2.070	7.068	2.470	10.380
1.375	3.206	2.080	7.130	2.480	10.407
1.400	3.244	2.090	7.195	2.490	10.433
1.425	3.285	2.100	7.260	2.500	10.458
1.450	3.329	2.110	7.331	2.510	10.481
1.475	3.378	2.120	7.405	2.520	10.504
1.500	3.425	2.130	7.483	2.540	10.548
1.525	3.480	2.140	7.568	2.560	10.589
1.550	3.538	2.150	7.662	2.580	10.628
1.575	3.602	2.160	7.768	2.600	10.664
1.600	3.671	2.170	7.887	2.620	10.698
1.625	3.747	2.180	8.025	2.640	10.730
1.650	3.831	2.190	8.184	2.660	10.761

TABELA 49

Resultados da linearização da curva de titulação
da imunoglobulina, IgG1 (JJ0), em força iônica

0,10 M. Valores relativos aos dados da tabela 48.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

VOLUME	PARA HCL		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.345	1.598E-01	1.561E-01
0.100	2.362	1.537E-01	1.504E-01
0.150	2.378	1.481E-01	1.447E-01
0.200	2.396	1.420E-01	1.390E-01
0.250	2.414	1.362E-01	1.333E-01
0.300	2.433	1.302E-01	1.277E-01
0.350	2.453	1.242E-01	1.220E-01
0.400	2.473	1.184E-01	1.163E-01
0.450	2.494	1.125E-01	1.106E-01
0.500	2.516	1.067E-01	1.049E-01
0.550	2.539	1.008E-01	9.923E-02
0.600	2.563	9.499E-02	9.355E-02
0.650	2.588	8.921E-02	8.786E-02
0.700	2.614	8.350E-02	8.218E-02
0.750	2.642	7.766E-02	7.649E-02
0.800	2.672	7.174E-02	7.081E-02
0.850	2.703	6.598E-02	6.512E-02
0.900	2.736	6.022E-02	5.944E-02
0.950	2.771	5.448E-02	5.375E-02
1.000	2.808	4.882E-02	4.807E-02
1.050	2.848	4.310E-02	4.238E-02
1.100	2.891	3.740E-02	3.670E-02
1.150	2.937	3.177E-02	3.101E-02
1.201	2.989	2.590E-02	2.522E-02
1.250	3.043	2.032E-02	1.964E-02
1.300	3.105	1.448E-02	1.396E-02
1.325	3.137	1.168E-02	1.112E-02
1.350	3.171	8.842E-03	8.274E-03
1.375	3.206	6.071E-03	5.431E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 1.423

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999975

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.500	3.425	1.568E-04	1.541E-04
1.525	3.480	1.417E-04	1.406E-04
1.550	3.538	1.274E-04	1.271E-04
1.575	3.602	1.127E-04	1.136E-04
1.600	3.671	9.860E-05	1.000E-04
1.625	3.747	8.462E-05	8.652E-05
1.650	3.831	7.094E-05	7.300E-05
1.675	3.924	5.770E-05	5.948E-05
1.701	4.030	4.474E-05	4.542E-05
1.720	4.118	3.531E-05	3.515E-05
1.740	4.219	2.577E-05	2.433E-05
1.760	4.330	1.651E-05	1.352E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999302

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.785

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 5.40765E-4

Continuação da TABELA 49

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.820	4.754	8.796E-07	9.407E-07
1.840	4.938	8.017E-07	7.488E-07
1.860	5.157	6.036E-07	5.569E-07
1.881	5.431	3.473E-07	3.554E-07
1.900	5.687	1.428E-07	1.732E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.987217

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.918

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 9.59387E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.970	6.411	2.431E-08	2.639E-08
1.980	6.487	2.432E-08	2.527E-08
1.990	6.558	2.397E-08	2.414E-08
2.000	6.628	2.322E-08	2.302E-08
2.010	6.694	2.237E-08	2.190E-08
2.020	6.756	2.149E-08	2.077E-08
2.030	6.819	2.040E-08	1.965E-08
2.040	6.881	1.926E-08	1.853E-08
2.050	6.942	1.809E-08	1.741E-08
2.060	7.004	1.686E-08	1.628E-08
2.070	7.068	1.556E-08	1.516E-08
2.080	7.130	1.436E-08	1.404E-08
2.090	7.195	1.311E-08	1.291E-08
2.100	7.260	1.192E-08	1.179E-08
2.110	7.331	1.066E-08	1.067E-08
2.120	7.405	9.421E-09	9.543E-09
2.130	7.483	8.221E-09	8.420E-09
2.140	7.568	7.026E-09	7.296E-09
2.150	7.662	5.842E-09	6.173E-09
2.160	7.768	4.675E-09	5.050E-09
2.170	7.887	3.561E-09	3.927E-09
2.180	8.025	2.481E-09	2.804E-09

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.99605

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 2.205

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 1.12319E-7

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.230	8.882	3.437E-11	3.614E-11
2.240	9.027	3.417E-11	3.370E-11
2.250	9.152	3.242E-11	3.127E-11
2.260	9.266	2.973E-11	2.883E-11
2.270	9.372	2.659E-11	2.640E-11
2.280	9.464	2.386E-11	2.396E-11
2.290	9.547	2.132E-11	2.152E-11
2.300	9.625	1.876E-11	1.909E-11
2.310	9.697	1.633E-11	1.665E-11
2.320	9.763	1.407E-11	1.421E-11
2.330	9.824	1.194E-11	1.178E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.995566

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.378

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 2.43650E-10

TABELA 50

Dados da titulação potenciométrica de 22,00 ml de solução contendo imunoglobulina, IgG1 (JJ0), em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1137M.
I = 0,10 M.

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
0.050	188.9	2.384	1.540	-0.3	5.601
0.100	187.6	2.407	1.560	-6.3	5.703
0.150	186.1	2.434	1.580	-12.8	5.813
0.200	184.5	2.462	1.600	-19.6	5.928
0.250	182.9	2.490	1.620	-27.3	6.058
0.300	181.2	2.519	1.640	-36.1	6.207
0.351	179.3	2.553	1.660	-46.6	6.384
0.400	177.4	2.586	1.680	-59.6	6.604
0.450	175.2	2.624	1.700	-75.2	6.867
0.500	173.0	2.662	1.710	-83.4	7.006
0.550	170.6	2.703	1.720	-91.1	7.136
0.600	168.0	2.748	1.730	-98.0	7.253
0.650	165.2	2.797	1.750	-110.0	7.456
0.700	162.2	2.848	1.770	-119.4	7.615
0.750	158.8	2.906	1.790	-127.4	7.750
0.800	155.2	2.968	1.800	-130.9	7.809
0.850	151.2	3.036	1.820	-137.3	7.917
0.900	146.8	3.111	1.840	-143.1	8.015
0.925	144.4	3.152	1.850	-145.8	8.061
0.950	141.8	3.197	1.860	-148.2	8.101
0.975	139.2	3.241	1.870	-150.6	8.142
1.000	136.4	3.288	1.880	-152.9	8.181
1.025	133.3	3.341	1.890	-155.2	8.220
1.050	130.1	3.395	1.900	-157.3	8.255
1.075	126.7	3.453	1.910	-159.4	8.291
1.100	123.1	3.514	1.920	-161.4	8.325
1.125	119.1	3.582	1.931	-163.6	8.362
1.150	114.8	3.655	1.940	-165.3	8.391
1.175	110.2	3.733	1.950	-167.1	8.421
1.200	105.1	3.819	1.960	-168.9	8.451
1.225	99.1	3.921	1.970	-170.6	8.480
1.250	93.0	4.024	1.980	-172.3	8.509
1.275	86.1	4.141	1.990	-174.0	8.538
1.300	78.3	4.273	2.000	-175.6	8.565
1.320	71.6	4.386	2.010	-177.2	8.592
1.340	64.4	4.508	2.020	-178.8	8.619
1.360	57.2	4.629	2.030	-180.3	8.644
1.380	50.0	4.751	2.040	-181.9	8.671
1.400	43.0	4.869	2.060	-184.9	8.722
1.420	36.3	4.983	2.080	-187.9	8.773
1.440	29.7	5.094	2.100	-190.8	8.822
1.460	23.4	5.201	2.120	-193.5	8.867
1.480	17.5	5.301	2.140	-196.3	8.915
1.500	11.6	5.400	2.160	-199.0	8.961
1.520	5.7	5.500	2.180	-201.6	9.005

Continuação da TABELA 50

VOLUME/ML	FEM/MV	PH	VOLUME/ML	FEM/MV	PH
2.200	-204.2	9.049	2.500	-239.2	9.642
2.220	-206.6	9.093	2.550	-244.2	9.727
2.240	-209.3	9.135	2.600	-249.1	9.810
2.260	-211.7	9.175	2.650	-253.6	9.887
2.280	-214.2	9.218	2.700	-257.6	9.955
2.300	-216.6	9.258	2.751	-261.5	10.021
2.321	-219.1	9.301	2.800	-264.8	10.078
2.340	-221.4	9.340	2.850	-268.0	10.133
2.360	-223.7	9.379	2.900	-270.8	10.181
2.380	-226.0	9.418	2.950	-273.4	10.225
2.400	-228.3	9.457	3.000	-275.8	10.267
2.420	-230.5	9.494	3.100	-280.1	10.341
2.440	-232.7	9.531	3.200	-283.8	10.405
2.460	-234.9	9.569	3.300	-287.0	10.461
2.480	-237.1	9.606	3.400	-289.9	10.511

TABELA 51

Resultados da linearização da curva de titulação da imunoglobulina, IgG1 (JJ0), em uréia. Valores relativos aos dados da tabela 50.

=====

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS

VOLUME	PARA HCL		
	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.050	2.384	8.572E-02	9.516E-02
0.100	2.407	8.097E-02	8.948E-02
0.150	2.434	7.573E-02	8.379E-02
0.200	2.462	7.044E-02	7.811E-02
0.250	2.470	6.544E-02	7.242E-02
0.300	2.519	6.042E-02	6.674E-02
0.351	2.553	5.514E-02	6.094E-02
0.400	2.586	5.017E-02	5.537E-02
0.450	2.624	4.479E-02	4.968E-02
0.500	2.662	3.977E-02	4.400E-02
0.550	2.703	3.466E-02	3.831E-02
0.600	2.748	2.951E-02	3.263E-02
0.650	2.797	2.438E-02	2.694E-02
0.700	2.848	1.929E-02	2.126E-02
0.750	2.906	1.397E-02	1.557E-02
0.800	2.968	8.788E-03	9.890E-03

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HCL = 0.887

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999989

PARA ACIDO HA1

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.000	3.288	1.601E-04	1.597E-04
1.025	3.341	1.474E-04	1.475E-04
1.050	3.395	1.353E-04	1.353E-04
1.075	3.453	1.232E-04	1.231E-04
1.100	3.514	1.112E-04	1.109E-04
1.125	3.582	9.850E-05	9.865E-05
1.150	3.655	8.601E-05	8.643E-05
1.175	3.733	7.391E-05	7.421E-05
1.200	3.819	6.176E-05	6.199E-05
1.225	3.921	4.889E-05	4.978E-05
1.250	4.024	3.768E-05	3.756E-05
1.275	4.141	2.647E-05	2.534E-05

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-0.999938

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA1 = 1.327

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 4.88714E-4

PARA ACIDO HA2

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.420	4.983	9.955E-07	9.914E-07
1.440	5.094	9.258E-07	9.164E-07
1.460	5.201	8.468E-07	8.414E-07
1.480	5.301	7.704E-07	7.663E-07

=====

Continuação da TABELA 51

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.500	5.400	6.893E-07	6.913E-07
1.520	5.500	6.087E-07	6.163E-07
1.540	5.601	5.293E-07	5.413E-07
1.560	5.703	4.557E-07	4.663E-07
1.580	5.813	3.809E-07	3.913E-07
1.600	5.928	3.112E-07	3.163E-07
1.620	6.058	2.415E-07	2.413E-07
1.640	6.207	1.740E-07	1.662E-07
1.660	6.384	1.079E-07	9.123E-08

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.99954

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA2 = 1.684

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA2 = 3.75065E-6

PARA ACIDO HA3

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.720	7.136	1.987E-09	2.013E-09
1.730	7.253	1.900E-09	1.864E-09
1.750	7.456	1.571E-09	1.567E-09
1.770	7.615	1.263E-09	1.269E-09
1.790	7.750	9.566E-10	9.714E-10
1.800	7.809	8.160E-10	8.225E-10
1.820	7.917	5.387E-10	5.248E-10

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.99932

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA3 = 1.855

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA3 = 1.48849E-8

PARA ACIDO HA4

VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.030	8.644	3.719E-10	3.848E-10
2.040	8.671	3.689E-10	3.781E-10
2.060	8.722	3.627E-10	3.646E-10
2.080	8.773	3.528E-10	3.512E-10
2.100	8.822	3.415E-10	3.378E-10
2.120	8.867	3.308E-10	3.244E-10
2.140	8.915	3.169E-10	3.110E-10
2.160	8.961	3.031E-10	2.976E-10
2.180	9.005	2.894E-10	2.842E-10
2.200	9.049	2.750E-10	2.707E-10
2.220	9.093	2.599E-10	2.573E-10
2.240	9.135	2.455E-10	2.439E-10
2.260	9.175	2.319E-10	2.305E-10
2.280	9.218	2.169E-10	2.171E-10
2.300	9.258	2.029E-10	2.037E-10
2.321	9.301	1.882E-10	1.896E-10
2.340	9.340	1.744E-10	1.768E-10
2.360	9.379	1.611E-10	1.634E-10
2.380	9.418	1.477E-10	1.500E-10
2.400	9.457	1.342E-10	1.366E-10
2.420	9.494	1.216E-10	1.232E-10
2.440	9.531	1.089E-10	1.098E-10
2.460	9.569	9.617E-11	9.636E-11
2.480	9.606	8.332E-11	8.295E-11

COEFICIENTE DE CORRELACAO = -0.998881

VOLUME DE EQUIVALENCIA P/HA4 = 2.604

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4 = 6.70708E-10

TABELA 52

Valores obtidos para estequiometria e pKa dos grupos tituláveis da Imunoglobulina IgG1 (JJ0).

=====					
	Número de moles do grupo titulado por mol de IgG1 (a).		Valor do pKa		
	Este trabalho		Proteína	Este trabalho	
	(b)	(c)	EU (d)	(b)	(c)
	I = 0,10 M s/uréia	I = 0,10 M c/uréia		I = 0,10M s/uréia	I = 0,10M c/uréia
Carboxílicos					
HA ₁	61,01 ± 0,42	72,88 ± 0,08		3,23 ± 0,04	3,30 ± 0,04
HA ₂	22,76 ± 0,50	59,12 ± 0,08		4,93 ± 0,09	5,42 ± 0,01
Total	83,77	132,00	120		
Imidazol + α-amino					
HA ₃ ⁺	47,87 ± 0,17 ^e	28,53 ± 0,17	24	6,93 ± 0,02	7,83 ± 0,01
Amino					
HA ₄ ⁺	28,04 ± 0,93	115,58 ± 0,17 ^f	90	9,54 ± 0,07	9,18 ± 0,01
Fenólicos	-	-	48		
=====					

(a) Peso Molecular usado nos cálculos - 150 000.

(b) Média de duas determinações.

(c) Valor de uma determinação.

(d) Dados da sequência de aminoácidos, referência (55).

(e) Imidazol + α-amino + carboxílicos anômalos.

(f) Provavelmente aminos + fenólicos.

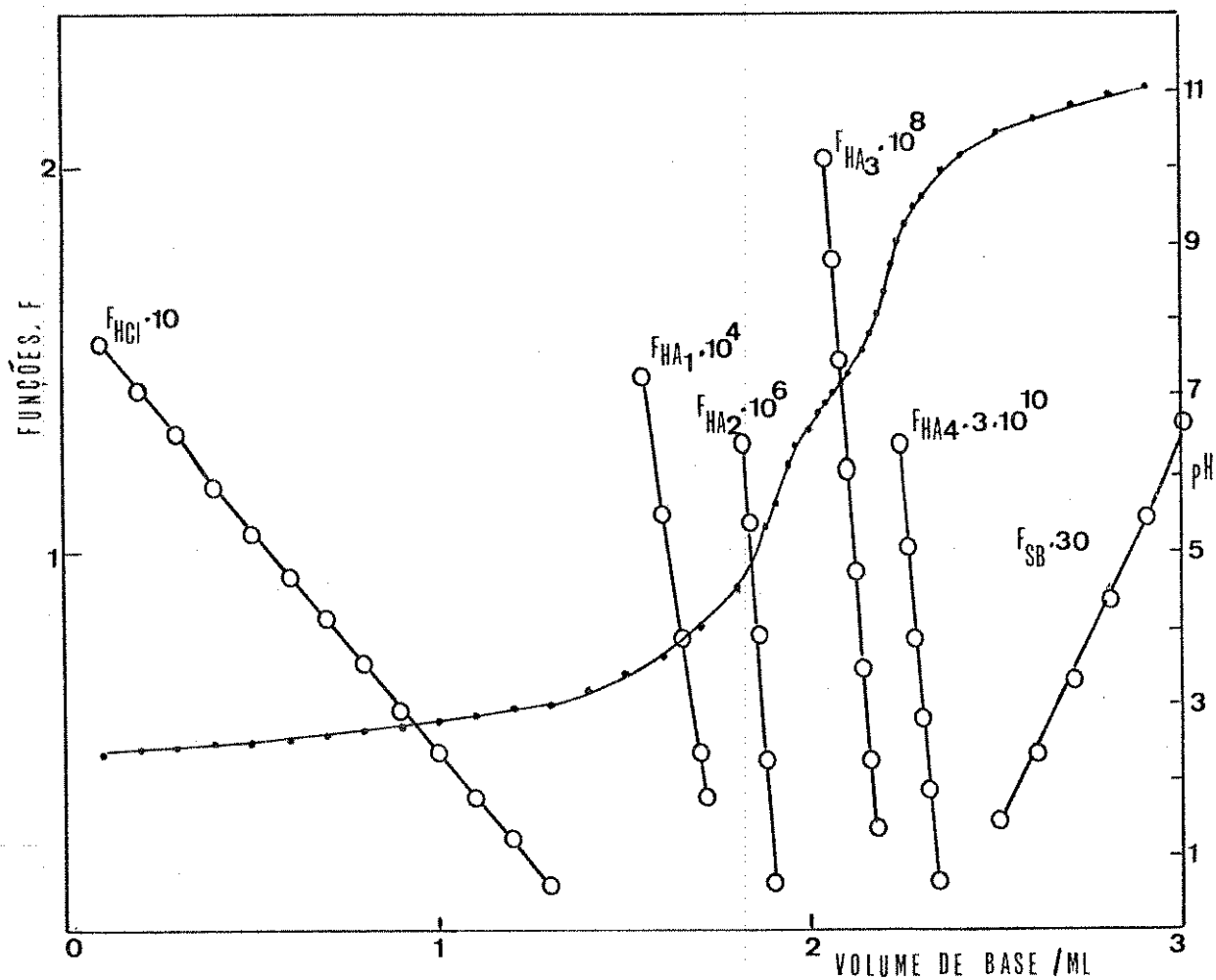


Figura 09 - Curva linearizada da titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,10190 g de imunoglobulina, IgG1(JJO), na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1137 M. $I = 0,10$ M.

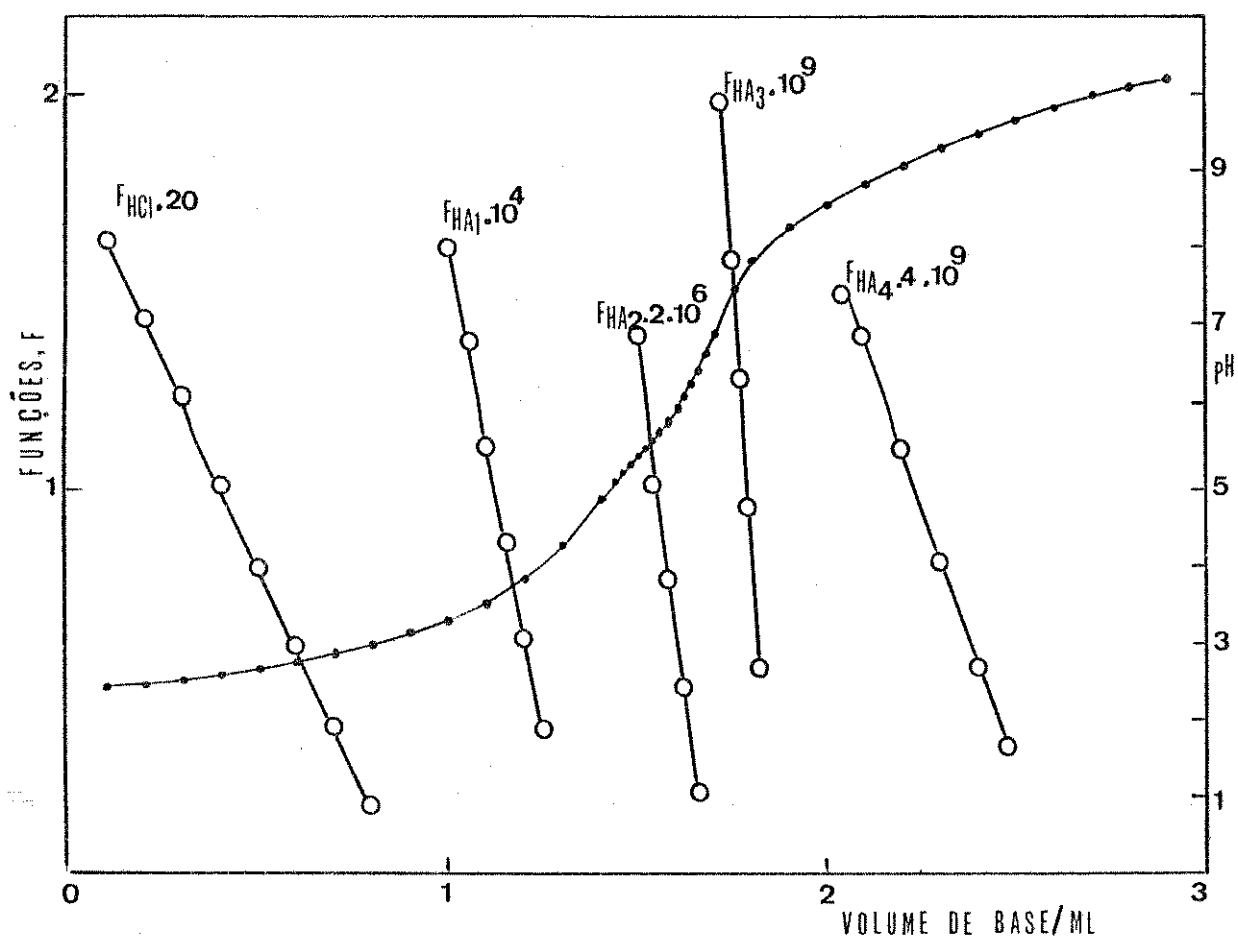


Figura 10 - Curva linearizada da titulação de 22,00 ml de solução contendo 0,10285 g de imunoglobulina, IgG1(JJO), em uréia 9,3 M, na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1137 M. $I = 0,10$ M.

Verificou-se também, que as proteínas de Bence-Jones encontradas na urina de muitos pacientes com mielomatose, são idênticas as cadeias leves da IgG mielomatosa do mesmo paciente (53).

Estudos da sequência de aminoácidos das cadeias leves e pesadas (54), têm mostrado que a cadeia leve consiste de uma região variável (V_L) que vai dos aminoácidos de número 1 a 107, e uma cadeia constante (C_L) constituída dos aminoácidos 108 a 214. A cadeia pesada é formada de uma região variável (V_H) que vai dos aminoácidos de número 1 a 120, e uma região constante indo da posição 121 a 450.

5.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na preparação da solução desta proteína em força iônica 0,10 M, só foi possível obter uma completa dissolução, acidificando o meio com ácido clorídrico. Em solução de uréia 10 M não houve problemas com a solubilidade da proteína. Durante a titulação em força iônica 0,10 M, a solução de proteína ficou turva quando foi atingido pH 6,8 e a turvação desapareceu após pH 9,7.

Nas tabelas 46 a 51 estão os dados da titulação da IgG1 (JJ0) nativa, em força iônica 0,10 M, desnaturada com uréia e os resultados da linearização da curva de titulação.

A tabela 52 mostra o número de grupos titulados por mol de proteína e o respectivo pKa em força iônica 0,10 M e em uréia 9,3 M. Nesta tabela a estequiometria dos grupos titulados é comparada com os dados da sequência de aminoácidos da IgG1 (EU) (55), única imunoglobulina totalmente sequenciada até agora. As diferenças observadas na estequiometria da IgG1 (JJ0) em relação a IgG1 (EU), são atribuídas a região variável

existente na cadeia leve e pesada destas proteínas.

Nas figuras 09 e 10 estão um exemplo das curvas de titulação linearizadas. As funções F_{HCl} , F_{HA1} , F_{HA2} e F_{HA4} correspondem a titulação do excesso de ácido forte, das duas subclasses de carboxílicos e dos grupos amino respectivamente.

Observando as sequências de aminoácidos, da região variável da cadeia pesada, das imunoglobulinas IgG1; EU, DAW, HE e COR (56) (tabela 53), verificamos que somente HE apresenta resíduos histidina, em número de dois, nesta região. Portanto, a proteína aqui titulada, JJO, deve ter um número de resíduos histidina aproximadamente igual a proteína EU. Em virtude disto e da estequiometria obtida para HA_3^+ em uréia, consideramos F_{HA3} em força iônica 0,10 M, correspondente a titulação dos grupos imidazol mais carboxílicos anômalos mais α -amino e em uréia a titulação do imidazol mais α -amino. A presença de grupos carboxílicos anômalos titulados na região do imidazol, como vimos anteriormente, na titulação da β -lactoglobulina, estava relacionada com a mudança de conformação da proteína nesta região de pH. Os resultados aqui obtidos para IgG1 (JJO), são uma boa indicação de que esta proteína também sofre uma mudança de conformação na região neutra de pH. Neste caso, a mudança de conformação parece estar associada com 19 grupos tiituláveis. Um exemplo de transição associada com vários grupos tituláveis é a desnaturação ácida da hemoglobina (57).

Observando os dados da estequiometria em força iônica 0,1 M e em uréia, vemos que em força iônica 0,10 M não são titulados todos os grupos carboxílicos, portanto as regiões hidrofóbicas devem conter grupos carboxílicos, além dos diretamente envolvidos na mudança de conformação. Os grupos amino também só são titulados parcialmente em força iônica 0,10 M e é provável, que estejam sendo titulados juntos com alguns grupos fenólicos em uréia 9,3 M.

Quanto as constantes de dissociação, diferentemente do que ocorreu com a lisozima e β -lactoglobulina, em geral, neste caso, aumentaram em uréia, em relação aos valores obtidos em força iônica 0,10 M sem uréia.

TABELA 53

Número de grupos glutâmico, aspártico, lisina, histidina e tirosina existentes na região variável da cadeia pesada das IgG1 : EU, DAW, HE e COR.

IgG1	GLU	ASP	LIS	HIS	TIR
EU	7	2	5	-	6
DAW	5	6	4	-	6
HE	3	8	7	2	3
COR	5	9	5	-	6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - STEINHARDT, J., E BEYCHOK, S., The Proteins, H. Neurath ed., Academic Press, New York, vol.2, cap.8, (1964).
- 2 - TANFORD, C., Advan. in Protein. Chem., 17, 69 (1962).
- 3 - LINDSTROM-LANG, K., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 7, 15 (1924).
- 4 - TANFORD, C., E WAGNER, M. L., J. Am. Chem. Soc., 76, 3331 (1954).
- 5 - TANFORD, C., SWANSEN, S. A., E SHORE, W. S., J. Am. Chem. Soc., 77, 6414 (1955).
- 6 - BEYCHOK, S., E WARNER, R. C., J. Am. Chem. Soc., 81, 1892 (1959).
- 7 - LEVY, M., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 30, 301 (1958).
- 8 - MARINI, M. A., E MARTIN, C. J., Anal. Lett., 13(B2), 93 (1980).
- 9 - GODINHO, O. E. S., E ALEIXO, L. M., Anal. Biochem., 112, 323 (1981).
- 10 - KOLTHOFF, I. M., E SANDELL, E. B., Text-book of Quantitative Inorganic Analysis, p. 562, Macmillan, New York, (1967).
- 11 - INGRI, N., LAGERSTROM, G., FRYDMAN, M., E SILLÉN, L. G., Acta Chem. Scand., 11, 1034 (1957).
- 12 - PEHRSSON, L., INGMAN, F., E AXEL, S., Talanta, 23, 769 (1976).
- 13 - BIEDERMANN, G., E SILLÉN, L. G., Arkiv. Kemi., 5, 425 (1953).
- 14 - ROSSOTTI, F. J. C., E ROSSOTTI, H., J. Chem. Educ., 42, 375 (1965).
- 15 - SMITH, R. M., E MARTELL, A. E., Critical Stability Constants, p. 1, Plenum Press, New York (1976).

- 16 - LURIE, J., Handbook of Analytical Chemistry, p. 282,
Mir Publishers, Moscow (1975).
- 17 - NOZAKI, Y., E TANFORD, C., J. Am. Chem. Soc., 89, 736
(1967).
- 18 - SUBRAMANIAN, S., SARMA, T. S., BALASUBRAMANIAN, D., E
AHLUWALIA, J. C., J. Phys. Chem., 75, 815 (1971).
- 19 - LEVY, M., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 30, 291 (1958).
- 20 - ENGLEBRECHT, R. M., MOSELY, H. E., DONOHOO, W. P., E
ROLINGSON, W. R., Anal. Chem., 29, 579 (1975).
- 21 - HIRT, R. C., E SCHMITT, R. G., Spectrochimica Acta, 12,
127 (1958).
- 22 - ALEIXO, L. M., Estudos Potenciométricos de Equilíbrios
Ácido-Base e de Formação de Complexos em Solução A-
quosa, Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, (1980).
- 23 - GRAN, G., Analyst (London), 77, 661, (1952).
- 24 - GREENE, R. F., E PACE, C. N., J. Biol. Chem., 249, 5388
(1974).
- 25 - ABU - HAMIDAYYAH, M., J. Phys. Chem., 69, 2720 (1965).
- 26 - KAUZMANN, W., Advan. in Protein. Chem., 14, 1 (1959).
- 27 - DONOVAN, J. W., LASKOWSKI, M. Jr., E SCHERAGA, H. A.,
J. Am. Chem. Soc., 82, 2154 (1960).
- 28 - ROXBY, R., E TANFORD, C., Biochemistry, 10, 3348 (1971).
- 29 - AUNE, K. C., E TANFORD, C., Biochemistry, 8, 4579 (1969).
- 30 - TANFORD, C., PAIN, R., E OTCHIN, N., J. Mol. Biol., 15,
489 (1966).
- 31 - SOPHIANOPOULOS, A. J., E WEISS, B. J., Biochemistry, 3,
1920 (1964).
- 32 - TANFORD, C., E KIRKWOOD, J. G., J. Am. Chem. Soc., 79,
5333 (1957).
- 33 - TANFORD, C., E ROXBY, R., Biochemistry, 11, 2192 (1972).
- 34 - CANNAN, R. K., KIBRICK, A., E PALMER, A. H., Ann. N. Y.
Acad. Sci., 41, 243 (1941).

- 35 - CANFIELD, R. E., J. Biol. Chem., 238, 2698 (1963).
- 36 - GODINHO, O. E. S., ALEIXO, L. M., E HORA ALVES, J. P.,
Anal. Biochem., trabalho aceito para publicação.
- 37 - TOJO, T., HAMAGUCHI, K., IMANISHI, M., E AMANO, T., J.
Biochem. (Tokyo), 49, 217 (1961) .
- 38 - BLAKE, C. C. F., KOENIG, D. F., MAIN, G. A., NORTH, A.
C. T., PHILLIPS, D. C., E SARMA, V. R., Nature, 22,
757 (1965).
- 39 - MATSUSHIMA, A., SAKURAI, K., NOMOTO, M., INADA, V., E
SHIBATA, K., J. Biochem. (Tokyo), 61, 328 (1967).
- 40 - NAKAYA, K., HORIMISHI, H., E SHIBATA, K., J. Biochem.
(Tokyo), 61, 337 (1967).
- 41 - NAKAYA, K., HORIMISHI, H., E SHIBATA, K., J. Biochem.
(Tokyo), 61, 345 (1967).
- 42 - MIHALYI, E., Biochemistry, 9, 804 (1970).
- 43 - LÉONIS, J., Arc. Biochem. Biophys., 65, 182 (1956).
- 44 - RIGHETTI, P. G., KRISHNAMOORTHY, R., LAPOUMEROULIE, C.,
E LABIE, D., J. Chromatogr., 177, 219 (1979).
- 45 - CANNAN, R. K., PALMER, A. H., E KIBRICK, A., J. Biol.
Chem., 142, 803 (1942).
- 46 - NOZAKI, Y., BUNVILLE, L.G., E TANFORD, C., J. Am. Chem.
Soc., 81, 5523 (1959).
- 47 - TANFORD, C., BUNVILLE, L.G., E NOZAKI, Y., J. Am. Chem.
Soc., 81, 4032 (1959).
- 48 - TANFORD, C., E TAGGART, V. G., J. Am. Chem. Soc., 83,
1634, (1961).
- 49 - GROVES, M. L., HIPPEL, N. J., E McMECKIN, T. L., J. Am.
Chem. Soc., 73, 2790 (1951).
- 50 - KAUFMANN, W., E SIMPSON, R. B., J. Am. Chem. Soc., 75,
5154 (1953).
- 51 - FRANK, G., E BRAUNITZER, G., Z. Physiol. Chemie, 348,
1691 (1967).

- 52 - STEIN, W. H., E MOORE, S., J. Biol. Chem., 178,79(1949).
- 53 - ONOUE, K., Methodicum Chemicum, vol. II, part.1, p.153,
Academic Press, New York (1976).
- 54 - STEWARD, N. W., Imunoquímica, p.39, Itatiaia, (1979).
- 55 - EDELMAN, G. M., CUNNINGHAM, B. A., GALL, W. E., GOTTLIEB,
P. D., RUTISHAUSER, V., E MAXDAL, M. J., Proc. Natl.
Acad. Sci., 63, 78 (1969).
- 56 - CAPRA, J. D., E KEHOE, J. M., Adv. Immunol., vol.20,p.1
(1975).
- 57 - BEYCHOK, S., E STEINHARDT, J., J. Am. Chem. Soc., 83,1634
(1961).