

*Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida por Nadja Maria
Sales de Vasconcelos e Aprovada pela Co-
missão Julgadora
Campinas, 09 de agosto de 1984
Oswaldo Espirito Santo*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

26.10.1984
INSTITUTO DE QUÍMICA

Nadja Maria Sales de Vasconcelos

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Espírito Santo Godinho

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE GRUPOS
TITULÁVEIS DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS
EM-SOLUÇÃO CONCENTRADA DE URÉIA ATRAVÉS
DA LINEARIZAÇÃO DE CURVAS DE TITULAÇÃO
POTENCIOMÉTRICA

CAMPINAS — 1984

*A meus pais e irmãos
dedico este trabalho*

Meu reconhecimento ao professor Dr.
Oswaldo Espirito Santo Godinho pela
orientação devotada e amiga desse
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela realização desse trabalho;

A Universidade de Fortaleza, pela colaboração na impressão desse trabalho e oportunidade oferecida para a sua realização;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior através do Plano Institucional de Capacitação de Docentes e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas de estudo concedidas respectivamente, nas fases inicial e final desse trabalho;

Ao Departamento de Físico-Química e Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio durante os trabalhos escritos;

Ao amigo José do Patrocínio pela indispensável colaboração no início dos trabalhos práticos e sobretudo pelas valiosas sugestões durante os cálculos;

Ao professor Dr. Luiz Manoel Aleixo, pelas discussões a respeito dos cálculos;

Ao professor Dr. Ari Ivaska, pela colaboração e sugestão a respeito da calibração do sistema de eletrodos;

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que direta ou indiretamente nos ajudaram, em especial ao Jefferson;

Aos Srs. Walde Oliveira Filho e Antônio Costa, pelos excelentes trabalhos datilográficos;

A Marly Sales Vasconcelos, pela revisão final;

Aqueles cuja convivência, apoio e amizade tornaram possível a realização desse trabalho, especialmente aos amigos de laboratório.

LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS

- E - força eletromotriz da cela
- E'_0 - potencial formal da cela
- E_j - potencial de junção líquida da cela
- j_H e j_{OH} - parâmetros característicos do meio iônico
- E'_{0a} - potencial formal da cela em meio ácido
- E'_{0b} - potencial formal da cela em meio básico
- V_e - volume de equivalência
- P.E. - ponto de equivalência
- V_0 - volume inicial de solução, antes da adição do titulante
- V - volume de titulante adicionado
- V_{HX} - volume total de base adicionada para a neutralização do ácido HX
- C_B - Concentração analítica de base
- C_{HX} - Concentração analítica do ácido HX
- $[HX]$ - Concentração molar do ácido HX
- $[X]$ - Concentração molar da espécie X livre
- K_{HX} - Constante de dissociação do ácido HX
- U_0 - Concentração molar inicial de uréia
- C_{UT} - Concentração molar total de uréia
- $[U]$ - Concentração molar de uréia em qualquer ponto da titulação
- I - força iônica
- K_w - produto iônico da água
- F_{HX} - função de Gran modificada para o ácido HX
- FG - função de Gran clássica (região ácida)
- FOH - função de Gran clássica (região básica)
- N - número de pontos da titulação

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Titulação Ácido-Base de Proteínas	1
1.2 - Métodos de Linearização	4
1.3 - Desnaturação	7
1.4 - Objetivos do Trabalho	13
2. PARTE EXPERIMENTAL	15
2.1 - Aparelhagem e Reagentes	15
2.2 - Detalhes Experimentais	17
2.2.1 - Soluções de Ovalbumina	17
2.2.2 - Soluções de Insulina	17
2.2.3 - Soluções de Mioglobina	18
2.2.4 - Soluções de Ácido Glutâmico e Monoclori- drato de Histidina	18
2.2.5 - Soluções de Uréia	18
2.3 - Calibração do Sistema de Eletrodos	19
2.3.1 - Determinação do Volume de Equivalência ..	20
2.3.2 - Determinação da Concentração Hidrogeniô- nica	23
2.3.3 - Determinação dos Parâmetros j_H e E'_{oa} ...	24
2.3.4 - Determinação dos Parâmetros j_{OH} e E'_{ob} ..	34
2.4 - Determinação do Produto Iônico da Água	35
2.5 - Determinação da Constante de Dissociação de UH^+ ..	36
2.6 - Determinação de Impurezas Tituláveis em Soluções de Uréia	39
2.7 - Procedimento	43
3. MÉTODO DE CÁLCULO	44
4. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA OVALBUMINA	57
4.1 - Considerações Gerais	57
4.2 - Titulação Potenciométrica da Ovalbumina Desnatu- rada	58
4.2.1 - Resultados	59
4.2.2 - Discussão	76

5. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA INSULINA	80
5.1 - Considerações Gerais	80
5.2 - Titulação Potenciométrica da Insulina Nativa ...	82
5.2.1 - Resultados	83
5.3 - Titulação Potenciométrica da Insulina Desnatura- da	109
5.3.1 - Resultados	109
5.4 - Discussão	123
6. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA MIOGLOBINA	129
6.1 - Considerações Gerais	129
6.2 - Titulação Potenciométrica da Mioglobina Nativa .	131
6.2.1 - Resultados	132
6.3 - Titulação Potenciométrica da Mioglobina Desnatu- rada	148
6.3.1 - Resultados	149
6.4 - Discussão	164
7. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS EM SOLUÇÕES DE URÉIA	167
7.1 - Considerações Gerais	167
7.2 - Resultados	169
7.3 - Discussão	193
8. CONCLUSÃO	195
9. APÊNDICE	198
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	205

RESUMO

O presente trabalho de tese dá prosseguimento aos estudos relacionados a linearização de curvas de titulação potenciométrica de proteínas. O objetivo principal do mesmo está relacionado à titulação de proteínas desnaturadas em solução concentrada de uréia a fim de comparar-se os resultados àqueles obtidos para as proteínas nativas.

Foram feitas titulações das seguintes proteínas e aminoácidos:

1. Ovalbumina em soluções de uréia 8,0 M e em condições de força iônica 0,10 M em KCl;
2. Insulina em soluções de KCl 0,10 M e 1,0 M e em soluções de uréia 8,0 M nas condições de força iônica 0,10 M;
3. Mioglobina em soluções de KCl 0,10 M e em soluções de uréia 8,0 M, em KCl 0,10 M;
4. Histidina em soluções de uréia 8,0 M e em KCl 0,10 M;
5. Ácido glutâmico em soluções de uréia 8,0 M e em KCl 0,10 M;
6. Uma mistura de ácido glutâmico e histidina em uréia 8,0 M e em KCl 0,10 M.

As soluções de proteínas ou aminoácidos nas condições acima especificadas, na presença de excesso de ácido clorídrico foram tituladas com solução padrão de hidróxido de sódio. A análise dos dados obtidos nessas titulações foi feita através do método de linearização da curva de titulação desenvolvido em nosso laboratório, que permite a obtenção simultânea do volume de equivalência e das constantes de dissociação dos vários grupos tituláveis.

Para aplicação desse método em solução concentrada de uréia consideramos além dos equilíbrios devido a ionização dos grupos ácidos e básicos das proteínas e aminoácidos, aquele decorrente na protonação da uréia. Desse modo, as equações de balanceamento de carga e massa usadas originalmente foram modificadas.

Os resultados obtidos para as três proteínas analisadas mostraram que o método caracterizou dois tipos diferentes de grupos carboxílicos, grupos imidazóis e grupos aminos. No estudo da ovalbumina e insulina foi observada também a titulação de grupos fenólicos juntamente com grupos aminos. A titulação dos aminoácidos permitiu a verificação da exatidão dos cálculos sobretudo na determinação do número de moles de grupos carboxílicos, imidazóis e aminos.

As diferenças observadas entre os resultados encontrados nas titulações das proteínas nativas e desnaturadas, serviram para especular-se a respeito dos grupos que devem estar mascarados na proteína nativa. Esses resultados indicam que a uréia tem influência sobre grupos hidrofóbicos tornando-os acessíveis a titulação e que o método de linearização é capaz de fornecer importantes informações sobre o comportamento desses grupos no estado nativo e desnaturado de proteínas.

SUMMARY

This thesis corresponds to the continuation of the studies related to the linearization of titration curves of proteins. It is mainly interested in the titration of proteins denatured in urea and in comparing the results with those obtained with native proteins. The following titrations of proteins and amino acids have been performed:

1. Ovalbumin in 8.0 M urea plus 0.10 M in KCl solutions;
2. Insulin in 0.10 M, 1.0 M KCl and in 0.10 M KCl in 8.0 M urea solutions;
3. Mioglobin in 0.10 M KCl and in 0.10 M KCl in 8.0 M urea solutions;
4. Hystidin in 0.10 M KCl plus 8.0 M urea solutions;
5. Glutamic acid in 0.10 M KCl plus 8.0 M urea solutions;
6. Mixture of glutamic acid plus hystidin in 0.10 M KCl plus 8.0 M urea solutions.

The solutions of proteins or amino acids have been treated with excess of strong acid and titrated with sodium hydroxide solution. The method of linearization of titration curves have been applied to the experimental data obtained in these titrations. This method has been used in order to obtain the equivalence volume and pK_{as} of the various titrable groups.

Two subclasses of carboxylic groups, the imidazol and the amino groups have been characterized in the three proteins studied. The phenolic groups have also been characterized together with amino groups in the cases of insulin and ovalbumin. The differences of results obtained for native and denatured proteins have been discussed on the basis of groups which are masked in the native proteins.

The method has also been applied to the amino acids hystidin and glutamic acid in order to check your accuracy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Titulação Ácido-Base de Proteínas

As investigações acerca da química de proteínas tem como um dos principais objetivos explicar suas funções biológicas. Dentre essas investigações destacam-se aquelas referentes à dissociação ácido-base dessas macromoléculas, pois a partir da caracterização de seus grupos tituláveis é possível obter-se dados necessários à elucidação de suas estruturas. Além disso, podem ser obtidas importantes informações sobre os tipos de interações que ocorrem entre esses grupos.

As curvas de titulação ácido-base permitem determinar-se a natureza, a estequiometria e o valor de pK_a de cada grupo titulável bem como a influência de certas substâncias sobre a ionização desses grupos. Diferenças individuais entre proteínas podem também ser evidenciadas a partir de suas curvas de titulação.

Certas propriedades das proteínas em solução, são funções da atividade dos íons hidrogênio. Desse modo, solubilidade, pressão osmótica, atividade enzimática, estabilidade da forma nativa, mobilidade eletroforética, viscosidade, entre outras propriedades, são afetadas por variações de $pH^{(1)}$. Por isso é de interesse observar-se os efeitos produzidos por variações das atividades desses íons sobre essas propriedades.

O estudo do equilíbrio ácido-base de proteínas tem portanto um significado biológico relevante uma vez que possibilita a obtenção de dados valiosos para a elucidação de suas estruturas além de um conhecimento de algumas de suas propriedades.

A dissociação de proteínas, peptídeos e aminoácidos tem sido muito estudada⁽¹⁻³⁷⁾ e algumas revisões bibliográficas sobre o assunto têm sido publicadas^(1,2,3,4).

Kekwick e Cannan estudaram a curva de dissociação da ovalbumina, verificando o efeito do formaldeído sobre as propriedades ácido-base dessa proteína⁽⁵⁾. Posteriormente, Cannan e colaboradores examinaram suas propriedades anfóteras, determinando a estequiometria dos grupos tituláveis⁽⁶⁾. Em 1942, Cannan tratou dos problemas originados na determinação e interpretação

de curvas de titulação salientando os métodos de identificação da natureza e do número de grupos ionizáveis⁽³⁾.

A variação do espectro de absorção com o pH pode ser usada para a determinação da constante de dissociação dos grupos fenólicos da tirosina. Com esse objetivo, foram feitas titulações espectrofotométricas da ovalbumina e insulina⁽⁷⁾ e da mioglobina⁽⁸⁾. Constantes de dissociação de alguns peptídeos foram determinadas com o intuito de investigar-se o efeito da configuração ótica de resíduos de aminoácidos sobre a dissociação de grupos tituláveis⁽⁹⁾.

As curvas de titulação potenciométrica de proteínas não apresentam pontos de inflexão adequados para a determinação da estequiometria dos grupos tituláveis e portanto o método usual para a obtenção da curva que permita a caracterização de uma proteína, consiste em adicionar-se quantidades variáveis de ácido ou base forte a uma solução contendo uma concentração conhecida de proteína medindo-se então os valores de pH obtidos após cada adição. Em uma outra solução, não contendo a proteína, porém nas mesmas condições que a solução anterior, adiciona-se quantidades adequadas de ácido ou base forte a fim de conduzi-la aos mesmos valores de pH da solução que contém proteína. É lógico que essas quantidades de ácido ou base forte adicionadas não serão as mesmas para as duas soluções, sendo maiores para a solução contendo proteína. Essa diferença entre as quantidades de titulante corresponde ao número de H^+ dissociados ou ligados à proteína e um gráfico dessa quantidade versus pH dá a curva de titulação. Essa curva é então analisada matematicamente a fim de determinar-se a estequiometria e os valores de pK_a dos grupos tituláveis⁽⁴⁾.

O tratamento clássico de curvas de titulação de proteínas, foi desenvolvido por Linderstrøm-Lang cujo modelo considera a molécula de proteína como sendo uma esfera impenetrável ao solvente e com uma distribuição uniforme de carga sobre a superfície⁽¹⁰⁾. Nesse modelo os grupos tituláveis têm a mesma probabilidade de ocupar qualquer posição na superfície da molécula e a constante de dissociação para cada um desses grupos é dada pela seguinte equação:

$$\text{pH} - \log \left(\frac{X_i}{N_i - X_i} \right) = \text{pK}_i - 0,868 wz \quad (1)$$

onde X_i é o número médio de prótons dissociados de N_i grupos, pK_i é igual ao cologaritmo da constante de dissociação intrínseca dos grupos i , w é um coeficiente de interação eletrostática e z corresponde a carga líquida sobre a molécula de proteína.

Baseando-se no fato de que os grupos ácidos e básicos não devem necessariamente localizar-se na superfície, Tanford e Kirkwood desenvolveram um modelo no qual é considerado que esses grupos ocupam posições fixas e definidas. A localização exata de um determinado grupo carregado tem efeito importante na curva de titulação⁽¹¹⁾. Porém, tal qual o modelo de Linderström-Lang, é considerado que as interações entre as cargas são apenas do tipo coulombiano e que o solvente é impenetrável à molécula de proteína. De acordo com esse modelo, dependendo das interações eletrostáticas a que estão sujeitos, alguns grupos com o mesmo valor de pK_a intrínseco não serão titulados simultaneamente. Por exemplo, os grupos fenólicos da ovalbumina não são normalmente titulados a valores de pH nos quais deveriam ter sido convertidos quase totalmente à sua forma aniônica. Tanford atribui esse fato como sendo devido a localização desses grupos numa região hidrofóbica da proteína inacessível ao solvente⁽⁴⁾. Posteriormente, a teoria de Tanford-Kirkwood foi aplicada a curva de titulação da lisozima tendo sido demonstrado que embora as interações eletrostáticas tenham um maior efeito sobre os valores de pK_a , fatores como ligações de hidrogênio são também importantes e portanto a determinação exata desses valores para grupos individuais não é possível⁽¹²⁾.

Nos extremos das curvas de titulação, onde os valores de pH ou são muito altos ou muito baixos, ocorrem perturbações que podem resultar numa determinação incorreta dos valores de pK_a . Tendo em conta esse fato, Marshall e Hanania descreveram um método algébrico simples e geral para a determinação do valor de pK_a a partir dos dados de titulação referentes à região central da curva. O método foi aplicado a hemoproteínas cuja ionização envolve um equilíbrio complexo e, portanto, a constante de ionização não pode ser determinada a partir do espectro.

de absorção pelo gráfico de absorbância versus pH⁽¹³⁾. O valor de pK_a encontrado pelos referidos autores para a ferrimioglobina é concordante com os valores obtidos por outros métodos numéricos que envolvem processos iterativos e portanto requerem maior tempo de cálculo.

Marini e Martin questionam a respeito do método de avaliação do valor do parâmetro de interação eletrostática w , da equação de Linderstrøm-Lang, a partir das curvas de titulação. Segundo esses autores, fatores como a seleção incorreta dos grupos ionizáveis e erros cometidos na determinação do número total desses grupos associados a erros nas medidas, podem resultar numa determinação errônea desse parâmetro. Além disso, a teoria de Linderstrøm-Lang atribui a variação da constante de ionização efetiva devido unicamente a fatores eletrostáticos, quando na realidade fatores como estrutura molecular, força iônica, constante dielétrica, ligações de hidrogênio, entre outros, podem também ter influência. A equação de Linderstrøm-Lang descreve a constante de ionização como função do pH e da carga da proteína e de acordo com Marini e Martin, isso complica muito os cálculos num sistema já bastante complexo como é o caso de proteínas. Esses autores sugerem que através de cálculos computacionais, essas constantes de ionização podem ser facilmente calculadas⁽¹⁴⁾.

1.2 - Métodos de Linearização

A caracterização e determinação dos grupos tituláveis de proteínas a partir de curvas de titulação potenciométrica pelo método convencional é trabalhosa e inconveniente sob o ponto de vista analítico. Além disso, o tratamento matemático normalmente usado para a determinação da estequiometria e valores de pK_a dos grupos tituláveis⁽¹⁰⁾ pode levar a resultados duvidosos. Os métodos de titulação termométrica por sua vez, não permitem a determinação dos valores de pK_a para cada tipo de grupo titulável. Baseando-se nesses fatos, Godinho e Aleixo desenvolveram no nosso laboratório um método potenciométrico simples que tem a vantagem de permitir a determinação simultânea da estequiometria e dos valores de pK_a para cada tipo de grupo titulável. A solução de proteína é tratada com excesso de ácido for-

te e titulada com base forte e a proteína protonada é então considerada como uma mistura de ácidos fracos monopróticos⁽³⁸⁾. O tratamento matemático dos resultados consiste na segmentação e linearização da curva de titulação e o método de cálculo baseia-se naquele desenvolvido por Seymour et alii. Esses autores usaram funções de Gran modificadas para o cálculo simultâneo de constantes de dissociação e concentração dos componentes de uma mistura ácida de condensados atmosféricos e água da chuva⁽³⁹⁾.

Uma diferença entre o método desenvolvido no nosso laboratório e o tratamento clássico da curva de titulação⁽¹⁰⁾, é que no primeiro caso, não são levados em conta os efeitos eletrostáticos devidos a carga líquida das proteínas, o que constitui uma vantagem, pois não se fundamenta em modelos.

Vários métodos têm sido usados para determinar pontos de equivalência, constantes de dissociação, potencial de junção e outros parâmetros envolvidos em titulação ácido-base⁽³⁸⁻⁷⁶⁾. Em sua maioria, os métodos de linearização de curvas de titulação fundamentam-se nas funções desenvolvidas por Gran^(40,41) cujo segundo método baseia-se na idéia original de Sørensen⁽⁴²⁾. Esse segundo método dá excelentes resultados mesmo quando se titula com bases fortes, ácidos moderadamente fracos. Para que esse método dê melhores resultados, o valor limite da constante de dissociação deve ser da ordem de 10^{-7} ⁽⁴³⁾. Num trabalho de Rossotti & Rossotti, o método gráfico de Gran é discutido e comparado aos métodos diferenciais comumente usados para obtenção de volumes de equivalência. Uma maior precisão é encontrada ao empregar-se as funções de Gran, sobretudo se a curva de titulação é assimétrica⁽⁴⁴⁾.

No entanto ao deduzir as funções, Gran fez algumas simplificações que podem em determinados casos, resultar em desvios da linearidade. Essas limitações implicaram no surgimento de novos métodos que usam modificações dessas funções ou outras funções não lineares^(35,38 - 56 e 61-75). Métodos que utilizam equações com balanceamentos de carga e massa mais rigorosos têm surgido para descrever o comportamento de sistemas mais complexos e assim funções mais complicadas são normalmente resolvidas com o auxílio de computadores.

Ingman e Still modificaram as funções originais de Gran, desenvolvendo equações que permitem a localização do ponto de

equivalência com maior exatidão para casos de titulações de ácidos com constantes de dissociação da ordem de 10^{-7} a 10^{-10} (43). No entanto, uma limitação é que esse método requer conhecimento exato da constante de dissociação, o que não é possível em alguns casos. Ivaska e Wänninen usando as equações de Ingman e Still, desenvolveram um método computacional capaz de determinar simultaneamente a constante de estabilidade e o ponto de equivalência para o caso da titulação de um ácido fraco com base forte (45).

As funções de Gran originais foram comparadas a funções modificadas e desenvolvidas para a determinação do teor de carbonato e alcalinidade total da água do mar, encontrando-se menores erros sistemáticos ao usar-se essas funções modificadas (46).

Fatores como variações dos coeficientes de atividade, erros na determinação das constantes de equilíbrio e presença de sais hidrolisáveis, podem afetar as funções de Gran. Midgley e McCallum considerando esses fatores, derivaram funções lineares para análise da curva de titulação de ácidos fracos com bases fracas (47). As variações de coeficientes de atividade e potencial de junção que ocorrem na formação de complexos em misturas de solventes orgânicos e água, foram estudadas por Rossoti & Rossoti através do uso de funções de Gran modificadas (48).

As curvas de titulação potenciométrica de misturas de um ácido forte e vários ácidos fracos podem ser tratadas através de um sistema de equações lineares cujas soluções correspondem às concentrações dos componentes da mistura. O tratamento matricial desenvolvido por Ivaska & Nagypal, permite analisar misturas muito complexas de ácidos com valores de pK_a muito próximos como é o caso da mistura de ácido succínico e ácido cítrico (49).

A localização do ponto de equivalência pode também ser feita através de métodos que aplicam o ajuste de curvas multiramétricas. Anfalt e Jagner reconhecem que essa técnica pode dar melhor precisão e exatidão que a segmentação das curvas de titulação (50). Esse método foi aplicado a titulações de bases fracas com ácido forte de concentração desconhecida. A quantidade da substância titulada e a concentração do titulante são determinadas simultaneamente e portanto a padronização prévia do titulante não é necessária (51, 52).

A automatização associada a um tratamento matemático adequado, permite que sistemas complexos sejam analisados num tempo relativamente curto. Johansson & Johansson analisaram curvas de neutralização desprovidas de inflexões utilizando um sistema de titulação automatizado e determinando os parâmetros através de refinamentos multiparamétricos⁽⁵³⁾.

Um método computacional desenvolvido por Arena et alii é capaz de refinar vários parâmetros envolvidos em titulações ácido-base através de equações não lineares. Uma grande vantagem do programa computacional desenvolvido por esses pesquisadores, é a sua capacidade de refinar parâmetros que sofrem variações de uma titulação à outra além daqueles comuns a várias titulações⁽⁵⁴⁾. Uma modificação desse programa foi feita recentemente de modo a obter-se simultaneamente constantes de protonação e parâmetros que são funções da força iônica⁽⁵⁵⁾.

Esses diversos métodos de cálculo aplicados adequadamente à análise de curvas de titulação ácido-base, possibilitam a obtenção de uma grande quantidade de dados com bastante exatidão e precisão e portanto muito têm contribuído para a ampliação do uso da titulometria de neutralização como técnica de análise quantitativa.

1.3 - Desnaturação

O modo pelo qual as cadeias de polipeptídeos encontram-se enroladas no estado nativo tem grande influência sobre algumas propriedades das proteínas. Certas mudanças do meio podem modificar esse estado alterando tanto as propriedades físicas e químicas quanto as funções biológicas dessas macromoléculas. O processo responsável por essas transformações é conhecido como desnaturação e resulta num aumento acentuado de reatividade de certos grupos funcionais. Estudos das reações envolvidas nesse processo são muito importantes pois podem fornecer informações tanto das estruturas quanto das funções das proteínas. Muitos trabalhos referentes à desnaturação e agentes desnaturantes, são encontrados na literatura⁽⁷⁷⁻¹⁴¹⁾, destacando-se aquele desenvolvido por Kauzmann que discute amplamente os fatores envolvidos neste processo⁽⁷⁷⁾.

Conforme os desnaturantes usados, diferentes estados desnaturados podem ser obtidos. Por exemplo, uma determinada proteína em dioxano pode apresentar características diferentes quando em presença de cloridrato de guanidina. Um agente desnaturante bastante usado é a uréia cujas soluções concentradas mostram-se bastante efetivas no processo de desnaturação e seu mecanismo de ação bem como o de outros desnaturantes sobre as estruturas secundária e terciária de biopolímeros tem sido muito investigado. Dentre as forças que mantêm a estabilidade de uma dada proteína em solução, as ligações intermoleculares de hidrogênio desempenham uma função relevante. De acordo com a opinião de Pauling e Mirsky, a uréia desnatura a proteína por ruptura dessas ligações, caracterizando-se o estado desnaturado por um arranjo desordenado das cadeias peptídicas⁽⁷⁸⁾.

Um modelo que descreve a cinética de desnaturação considera que a única barreira de transição entre o estado nativo e o estado ativado, é a presença de ligações de hidrogênio entre os grupos polares. Foi assumido que a uréia compete com os sítios de ligações de hidrogênio, diminuindo portanto a probabilidade de formação dessas ligações entre esses grupos⁽⁷⁹⁾.

Klotz e Franzen estudaram a formação dessas ligações entre grupos amida usando como modelo representativo desses grupos em peptídeos, o composto N-metilacetamida. Baseando-se nos resultados, esses investigadores concluíram que em solução aquosa a estabilidade das ligações interpeptídicas é muito pequena e portanto a contribuição dessas ligações para manter a conformação de proteínas em solução, não deve ser muito grande⁽⁸⁰⁾. Klotz e Stryker examinaram o efeito da uréia sobre um polímero sintético isento de grupos doadores ou receptores de hidrogênio. Nesse caso a estabilização da estrutura não poderia ser atribuída à ligações de hidrogênio, concluindo os autores que o fator responsável pela estabilização é uma interação macromolecular existente entre o solvente e o soluto⁽⁸¹⁾.

O efeito dessas ligações sobre as forças de ácidos dicarboxílicos foi avaliado quantitativamente, tendo sido comprovado que em relação a fatores eletrostáticos, esse efeito é negligenciável⁽⁸²⁾. Levy e Magoulas verificaram que a constante de ligação de hidrogênio de alguns desses ácidos diminui com a concentração de uréia, porém essa variação não é suficientemente significativa⁽⁸³⁾.

A relação entre a força da ligação de hidrogênio e a natureza do solvente foi analisada, tendo sido observado um enfraquecimento dessas ligações com um aumento da natureza dipolar do solvente conseqüente de interações dipolo-dipolo deste com o soluto⁽⁸⁴⁾. Kresheck sugeriu a possibilidade de interação dipolo-dipolo no processo de associação da uréia em soluções diluídas⁽⁸⁵⁾.

Vários pesquisadores têm sugerido que soluções aquosas de uréia são melhores solventes que a água para muitos solutos contendo grupos hidrofóbicos⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ e portanto esse comportamento pode caracterizar a atividade desnaturante da uréia por enfraquecimento de ligações hidrofóbicas. As teorias desenvolvidas para explicar esse enfraquecimento, são diversas e contraditórias. Tanford acredita que a estabilização do estado desnaturado é devido a interações entre uréia e alguns grupos polares da molécula da proteína localizados em regiões hidrofóbicas⁽⁸⁶⁾. Resultados semelhantes foram encontrados a partir de medidas de solubilidade de hidrocarbonetos. Comparando os resultados com estudos similares de peptídeos simples, os pesquisadores concluíram que devido às interações uréia-peptídeos, as ligações hidrofóbicas são rompidas, favorecendo a solvatação de cadeias laterais não polares⁽⁸⁷⁾. Estudos de solubilidade de onze aminoácidos e compostos relacionados levaram Nosaki e Tanford a concluir que a uréia possui a propriedade de estabilizar tanto grupos não polares quanto grupos peptídicos⁽⁸⁸⁾. Dubin e Strauss estudando transições conformacionais de copolímeros, observaram que a desestabilização do estado nativo é devido ao aumento de afinidade solvente-cadeias laterais hidrofóbicas⁽⁸⁹⁾.

A molécula de uréia apresenta uma grande capacidade de formar ligação de hidrogênio com a molécula de água por possuir três centros potenciais de ligação além de ter um pequeno efeito sobre a polaridade da água⁽⁹⁰⁾. Tendo em vista essa propriedade, alguns pesquisadores têm usado soluções aquosas desse desnaturante para investigar a contribuição da estrutura da água para a formação de micelas e ligações hidrofóbicas⁽⁹⁰⁻⁹³⁾. Resultados termodinâmicos indicam que a uréia afeta principalmente variações entrópicas na formação de micelas⁽⁹⁰⁾, modificando primeiramente a estrutura "iceberg" em torno das moléculas de soluto⁽⁹⁰⁻⁹³⁾.

Robinson e Jencks acreditam no entanto, que a habilidade da uréia em desnaturar proteínas não deve ser atribuída apenas a efeitos hidrofóbicos e que a interação entre o solvente e os grupos amidas e peptídicos da proteína ocorre por um mecanismo não hidrofóbico. Estudos realizados num composto contendo principalmente grupos amidas, revelaram a formação de um complexo resultante da interação direta com a uréia. A ação desse desnaturante é provavelmente devido a formação de ligações de hidrogênio bifuncionais com ligações peptídicas^(94,95).

Estudos cinéticos da desnaturação da ovalbumina em soluções concentradas de uréia foram realizados através de medidas de rotação ótica, verificando-se que o processo varia com o tempo. Essa variação não é devido ao simples contato proteína-uréia, porém é resultante do ataque íntimo da proteína pelo solvente com a formação de complexos. A ruptura de ligações de hidrogênio é apenas um dos fatores que podem controlar a velocidade de desenrolamento da ovalbumina em uréia⁽⁹⁶⁾. Investigações semelhantes feitas por Warren e Gordon sugerem que a formação do complexo ovalbumina-uréia se dá após o contato entre ambas e que a desnaturação ocorre sem variações quantitativas na hidratação. A opinião desses autores é que as ligações peptídicas são o ponto mais provável de ataque pela uréia⁽⁹⁷⁾.

O efeito desse desnaturante sobre a estrutura da água, tem sido muito investigado acreditando alguns autores que há um rompimento dessa estrutura, enquanto outros aceitam a hipótese de um efeito formador de estrutura, havendo ainda uma corrente de pesquisadores que defende a idéia de que a uréia não afeta a estrutura da água. Schick atribui um efeito rompedor de estrutura semelhante ao efeito de íons por modificações do "iceberg" em torno do soluto e conseqüentemente por alterações de formações de micelas⁽⁹⁰⁾. A partir de medidas de volume molar aparente e capacidade calorífica, foi concluído que a uréia comporta-se como quebradora de estrutura, enquanto que uréias substituídas têm efeito inverso⁽⁹⁸⁾.

Subramanian e colaboradores num estudo preliminar de medidas termoquímicas e de ressonância magnética nuclear, observaram que a uréia não apresenta nenhum efeito sobre a estrutura da água⁽⁹⁹⁾. Porém, num estudo posterior esses autores observaram que a baixas temperaturas há uma tendência de ruptura da es

estrutura sendo porém essa tendência muito pequena e dependente da temperatura⁽¹⁰⁰⁾. Contudo, Abu-Hamdiyyah baseando-se no fato de que a adição desse desnaturante aumenta a constante dielétrica da água, considera a impossibilidade deste reagente comportar-se como rompedor de estrutura e portanto em solução a sua contribuição é de abertura da estrutura com aumento de ligações de hidrogênio⁽¹⁰¹⁾.

Holtzer e Emerson analisaram vários trabalhos relacionados aos diversos conceitos que descrevem a estrutura da água para explicar a propriedade de proteínas e moléculas menores em solução aquosa, demonstrando que há uma ambigüidade muito grande entre eles. Segundo esses autores, uma variação numa dada propriedade física que ocorre quando um dado soluto é dissolvido em água, é sempre explicada na literatura, porém os argumentos usados são em sua grande maioria, equívocos. Desse modo, não é possível racionalizar um mecanismo baseando-se em resultados experimentais muitas vezes desprovidos de conteúdo⁽¹⁰²⁾. A hipótese de que a uréia age diretamente sobre a estrutura da água é aceita por alguns autores, enquanto outros acreditam que o seu efeito é sobre a estrutura das proteínas. Esses fatos nos levam a conclusão de que o verdadeiro mecanismo de ação desnaturante da uréia ainda não foi bem definido. Alguns resultados são contraditórios e certamente uma análise termodinâmica detalhada das interações uréia-água e uréia-proteína seja necessária a fim de compreender-se completamente o complexo processo de desnaturação de proteínas por uréia.

Apesar de ácidos e sais comportarem-se algumas vezes como agentes desnaturantes de proteínas, é importante ressaltar que nesse trabalho consideramos como proteínas nativas aquelas estudadas em soluções de HCl e KCl e na ausência de uréia.

Soluções concentradas de sais podem ter grandes efeitos sobre as estruturas e propriedades de proteínas. Esses efeitos são funções da natureza do sal podendo variar até para espécies que possuem o mesmo tipo de carga.

A desnaturação por sais foi estudada por Schrier & Schrier que verificaram o efeito de vários eletrólitos sobre o comportamento de proteínas, concluindo que a ação desnaturante pode ser atribuída às interações dessas espécies com peptídeos⁽¹³⁹⁾.

Nandi e Robinson verificaram a influência de certos sais sobre a energia livre de grupos peptídicos, observando que têm um efeito estabilizante muito forte. Outros sais apresentam apenas um efeito moderado, havendo ainda um grupo de eletrólitos cujo efeito é praticamente negligenciável. Os resultados desses autores indicam que qualquer mudança estrutural de proteínas que resulte num maior número de grupos peptídicos expostos ao solvente, é favorecida por interações do tipo sal-peptídeo. O efeito de KCl 2 M foi verificado ser apenas moderado. Nesse trabalho, os pesquisadores discutiram ainda sobre os mecanismos de ação desses sais, admitindo a dificuldade de interpretação dos resultados através de teorias simples como a teoria da interação eletrostática. Acreditam esses autores que estas espécies exercem seus efeitos sobre proteínas e peptídeos através de modificações da estrutura da água⁽¹⁴⁰⁾.

Um estudo da influência de soluções concentradas de sais sobre o coeficiente de atividade de um composto contendo grupos amida foi realizado por Robinson e Jencks. Os resultados indicam que a dissociação, solubilidade e desnaturação de proteínas podem ser consideradas sobretudo devido aos efeitos dos sais sobre os grupos amidas e peptídicos que tornam-se acessíveis ao solvente durante esses processos. Embora o mecanismo de ação não tenha sido estabelecido, os autores acreditam que um efeito desses sais sobre a pressão interna da água associado à interação direta de seus ânions com os dipolos dos grupos amidas seja consistente com os resultados encontrados. De acordo com a opinião dos autores acima citados, esses resultados não podem ser satisfatoriamente explicados pela teoria da estrutura da água nem pela teoria de interação eletrostática⁽¹⁴¹⁾. No entanto, os efeitos dos íons K^+ e Cl^- sobre a estrutura da água foram investigados tendo sido mostrado que esses íons agem como quebradores de estrutura^(142,143).

Considerando que nesse trabalho as proteínas foram analisadas em soluções de KCl de concentrações relativamente baixas, acreditamos que não houve desnaturação para os casos estudados apenas sob essas condições. Essa conclusão pode ser facilmente evidenciada comparando-se os resultados encontrados no estudo dessas soluções àqueles obtidos na análise das soluções contendo uréia.

1.4 - Objetivos do Trabalho

O nosso trabalho é uma continuação daquele iniciado por Godinho e Aleixo⁽³⁸⁾ e posteriormente prosseguido por Godinho e Hora Alves⁽⁵⁶⁾. Consiste na titulação potenciométrica de proteínas e aminoácidos com o objetivo de investigar-se a natureza e o número de grupos tituláveis, bem como determinar-se os valores de pK_a desses grupos.

Estudamos as curvas de titulação de algumas proteínas no estado nativo e no estado desnaturado em soluções concentradas de uréia, com o intuito de verificarmos a influência desse reagente sobre o comportamento ácido-base desses biopolímeros.

Para aplicação do método de linearização de curvas de titulação potenciométrica desenvolvido no nosso laboratório, as soluções de proteínas e aminoácidos devem ser tratadas com excesso de ácido forte, sendo então consideradas como uma mistura de ácidos monopróticos.

Nos estudos realizados em soluções concentradas de uréia, consideramos além dos equilíbrios devido a ionização dos grupos ácidos e básicos das proteínas e aminoácidos, aquele decorrente da protonação da uréia em soluções ácidas. Desse modo, as equações de balanceamento de carga e massa usadas originalmente^(38, 56) foram modificadas.

Usando como titulante soluções aquosas de hidróxido de sódio, titulamos potenciometricamente:

- a) Ovalbumina em soluções de uréia 8,0 M e força iônica 0,10 M em KCl;
- b) Insulina tanto nativa (em condições de força iônica 0,10 M e 1,0 M em KCl) quanto desnaturada em uréia 8,0 M e em KCl 0,10 M;
- c) Mioglobina nativa em condições de força iônica 0,10M em KCl e desnaturada em soluções de uréia 8,0 M e em KCl 0,10 M;
- d) Ácido glutâmico e histidina em soluções de uréia 8,0 M e em KCl 0,10 M. O estudo desses aminoácidos cuja composição é conhecida com maior segurança, teve como propósito a verificação da exatidão dos nossos cálculos.

O nosso interesse primordial foi a aplicação analítica do método potenciométrico desenvolvido em nosso laboratório cuja determinação do ponto final de titulação, permite analisar-se misturas tão complexas como é o caso de proteínas. A análise de proteínas e aminoácidos em soluções concentradas de uréia teve como objetivo apenas a observação de suas propriedades ácido-base em presença desse agente desnaturante, sem no entanto preocuparmos-nos com o verdadeiro mecanismo do processo de desnaturação observado. Entretanto, a comparação dos resultados das titulações de proteínas nos estados nativo e desnaturado pode dar indicações acerca dos tipos de grupos que estão inacessíveis na proteína nativa. O conhecimento desses grupos é muito importante para o entendimento das estruturas das proteínas analisadas.

É de interesse ressaltar que nesse trabalho, os cálculos foram processados considerando-se pH como sendo o logaritmo da concentração hidrogeniônica e portanto todas as constantes determinadas referem-se às concentrações ao invés de atividades.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - Aparelhagem e Reagentes

Na parte experimental foram preparadas soluções de ácidos e bases, soluções tampões e de proteínas e aminoácidos em soluções de cloreto de potássio e em soluções de uréia 8,0 M. As soluções analisadas foram tratadas com excesso de ácido clorídrico e tituladas potenciométricaente com hidróxido de sódio.

As medidas de f.e.m. foram efetuadas com precisão de 0,1 mV, empregando-se um pHmetro Orion modelo 701 A e um eletrodo de vidro Metrohm EA 109 e outro eletrodo de referência de dupla junção Orion nº 90-20 cuja parte externa continha uma solução saturada de cloreto de potássio.

Em soluções de proteínas, é conveniente ter-se cuidados especiais com o eletrodo de vidro, pois as mesmas têm tendência a penetrar na membrana de vidro, interferindo assim no funcionamento do eletrodo. Para eliminar-se esse tipo de interferência, Kenchington sugere que o eletrodo seja armazenado em soluções de HCl 0,1 M e se necessário em solução 1 M desse ácido⁽¹⁹⁾. Como as proteínas analisadas são solúveis em água, não observamos nenhuma alteração na resposta do eletrodo, mesmo estocando-o em água destilada.

A calibração do sistema de eletrodos foi feita através de titulações prévias de soluções de HCl de concentração conhecida, mantendo-se os coeficientes de atividade constantes. Essas titulações prévias possibilitaram a determinação de E'_{oa} , E'_{ob} , j_H e j_{OH} . Segundo Pehrsson et alii a titulação de uma quantidade conhecida de ácido forte com base forte é um dos melhores métodos para determinação desses parâmetros⁽⁶⁹⁾. Eventualmente os eletrodos foram calibrados pelo processo convencional, usando-se padrões NBS de pH 4,008, 6,865 e 9,180 com o propósito de verificar-se o comportamento do eletrodo de vidro.

Soluções padrões de hidróxido de sódio usadas como titulantes, foram preparadas livres de carbonato, com água bidestilada e fervida, de acordo com a literatura⁽¹⁴⁴⁾. As adições dessas soluções foram feitas com uma microbureta Metrohm E 457 que

permite uma precisão, nas medidas de volumes, de 5 microlitros. Essas soluções foram conservadas em frascos de polietileno munidos com sifão e protegidos com tubos contendo ascarite a fim de evitar-se contaminações atmosféricas. Foram preparadas soluções 0,10 M em NaOH e 0,10 M ou 1,0 M em KCl conforme as condições de força iônica.

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

- Ovalbumina grau V da Sigma Chemical Company, essencialmente livre de sais e de pureza elevada (99%);
- Insulina da Sigma Chemical Company, extraída do pâncreas bovino e contendo 0,5% de zinco;
- Mioglobina da Sigma Chemical Company, tipo II, essencialmente livre de sais, extraída do músculo de cetáceos e contendo 0,30% de ferro primariamente no estado fêrrico;
- Monocloridrato de histidina da Carlo Erba RPE, 99% e,
- Ácido glutâmico da Fisher Scientific Company, 99%.

A força iônica das soluções foi admitida constante, usando-se soluções de KCl. Desse modo, foi possível relacionar-se a concentração hidrogeniônica ao potencial medido, uma vez que os coeficientes de atividade foram mantidos constantes. Tanto as proteínas quanto os aminoácidos foram titulados em força iônica 0,10 M, sendo que a insulina foi titulada também em força iônica 1,0 M. Assumimos que os coeficientes de atividades dos íons H^+ e OH^- não foram afetados pela presença de proteína ou aminoácido supondo que estas espécies não contribuíram significativamente para a força iônica das soluções. A contribuição de proteínas sobre a força iônica não é exatamente conhecida, mas sabe-se que é muito pequena. Cannan estudou a contribuição da β -lactoglobulina à força iônica observando que é insignificante⁽³⁾. Se a força iônica for mantida constante e a um valor maior ou igual a 0,1 M, o coeficiente de atividade dos íons H^+ não é alterado significativamente⁽¹⁹⁾.

As soluções de uréia usadas como desnaturante foram preparadas a partir do produto comercial P.A. da Merck. Essas soluções foram preparadas de tal modo que, após adicionadas às soluções analisadas, suas concentrações tornaram-se 8,0 M.

Convém salientar que todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e fervida.

2.2 - Detalhes Experimentais

2.2.1 - Soluções de Ovalbumina

Observamos, durante a preparação dessas soluções, a presença de um resíduo insolúvel que foi filtrado. As concentrações dessas soluções foram então determinadas por secagem de um volume conhecido até peso constante.

Simpson e Kauzmann, estudando a cinética de desnaturação da ovalbumina, verificaram que o simples contato desta proteína com soluções de uréia, mesmo a altas concentrações, não é suficiente para influenciar a rotação ótica. As alterações de rotação ótica parecem ocorrer em dois estágios distintos e variam consideravelmente com o tempo. Em soluções de uréia 8,01M, o tempo requerido para a desnaturação desta proteína é cerca de 100 minutos⁽⁹⁶⁾.

Desse modo, achamos conveniente estabelecer um tempo necessário para assegurar a desnaturação dessa proteína e assim as titulações só foram efetuadas duas horas após a adição de uréia às soluções de ovalbumina. Essas análises foram feitas em condições de força iônica 0,10 M em KCl.

2.2.2 - Soluções de Insulina

As titulações foram realizadas em três condições: soluções de KCl 0,10 M, KCl 1,0 M e KCl 0,10 M porém na presença de uréia 8,0 M. Durante as titulações na ausência de uréia, verificamos uma leve turvação da solução que em força iônica 0,10 M foi na faixa de pH 4 a 7 e nas titulações em força iônica 1,0 M essa turvação foi observada logo após adição de KCl 1,0 M persistindo até pontos da titulação em torno de pH 6.

Tanford e Epstein verificaram que o precipitado formado é altamente hidratado, não representando nenhuma dificuldade para a reprodutibilidade dos resultados^(25,26).

Na presença de uréia 8,0 M, não verificamos nenhuma turvação das soluções tituladas. As titulações foram feitas duas horas após a adição de uréia.

2.2.3 - Soluções de Mioglobina

As soluções dessa proteína foram tituladas apenas em força iônica 0,10 M tanto na presença quanto na ausência de uréia. Durante as titulações dessas soluções na ausência de uréia, foi observada uma precipitação na faixa de pH 6,5 a 11. Breslow e Gurd supõem que acima de pH 6,0 deve haver alguma alteração na curva de titulação como consequência da formação desse precipitado⁽³¹⁾. As soluções da proteína desnaturada foram tituladas 2 horas após a adição de uréia.

2.2.4 - Soluções de Ácido Glutâmico e Monocloridrato de Histidina

As soluções desses aminoácidos foram tituladas apenas em condições de força iônica 0,10 M na presença de uréia 8,0 M.

2.2.5 - Soluções de Ureia

Devido a facilidade da uréia em sofrer decomposição empregamos soluções recentemente preparadas. Essa decomposição tem sido estudada desde tempos passados e se dá primeiramente por conversão a NH_4OCN e depois a CO_2 e NH_3 . Essas reações são muito lentas a temperaturas baixas porém a temperaturas elevadas ou na presença de ácidos a velocidade de decomposição aumenta⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁹⁾. Há pouco tempo atrás a cinética de decomposição deste desnaturante foi estudada por métodos ebuliométricos no nosso laboratório. As reações foram analisadas em meio neutro, ácido e básico tendo sido observado que em meio neutro os produtos de decomposição são NH_3 e CO_2 . Em condições ácidas os produtos finais são NH_4^+ e CO_2 e em presença de íons OH^- a decomposição dá como produtos NH_3 e CO_3^- ⁽¹⁵⁰⁾.

Considerando esses fatos, as soluções de uréia preparadas foram imediatamente usadas na desnaturação das proteínas e após o tempo necessário para ocorrer esse processo, foram efetuadas as titulações. A adição de HCl foi sempre feita após a desnaturação e antes de iniciar-se as titulações.

2.3 - Calibração do Sistema de Eletrodos

A calibração do sistema de eletrodos foi feita titulando-se potenciométricamente soluções de ácido forte na presença de eletrólitos, com soluções padrões de base forte.

É fato conhecido que o eletrodo de vidro responde à atividades de íons hidrogênio ao invés de concentrações hidrogeniônicas. Medidas dessas concentrações podem no entanto ser feitas por calibrações desse eletrodo com soluções de concentração conhecida desde que os coeficientes de atividade sejam mantidos constantes usando-se um meio iônico de força iônica constante. Dessa maneira, pode-se relacionar potenciométricamente a concentração hidrogeniônica ao potencial medido E através das seguintes relações:

$$E = E'_{0a} + 59,16 \log [H^+] + E_j, \text{ a } 25^{\circ}\text{C} \quad (2)$$

$$E = E'_{0b} - 59,16 \log [OH^-] + E_j, \text{ a } 25^{\circ}\text{C} \quad (3)$$

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

Nessas equações, E'_0 refere-se ao potencial formal padrão, E_j ao potencial de junção líquida e os parâmetros j_H e j_{OH} são constantes características do meio iônico.

Para a determinação de E'_0 , j_H e j_{OH} titulamos potenciométricamente uma quantidade conhecida de solução de HCl em KCl 0,10 M ou 1,0 M (conforme as condições de força iônica) com uma solução padrão de NaOH. Na presença de uréia, esses parâmetros foram determinados por adição de uma quantidade conhecida de HCl às soluções concentradas desse agente desnaturante. As soluções de uréia foram preparadas de tal modo que após a adição de ácido obtinha-se concentrações iguais a 8,0 M.

Pehrsson e colaboradores sugerem que essa titulação pré via de uma solução de ácido forte com base forte, é um dos melhores métodos de calibração do sistema de eletrodos⁽⁶⁹⁾.

2.3.1 - Determinação do Volume de Equivalência

Os volumes de equivalência, V_e , foram determinados pelo método de Gran⁽⁴¹⁾ através do gráfico da função $(V_0 + V) 10^{E/59,16}$ vs. V para pontos da curva de titulação situados antes do ponto de equivalência, P.E.. O volume de equivalência corresponde ao ponto de intercessão da reta com o eixo V . Nessa região da curva de titulação, o V_e determinado para sistemas contendo uréia é dado pela intercessão com o eixo V da reta obtida pelo gráfico da função $10^{E/59,16}$ vs. V . Modificamos essa função levando em conta os efeitos de diluição da uréia durante as titulações. Para pontos localizados após o P.E., o V_e é determinado pela intercessão com o eixo V da reta resultante do gráfico da função $(V + V_0) 10^{-E/59,16}$ vs. V .

Nas funções acima citadas, V_0 refere-se ao volume inicial de solução titulada e V ao volume de titulante adicionado.

As figuras 1 e 2 correspondem ao gráfico dessas funções vs. V antes e após o P.E. para sistemas isentos e contendo uréia, respectivamente. Pode ser observado que em certas regiões da curva de titulação, há um ligeiro desvio da linearidade, porém apenas as regiões lineares foram consideradas na determinação do V_e . Esse desvio é mais pronunciado para sistemas contendo uréia. Pode ser observado ainda que para sistemas onde a uréia está ausente, o volume de equivalência determinado para pontos da região ácida corresponde, dentro dos erros experimentais, àquele determinado para pontos localizados na região básica. O mesmo comportamento não foi observado para soluções contendo uréia, onde uma diferença foi encontrada pela determinação do V_e para pontos antes e após o P.E.. Como as soluções de NaOH foram convenientemente preparadas e manipuladas e as titulações foram feitas em atmosfera de N_2 , esse fato não pode provavelmente ser devido à presença de carbonato. Desse modo, atribuímos o comportamento observado, à presença de impurezas tituláveis em soluções de uréia. O método de linearização de curvas

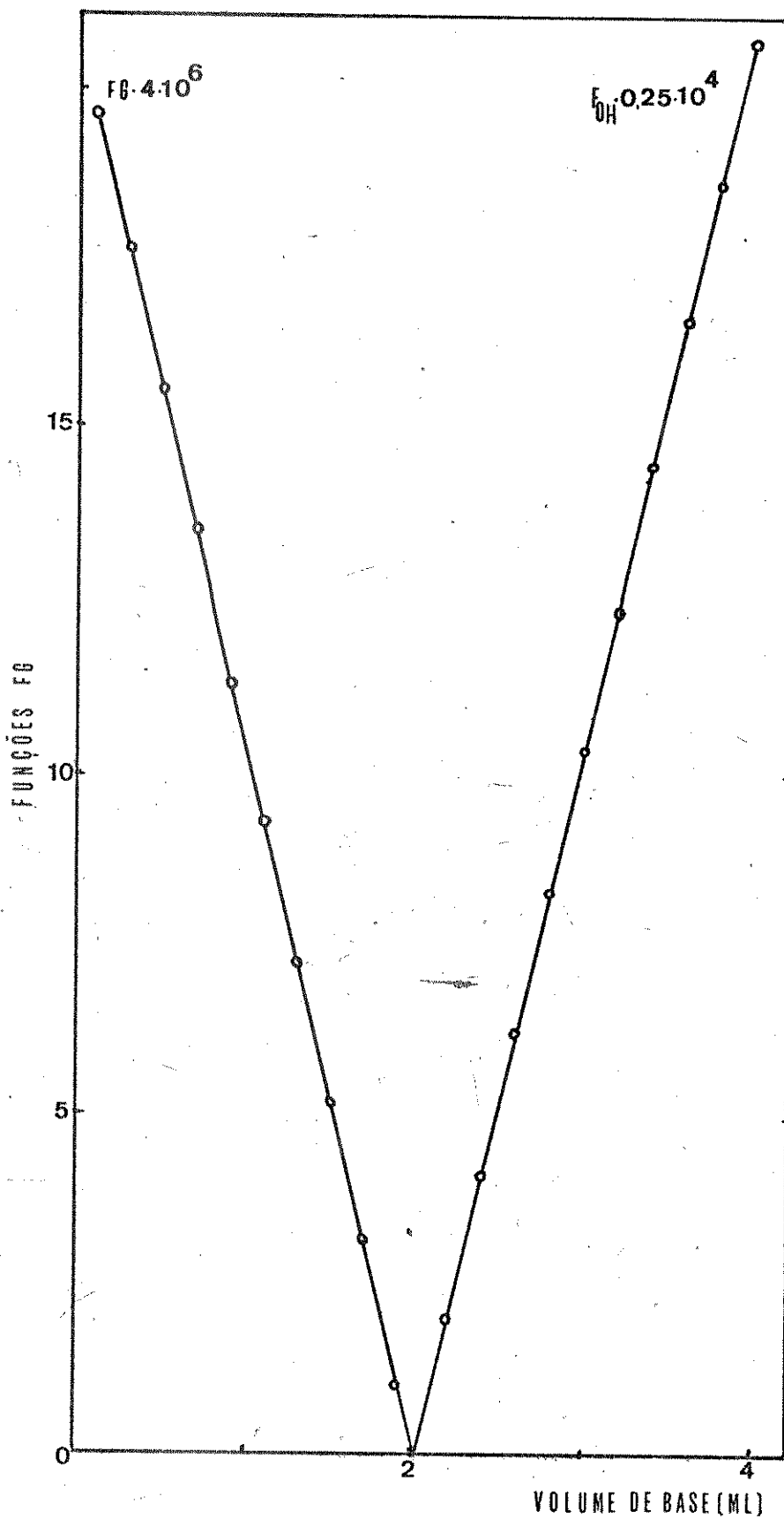


FIGURA 1 - Curva de titulação de 30,00 ml de solução de HCl com NaOH 0,1369M, linearizada pelo método de Gran. $I = 0,10$ M.

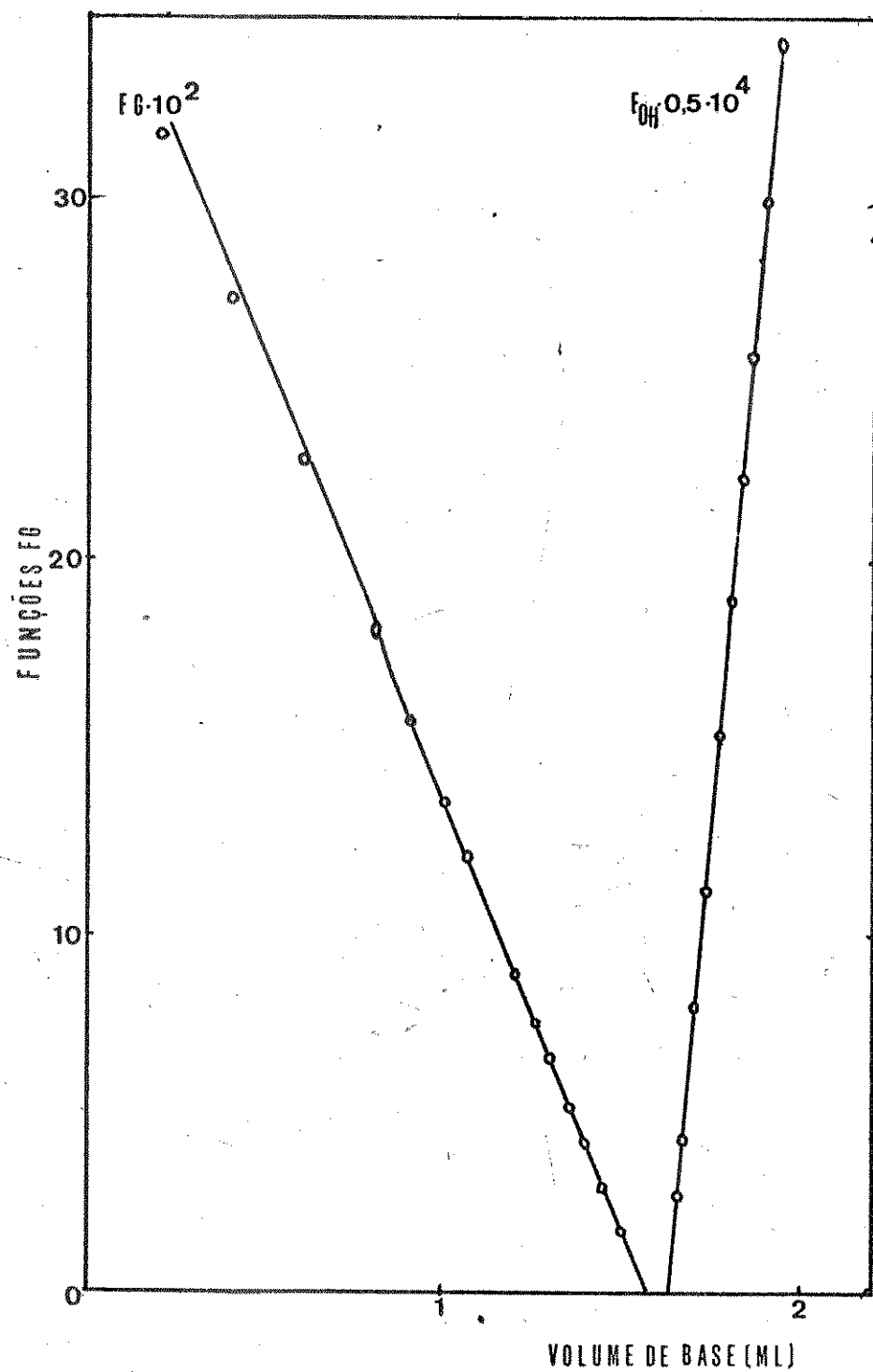


FIGURA 2 - Curva de titulação de 30,00 ml de solução de HCl na presença de uréia com NaOH 0,1289 M, linearizada pelo método de Gran. $I = 0,10$ M.

de titulação foi então aplicado para a determinação das concentrações e valores de pK_a dessas impurezas.

2.3.2 - Determinação da Concentração Hidrogeniônica

A concentração hidrogeniônica para pontos localizados antes do P.E. foi determinada através da seguinte equação:

$$[H^+] = \frac{(V_e - V) C_B}{V_0 + V} = C_{HCl} \quad (5)$$

Em soluções ácidas, a uréia por ser uma base fraca sofre protonação, formando-se a espécie UH^+ e portanto nessas soluções, a concentração hidrogeniônica é obtida tendo-se em conta o equilíbrio $UH^+ \rightleftharpoons U + H^+$ e as seguintes equações:

$$C_{HCl} = [H^+] + [UH^+] \quad (6)$$

$$[UH^+] = \frac{[H^+][U]}{K_{UH^+}} \quad (7)$$

$$[U] = \frac{U_0 V_0}{V_0 + V} = C_{UT} \quad (8)$$

Substituindo-se na equação 6 as equações 5, 7 e 8 tem-se que:

$$[H^+] = \frac{(V_e - V) C_B K_{UH^+}}{(V_0 + V) K_{UH^+} + U_0 V_0} \quad (9)$$

Nas expressões acima temos:

C_B = concentração analítica de base

UH^+ = concentração do ácido UH^+ formado

$[U]$ = concentração de uréia em qualquer ponto da titulação

U_0 = concentração inicial de uréia

C_{UT} = concentração molar total de uréia.

2.3.3 - Determinação dos Parâmetros j_H e E'_{0a}

Esses parâmetros podem ser determinados a partir dos dados obtidos nas titulações de uma quantidade conhecida de solução de HCl com NaOH. Após adições de volumes V de base, os valores de E são medidos. Pelo gráfico da função $E - 59,16 \log [H^+]$ vs. $[H^+]$ para pontos da curva de titulação situados antes do P.E., obtém-se uma curva caracterizada por uma região retilínea cuja extrapolação intercepta o eixo y em $(0, E'_{0a})$. A inclinação dessa reta corresponde a j_H . Esse método de determinação tem sido muito usado na literatura (53,57,59,61,63,69,72). Pehrsson e colaboradores acreditam que variações de E'_0 da ordem de décimos de mV podem ocorrer pela transferência do eletrodo de uma solução para outra. Esses pesquisadores desenvolveram um método que inclui regressão não linear, no qual o valor de E'_0 pode ser usado, por diversos meses sem que seja necessária uma recalibração (69). Dunsmore e Sillén observaram que esse parâmetro permanece praticamente constante de um dia para outro, variando apenas cerca de 0,1 mV (60). Segundo Johansson & Johansson quando E'_0 varia, um erro constante $\Delta E'_0$ introduz um erro ΔpH em todos os valores de pH (53). Desse modo, E'_0 deve ser sempre determinado e nesse trabalho essa determinação foi feita para cada titulação.

Em meio iônico constante, o potencial de junção líquida pode ser considerado dependente apenas da concentração hidrogênio-iônica. Em princípio, quanto maior a força iônica menor o potencial de junção e, portanto, quando o seu valor é conhecido com pouca precisão, é conveniente usar-se um meio iônico concentrado (63). O fator j_H que está relacionado a E_j , é função da composição do meio iônico e das condições do eletrodo de vidro. Para um bom eletrodo, j_H é cerca de $-25 \text{ mV/mol } L^{-1}$ em KCl 0,5 M (72) porém os seguintes valores foram encontrados por Igmann et alii (63).

TABELA 1 - Valores de j_H em Função da Força Iônica⁽⁶³⁾

Meio		j_H (mV/mol ℓ^{-1})
KCl	2,0 M	20,25
KCl	0,5 M	90,5

O par de eletrodos usado no trabalho de Johansson & Johansson apresentou um valor de j_H igual a $-23 \text{ mV/mol } \ell^{-1}$ que manteve-se constante por um período de diversos meses. Nesse trabalho o meio iônico usado foi BaCl_2 0,5 M⁽⁷²⁾. Segundo esses autores o valor de j_H apesar de ser estável para um dado par de eletrodos deve ser constantemente testado quando usado em condições extremas⁽⁵³⁾. No nosso caso particular, verificamos que em soluções concentradas de uréia há uma variação desse parâmetro e de E'_{oa} em cada titulação. Desse modo, levando-se em conta as variações ocorridas na concentração de uréia durante as titulações, os valores de E'_{oa} e j_H foram determinados pelo gráfico da função: $E - 59,16 \log [H^+] \text{ vs. } [H^+]$ sendo que nesses casos $[H^+]$ foi determinada pela equação 9. Considerando-se os efeitos de diluição, os valores de E'_{oa} foram recalculados para todas as titulações de soluções contendo uréia, usando-se a seguinte relação:

$$E''_{oa} = E'_{oa} - 59,16 \log \left(1 + \frac{U_o V_o}{(V_o + V) K_{UH^+}} \right) \quad (10)$$

Nessa equação E''_{oa} refere-se ao valor de E'_{oa} recalculado. Essa equação foi obtida a partir das seguintes relações:

$$C_{HCl} = [H^+] \left(1 + \frac{U_o V_o}{(V_o + V) K_{UH^+}} \right) \quad (11)$$

$$E = E''_{oa} + 59,16 \log C_{HCl} + E_j \quad (12)$$

TABELA 2 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E - 59,16 \log [H^+]$

E (mV)	V(ml)	$[H^+] \cdot 10^{-3} M$	$E - 59,16 \log [H^+]$
298,5	0,692	5,874	430,5
296,9	0,770	5,512	430,5
293,7	0,910	4,867	430,5
291,1	1,010	4,410	430,5
287,6	1,135	3,843	430,5
283,9	1,250	3,325	430,5
279,4	1,370	2,789	430,5
272,9	1,510	2,168	430,5
265,8	1,630	1,640	430,6
257,9	1,730	1,204	430,6
243,4	1,850	0,683	430,7
207,3	1,970	0,167	430,8
189,0	1,990	0,081	431,1

$V_0 = 30,00 \text{ ml}$; $V_e = 2,009 \text{ ml}$; $C_B = 0,1369 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$.

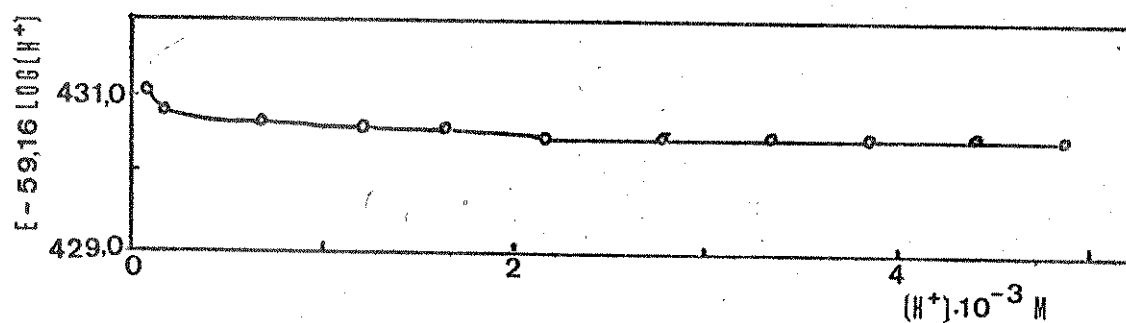


FIGURA 3 - Curva obtida pelo gráfico da função $E - 59,16 \log [H^+]$ vs. $[H^+] \cdot 10^{-3} M$. $I = 0,10 \text{ M}$.

TABELA 3 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E - 59,16 \log [H^+]$

E (mV)	V(ml)	$[H^+] \cdot 10^{-3}$ (M)	$E - 59,16 \log [H^+]$
285,5	0,000	4,550	424,1
284,5	0,045	4,371	424,1
280,6	0,200	3,758	424,1
277,8	0,300	3,367	424,1
274,6	0,400	2,977	424,1
268,7	0,560	2,359	424,1
264,1	0,660	1,977	424,1
256,1	0,800	1,445	424,1
209,1	1,125	0,229	424,5
196,1	1,150	0,137	424,7

$V_0 = 30,00 \text{ mL}$; $V_e = 1,187 \text{ mL}$; $C_B = 0,1150 \text{ M}$; $I = 1,0 \text{ M}$.

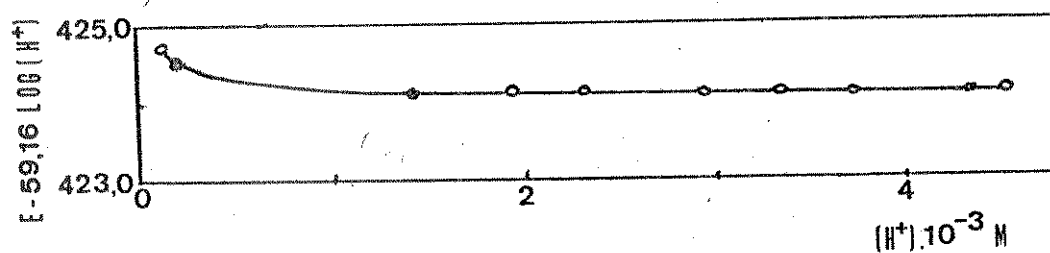


FIGURA 4 - Curva obtida pelo gráfico da função
 $E - 59,16 \log [H^+]$ vs. $[H^+]$. $I = 1,0 \text{ M}$.

TABELA 4 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E - 59,16 \log [H^+]$

E (mV)	V(ml)	$[H^+].10^{-3}(M)$	$E - 59,16 \log [H^+]$
210,1	0,025	6,664	338,8
208,3	0,140	6,146	339,1
205,3	0,300	5,432	339,3
202,9	0,420	4,902	339,5
198,2	0,620	4,028	339,9
194,8	0,740	3,508	340,0
193,6	0,780	3,336	340,1
187,9	0,940	2,652	340,3
180,5	1,100	1,974	340,5
170,0	1,260	1,304	340,7
154,7	1,400	0,723	340,5
132,0	1,500	0,311	339,5
89,6	1,560	0,065	337,3

$V_o = 30,00 \text{ ml}$; $V_e = 1,576 \text{ ml}$; $C_B = 0,1290 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$; $U_o = 8,0 \text{ M}$;
 $K_{UH^+} = 0,23 \text{ M}.$ $[H^+]$ determinada pela equação 5.

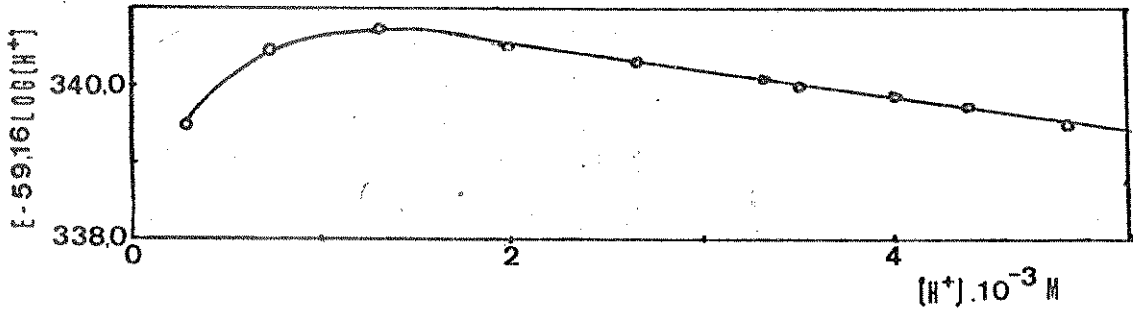


FIGURA 5 - Curva obtida pelo gráfico da função $E - 59,16 \log [H^+]$
vs. $[H^+]$. $[H^+]$ determinado pela equação
5. $U_o = 8,0 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$.

TABELA 5 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E - 59,16 \log [H^+]$

E (mV)	V(ml)	$[H^+].10^{-3} \text{ (M)}$	$E - 59,16 \log [H^+]$
210,1	0,025	0,186	430,8
208,3	0,140	0,173	430,9
205,3	0,300	0,153	431,0
202,9	0,420	0,139	431,1
200,2	0,540	0,124	431,3
194,8	0,740	0,100	431,4
187,9	0,940	0,076	431,6
180,5	1,100	0,057	431,6
170,0	1,260	0,038	431,5
154,7	1,400	0,021	431,4
132,0	1,500	0,009	430,5

$V_o = 30,00 \text{ mL}$; $V_e = 1,576 \text{ mL}$; $C_B = 0,1290 \text{ M}$; $U_o = 8,0 \text{ M}$; $K_{UH^+} = 0,23 \text{ M}$;
 $I = 0,10 \text{ M}.$ $[H^+]$ determinado pela equação 9.

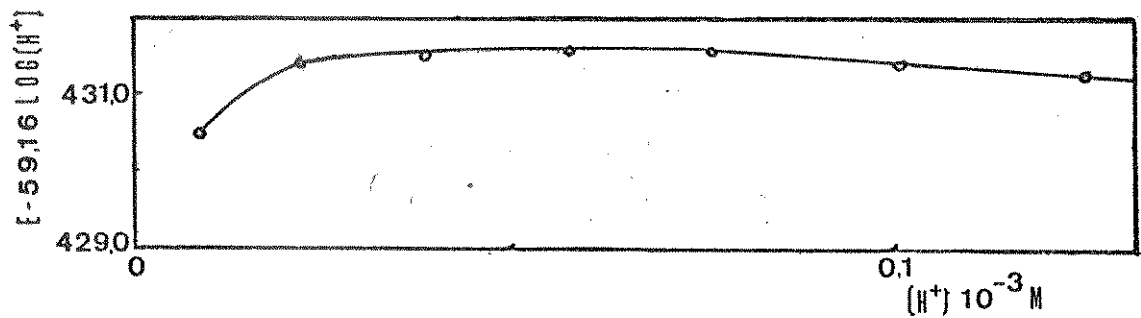


FIGURA 6 - Curva obtida pelo gráfico da função $E - 59,16 \log [H^+]$
vs. $[H^+]$. $[H^+]$ determinado pela equação
9. $U_o = 8,0 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$.

A equação 11 foi obtida levando-se em conta as equações 6, 7 e 8 e a equação 12 relaciona o potencial medido E ao valor de E'_{Oa} recalculado, tendo em conta a concentração hidrogeniônica em soluções de uréia. Comparando-se as equações 2 e 12 chega-se a equação 10.

A tabela 2 mostra os dados referentes a determinação de j_H e E'_{Oa} em força iônica 0,10 M em KCl e na ausência de uréia, para uma titulação. A curva apresentada na figura 3 foi obtida pelo gráfico de $E - 59,16 \log [H^+] \text{ vs. } [H^+]$. Nessas condições de força iônica, o valor de j_H encontrado foi 0,0mV/M.

Os dados referentes a determinação de j_H e E'_{Oa} em força iônica 1,0 M em KCl e na ausência de uréia para uma titulação, são mostrados na tabela 3. A curva da figura 4 é resultante do gráfico de $E - 59,16 \log [H^+] \text{ vs. } [H^+]$. O valor de j_H encontrado nessas condições de meio iônico foi também de 0,0mV/M.

Para a determinação desses parâmetros em soluções de uréia fizemos para efeito de comparação, dois tipos de considerações. No primeiro caso a concentração hidrogeniônica foi determinada através da equação 5 e os dados de uma titulação usados nessa determinação são mostrados na tabela 4. A figura 5 apresenta a curva característica do gráfico da função $E - 59,16 \log [H^+] \text{ vs. } [H^+]$. No segundo caso, a concentração hidrogeniônica foi determinada através da equação 9 e os dados referentes a determinação dos parâmetros j_H e E'_{Oa} são apresentados na tabela 5. A figura 6 mostra a curva obtida pelo gráfico de $E - 59,16 \log [H^+] \text{ vs. } [H^+]$. Observamos que os valores de j_H nesse segundo caso são, em termos absolutos, muito maiores que no primeiro caso e esses foram os valores usados nesse trabalho. Os valores de E'_{Oa} usados foram aqueles valores médios encontrados através da equação 10. Como ilustração, apresentamos em seguida, um exemplo da determinação de E'_{Oa} recalculado. Seja uma titulação de 30,00 ml de uma solução de HCl na presença de uréia. O gráfico de $E - 59,16 \log [H^+] \text{ vs. } [H^+]$ apresenta uma região retilínea para os pontos de titulação correspondentes aos volumes de 0,025 ml e 1,100 ml de base adicionada e intercepta o eixo y em (0,432,1). Então a equação 10 aplicada para esses pontos da titulação dá os seguintes valores de E''_{Oa} :

$$E''_0a = 432,1 - 59,16 \log \left(1 + \frac{8 \times 30}{30,025 \times 0,23} \right) = 340,2\text{mV}$$

$$E''_0a = 432,1 - 59,16 \log \left(1 + \frac{8 \times 30}{31,100 \times 0,23} \right) = 341,1\text{mV}$$

O valor médio de E''_0a igual a 340,7mV é então considerado nos cálculos. Esse valor é aproximadamente equivalente aquele encontrado pela aplicação do método dos mínimos quadrados à reta obtida pelo gráfico de $E - 59,16 \log [H^+]$ vs. $[H^+]$, onde $[H^+]$ é determinado pela equação 5.

2.3.4 - Determinação dos Parâmetros j_{OH} e E'_{ob}

O valor de E'_0 em solução ácida, E'_{0a} , difere de diversos mV daquele em solução alcalina, E'_{0b} . Ciavata explica essa variação devido a dissolução da camada protetora de sílica hidratada formada em soluções ácidas. A dissolução dessa camada que recobre a superfície do eletrodo de vidro, ocorre a valores de pH superiores a 7,0 e portanto há uma modificação da superfície da membrana de vidro que está em contato com a solução teste⁽⁷⁵⁾.

A determinação de j_{OH} e E'_{0b} é semelhante a determinação de j_H e E'_{0a} . Um gráfico da função $E + 59,16 \log [OH^-]$ vs. $[OH^-]$ para pontos após o P.E., origina uma curva cuja região retilínea extrapolada ao eixo y dá o valor de E'_{0b} como intercessão. O valor de j_{OH} corresponde à inclinação dessa reta.

As tabelas 6, 7 e 8 apresentam os dados referentes a determinação de j_{OH} e E'_{0b} para titulações em KCl 0,10 M, 1,0 M e em sistemas contendo uréia em KCl 0,10 M, respectivamente. As figuras 7, 8 e 9 referem-se respectivamente ao gráfico da função $E + 59,16 \log [OH^-]$ vs. $[OH^-]$ para cada um desses casos. A concentração de íons hidroxila foi determinada através da seguinte relação:

$$[OH^-] = \frac{(V - V_e)C_B}{V_0 + V} \quad (13)$$

TABELA 6 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$

E (mV)	V(ml)	$[\text{OH}^-] \cdot 10^{-3} \text{ (M)}$	$E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$
-181,6	2,110	0,431	- 380,7
-191,1	2,150	0,600	- 381,7
-203,5	2,230	0,939	- 382,6
-209,9	2,290	1,191	- 382,9
-215,0	2,350	1,443	- 383,1
-219,3	2,410	1,694	- 383,2
-224,0	2,490	2,027	- 383,3
-227,0	2,550	2,275	- 383,4
-230,5	2,630	2,605	- 383,4
-232,9	2,690	2,852	- 383,5
-238,9	2,870	3,586	- 383,6
-244,8	3,100	4,512	- 383,6
-248,2	3,260	5,149	- 383,6

$V_0 = 30,00 \text{ ml}$; $V_e = 2,009 \text{ ml}$; $C_B = 0,1369 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$.

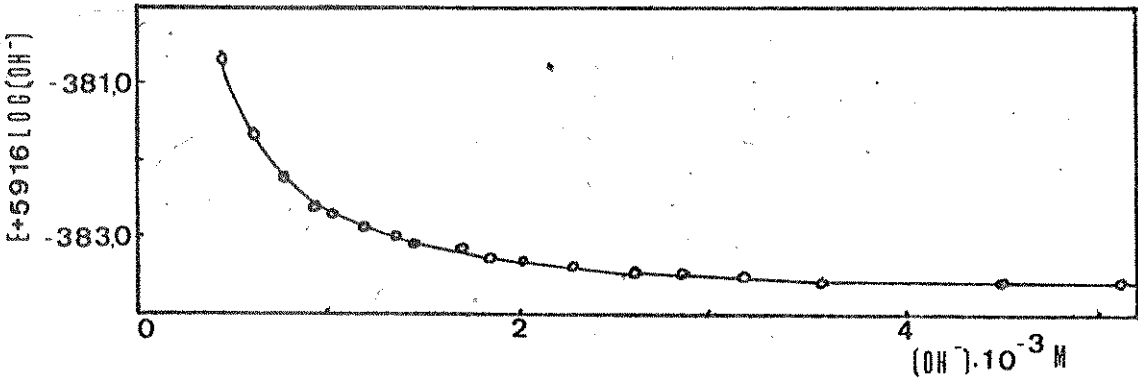


FIGURA 7 - Curva obtida pelo gráfico da função $E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$
 vs. $[\text{OH}^-]$. $I = 0,10 \text{ M}$.

TABELA 7 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$

E (mV)	V(ml)	$[\text{OH}^-] \cdot 10^{-3} \text{ (M)}$	$E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$
-187,4	1,300	0,415	-387,5
-205,9	1,400	0,780	-389,8
-216,4	1,500	1,143	-390,4
-225,0	1,622	1,582	-390,7
-229,3	1,700	1,861	-390,8
-234,0	1,820	2,289	-391,0
-237,9	1,900	2,570	-391,1
-240,6	1,980	2,851	-391,2
-242,5	2,040	3,062	-391,2
-244,2	2,100	3,271	-391,2
-246,3	2,180	3,549	-391,2
-248,0	2,250	3,791	-391,2

$V_0 = 30,00 \text{ ml}$; $V_e = 1,187 \text{ ml}$; $C_B = 0,1150 \text{ M}$; $I = 1,0 \text{ M}$.

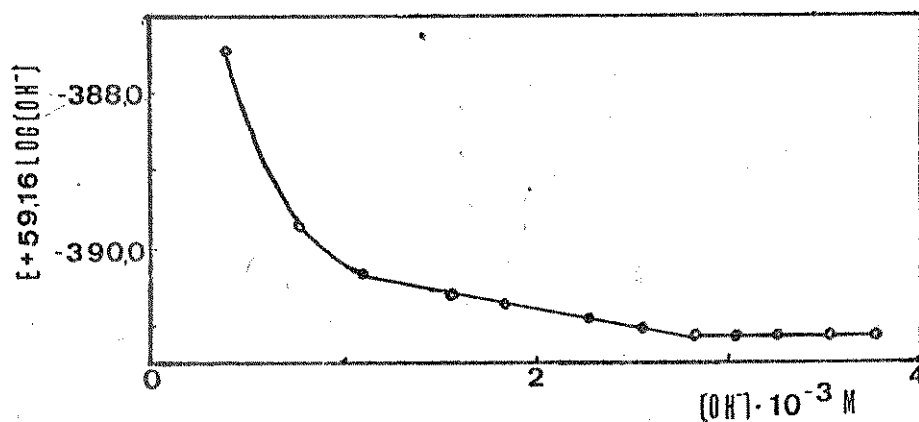


FIGURA 8 - Curva obtida pelo gráfico da função $E + 59,16 \cdot \log [\text{OH}^-]$ vs. $[\text{OH}^-]$. $I = 1,0 \text{ M}$.

TABELA 8 - Parâmetros Usados na Determinação da Função
 $E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$

$E(\text{mV})$	$V(\text{mL})$	$[\text{OH}^-] \cdot 10^{-3} (\text{M})$	$E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$
- 199,3	1,660	0,139	-427,6
- 241,2	1,800	0,706	-427,6
- 257,0	1,950	1,308	-427,6
- 262,4	2,030	1,627	-427,4
- 268,7	2,150	2,103	-427,1
- 272,6	2,240	2,457	-427,0
- 276,2	2,340	2,848	-426,8
- 278,7	2,420	3,154	-426,6
- 279,8	2,460	3,314	-426,5
- 281,6	2,525	3,566	-426,4

$V_0 = 30,00 \text{ mL}$; $V_e = 1,626 \text{ mL}$; $C_B = 0,1290$; $U_0 = 8,0 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$.

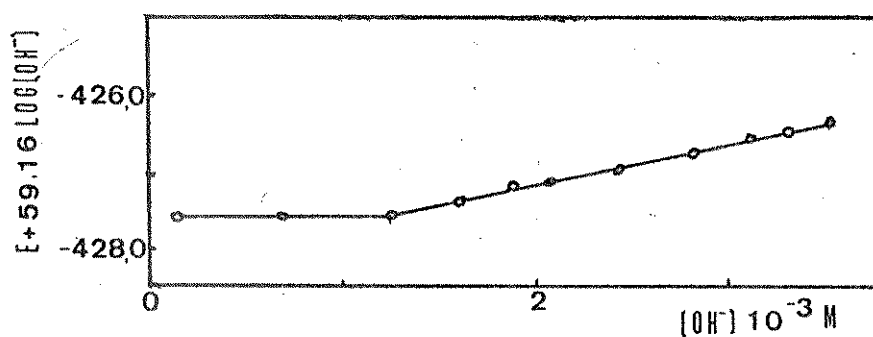


FIGURA 9 - Curva obtida pelo gráfico da função $E + 59,16 \cdot \log [\text{OH}^-]$ vs. $[\text{OH}^-]$. $U_0 = 8,0 \text{ M}$; $I = 0,10 \text{ M}$.

No caso das soluções contendo uréia, o volume de equivalência usado nessa expressão foi aquele encontrado pelo uso da função de Gran após o P.E..

Convém salientar que os parâmetros j_{OH} , E'_{ob} , V_e , E'_{oa} e j_H não foram determinados graficamente, porém através do método dos mínimos quadrados, usando-se calculadora de bolso ou algumas vezes através de programas simples desenvolvidos em linguagem BASIC para um microcomputador da PROLÓGICA CP - 500.

2.4 - Determinação do Produto Iônico da Água

O produto iônico da água, K_w , foi determinado segundo procedimento da literatura^(59, 69 e 71), usando-se a seguinte equação:

$$- \log K_w = \frac{E'_{oa} - E'_{ob}}{59,16} \quad (14)$$

A tabela 9 mostra os valores de pK_w encontrados nesse trabalho para diferentes forças iônicas. Esses valores correspondem aos valores médios obtidos em três titulações diferentes. Para efeito de comparação, os valores obtidos em outros trabalhos foram incluídos na referida tabela.

TABELA 9 - Valores de pK_w obtidos em Diferentes Forças Iônicas.

KCl (M)	Nesse Trabalho	Outros Trabalhos
0,10	$13,74 \pm 0,00$	— $13,78 \pm 0,01^{(151)}$
1,0	$13,76 \pm 0,00$	$13,76^{(56)}$ $13,79 \pm 0,02^{(151)}$
0,5	—	— $13,74 \pm 0,02^{(151)}$

Para soluções aquosas contendo uréia de diversos lotes, diferentes valores de pK_w foram encontrados. A tabela 10 apresenta esses valores obtidos em condições de força iônica 0,10 M.

TABELA 10 - Valores de pKw obtidos em Solução de Uréia.

Lotes	pKw	U _o (M)
01	14,58 ± 0,01	8,0
02	14,52 ± 0,01	8,0
03	14,54 ± 0,01	8,0
Levy ⁽¹⁵²⁾	14,44	7,0

Observamos que há uma concordância entre os valores encontrados nesse trabalho e aquele encontrado por Levy em soluções de uréia 7,0 M⁽¹⁵²⁾.

Durante as titulações, a concentração de uréia sofreu uma variação de 8,0 M a aproximadamente 7,2 M. Essa diluição afeta provavelmente o valor de Kw e assim procuramos levar em conta esse fato, determinando esse parâmetro para cada ponto da titulação. Desse modo, usamos a seguinte relação onde Kw' representa o produto iônico da água levando-se em consideração a diluição:

$$Kw' = Kw \left(1 + \frac{U_o V_o}{(V_o + V) K_{UH^+}} \right) \quad (15)$$

Essa relação foi obtida sabendo-se que nessas condições a concentração hidrogeniônica é dada pela equação 11 e que Kw = [H⁺] [OH⁻] (16).

2.5 - Determinação da Constante de Dissociação de UH⁺

A formação da espécie ácida UH⁺ não foi considerada no trabalho desenvolvido por Godinho e Hora Alves⁽⁵⁶⁾. Nesse trabalho, essa consideração foi feita e portanto a constante de dissociação desse ácido foi determinada considerando-se o equilíbrio UH⁺ ⇌ U + H⁺ e usando-se as seguintes equações:

$$K_{UH^+} = \frac{[H^+][U]}{[UH^+]} \quad (17)$$

$$[H^+] = 10^{\frac{E - E'_{oa}}{59,16}} \quad (18)$$

A equação 18 foi obtida a partir da equação 2, desprezando-se o termo E_j , pois foi observado que os parâmetros j_H e j_{OH} são negligenciáveis na região de pH estudada.

A partir da equação 6 obtemos a equação seguinte:

$$[UH^+] = C_{HCl} - [H^+] \quad (19)$$

A substituição das equações 5 e 18 na equação 19, resulta:

$$[UH^+] = \frac{(V_e - V) C_B}{V_o + V} - 10^{\frac{E - E'_{oa}}{59,16}} \quad (20)$$

$$\text{Mas sabe-se que: } [U] = C_{UT} - [UH^+] \quad (21)$$

Substituindo-se as equações 8 e 20 na equação acima:

$$[U] = \frac{U_o V_o}{V_o + V} - \left(\frac{(V_e - V) C_B}{V_o + V} - 10^{\frac{E - E'_{oa}}{59,16}} \right) \quad (22)$$

As equações 18, 20 e 22 substituídas na equação 17 originam a seguinte relação:

$$K_{UH^+} = \frac{\left[10^{\frac{E - E'_{oa}}{59,16}} \right] \left[\frac{U_o V_o}{V_o + V} - \left(\frac{(V_e - V) C_B}{V_o + V} - 10^{\frac{E - E'_{oa}}{59,16}} \right) \right]}{\frac{(V_e - V) C_B}{V_o + V} - 10^{\frac{E - E'_{oa}}{59,16}}} \quad (23)$$

O valor de E'_{oa} usado nas relações acima, foi determinado a partir da titulação prévia de uma solução de HCl nas condições de força iônica 0,10 M em KCl pelo método já mencionado. Em seguida, o ácido foi titulado nas mesmas condições de meio iônico porém na presença de uréia.

Os parâmetros calculados a partir dos dados obtidos nessas titulações são mostrados na tabela 11. Esses parâmetros possibilitam o cálculo da constante de dissociação de UH^+ cujos valores encontrados para alguns pontos da titulação são apresentados na última coluna da referida tabela. O valor médio encontrado para essa constante em 2 titulações diferentes foi de 0,23 M, o qual é concordante com o valor de 0,22 M encontrado por Levy em solução de uréia 7,0 M⁽¹⁵²⁾.

TABELA 11 - Parâmetros Usados na Determinação de K_{UH^+}

V (mℓ)	E (mV)	$E - E'_{oa}$		$\frac{(V_e - V)C_B}{V_o + V}$ (mM)	$\frac{U_o V_o}{V_o + V}$ (M)	K (M) $_{UH^+}$
		10	59,16 (mM)			
0,125	221,1		0,1689	6,2166	7,9668	0,22
0,225	219,4		0,1580	5,7821	7,9404	0,22
0,325	217,6		0,1474	5,3505	7,9143	0,22
0,425	215,6		0,1363	4,9218	7,8882	0,22
0,526	213,4		0,1251	4,4916	7,8622	0,23
0,625	211,0		0,1140	4,0726	7,8367	0,23
0,725	208,3		0,1026	3,6522	7,8112	0,23
0,825	205,4		0,0917	3,2345	7,7859	0,23
0,925	201,9		0,0800	2,8196	7,7607	0,23
1,025	197,9		0,0684	2,4072	7,7357	0,23
1,125	193,1		0,0568	1,9976	7,7108	0,23
1,225	187,1		0,0450	1,5905	7,6861	0,22

$V_e = 1,622$ mℓ; $V_o = 30,00$ mℓ; $C_B = 0,1251$ M; $E'_{oa} = 266,8$ mV; $U_o = 8,0$ M.

2.6 - Determinação de Impurezas Tituláveis em Soluções de Uréia

Com a finalidade de verificar a existência de impurezas tituláveis no meio desnaturante usado, aplicamos o método de Gran e o método de linearização para a titulação com NaOH, de soluções de HCl em uréia 8,0 M em KCl 0,10 M. Na aplicação do método de Gran, observamos como já foi mencionado, que o volume de equivalência determinado para pontos localizados antes do P.E., não correspondia aquele determinado para pontos situados na região da curva de titulação após este ponto. Atribuímos esse fato a presença de impurezas tituláveis nas soluções contendo uréia. Através do método de linearização detectamos 2 impurezas tituláveis que podem afetar os resultados obtidos nas soluções de medida.

Processos de purificação da uréia são apresentados na literatura através de recristalizações em álcool⁽¹⁵²⁾ e por recristalizações nesse solvente a baixas temperaturas⁽⁸³⁾. Porém após recristalizações em álcool 60%, Levy detectou ainda a presença de uma impureza titulável na concentração 10^{-4} equivalentes/mol de uréia⁽¹⁵²⁾. Como essas impurezas, mesmo após recristalizações, permanecem numa concentração que pode ser detectada pelo método de linearização desenvolvido no nosso laboratório, a uréia utilizada nesse trabalho não foi purificada. Foi feita porém uma correção na determinação do número de moles dos grupos de proteínas e aminoácidos titulados na mesma região de pH que as impurezas presentes no solvente. Essa correção foi feita pela subtração do volume de NaOH gasto na titulação das impurezas, do volume deste titulante consumido na titulação das proteínas e aminoácidos na região apropriada de pH.

Pela aplicação do método de Gran, detectamos a presença de uma impureza com uma concentração de $(2,495 \pm 0,49) \times 10^{-4}$ M.

Através do método de linearização, as concentrações das 2 impurezas encontradas foram da ordem de $(5,707 \pm 0,165) \times 10^{-5}$ M e $(2,061 \pm 0,482) \times 10^{-4}$ M, respectivamente. Os valores de pK_a dessas impurezas foram respectivamente $7,13 \pm 0,18$ e $9,46 \pm 0,22$. Esses resultados referem-se à média aritmética obtida para diferentes lotes de uréia. No entanto, ao fazer as correções devido a presença dessas impurezas, levamos em conta os resultados obtidos para cada lote, pela linearização da curva de titulação de soluções ácidas contendo uréia.

TABELA 12 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução de HCl na presença de uréia 8,0M com solução de NaOH 0,1092M. $I = 0,10M$; $E'_{Oa} = 147,3 \text{ mV}$; $J_H = -9.669,3 \text{ mV/M}$; $J_{OH} = 370,7 \text{ mV/M}$; $K_w = 9,09 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	189.8	3.808
0.300	186.4	3.866
0.500	182.6	3.931
0.650	179.0	3.992
0.850	177.4	4.087
1.000	169.9	4.181
1.100	165.7	4.252
1.200	153.4	4.342
1.301	151.5	4.459
1.400	142.5	4.612
1.500	128.2	4.854
1.600	94.5	5.424
1.610	87.1	5.549
1.620	76.9	5.721
1.630	63.1	5.954
1.640	41.2	6.325
1.650	-2.0	7.055
1.660	-80.7	8.385
1.671	-116.0	8.981
1.680	-134.3	9.291
1.690	-150.2	9.559
1.700	-163.0	9.776
1.710	-175.8	9.992
1.720	-186.4	10.171
1.730	-195.8	10.330
1.740	-204.6	10.479
1.750	-211.5	10.595
1.760	-217.3	10.693
1.770	-222.6	10.783
1.780	-226.8	10.854
1.790	-230.6	10.918
1.800	-233.8	10.973
1.820	-239.6	11.071
1.840	-244.3	11.150
1.860	-248.1	11.215
1.881	-251.8	11.277
1.900	-254.7	11.326
1.950	-261.1	11.435
2.000	-266.2	11.522
2.100	-274.3	11.659
2.200	-280.2	11.760
2.300	-284.8	11.838
2.400	-288.8	11.907
2.500	-292.2	11.965

TABELA 13 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de solução de HCl em uréia, com solução de NaOH. Valores relacionados aos dados da tabela 12.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.808		1.667E-01	1.685E-01
0.300	3.866		1.461E-01	1.467E-01
0.500	3.931		1.219E-01	1.248E-01
0.650	3.992		1.04E-01	1.085E-01
0.850	4.087		8.76E-02	8.661E-02
1.000	4.181		7.035E-02	7.023E-02
1.100	4.252		6.113E-02	5.931E-02
1.200	4.342		4.889E-02	4.839E-02
1.301	4.459		3.734E-02	3.736E-02
1.400	4.612		2.629E-02	2.655E-02
1.500	4.854		1.505E-02	1.563E-02
1.600	5.424		4.026E-03	4.713E-03
1.610	5.549		3.003E-03	3.621E-03
1.620	5.721		1.990E-03	2.529E-03
1.630	5.954		1.105E-03	1.437E-03
1.640	6.325		3.132E-04	3.450E-04
1.650	7.055		-6.202E-04	-7.470E-04
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.64316				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999904				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.650	7.055		5.807E-10	5.331E-10
1.660	8.385		-1.268E-10	-3.577E-11
1.671	8.981		-6.182E-10	-6.615E-10
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.991406				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 1.65937				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 5.68833E-08				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.690	9.559		7.098E-12	7.032E-12
1.700	9.776		5.088E-12	5.026E-12
1.710	9.992		2.822E-12	3.019E-12
1.720	10.171		9.565E-13	1.012E-12
1.730	10.330		-8.708E-13	-9.949E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999191				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 1.72504				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 2.00684E-10				

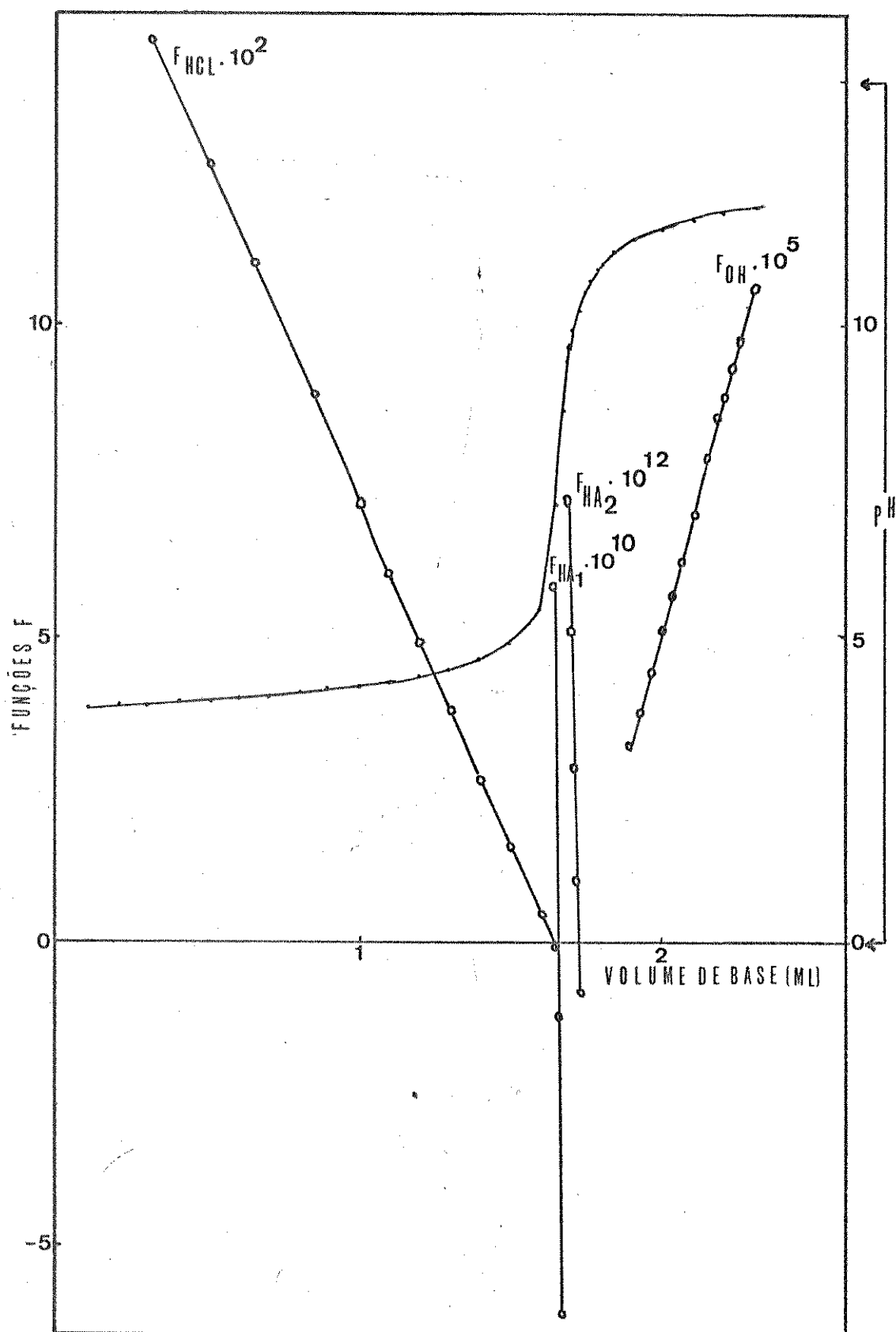


FIGURA 10 - Curva linearizada de titulação de 30,00 mL de solução de HCl na presença de uréia, com solução de NaOH 0,1092 M. $I = 0,10$ M.

As tabelas 12 e 13 mostram respectivamente os dados e os resultados da aplicação do método de linearização para a titulação de uma solução de HCl em uréia com NaOH. Na figura 10 é apresentada a curva de titulação característica dessa solução bem como os segmentos de reta obtidos pela linearização dessa curva.

2.7 - Procedimento

Previamente foram feitas calibrações do sistema de eletrodos por titulações de soluções de ácido clorídrico nas mesmas condições de temperatura, meio iônico e, conforme o caso, nas mesmas condições de meio desnaturante que as soluções de medida. Em seguida, as soluções contendo uma concentração conhecida de proteína ou aminoácido, excesso de ácido forte, condições de força iônica constante em KCl, e em alguns casos, na presença de uréia 8,0 M, foram adicionadas a um frasco de titulação fechado. A temperatura foi mantida constante a $25^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por circulação de água termostatzada na parte externa do frasco de titulação. Durante as titulações foi mantido um fluxo de N_2 livre de CO_2 sobre as superfícies das soluções tituladas. O frasco de titulação permaneceu fechado durante as medidas, tendo contato com a atmosfera apenas pelo orifício destinado ao escape de N_2 . As adições de NaOH usado com titulante foram feitas através de uma microbureta e após cada adição foram medidos os potenciais.

3. MÉTODO DE CÁLCULO

O método de cálculo empregado nesse trabalho para a linearização das curvas de titulação, foi aquele descrito por Godinho e Aleixo⁽³⁸⁾ e baseia-se como já foi mencionado, no método desenvolvido por Seymour et alii⁽³⁹⁾. As curvas de titulação são segmentadas e linearizadas possibilitando a determinação da estequiometria e das constantes de dissociação de cada grupo titulável.

Em soluções de proteínas e aminoácidos estabelecem-se diversos equilíbrios devido a ionização de seus vários grupos ácidos e básicos. Como esses grupos são diferentes em sua natureza, suas ionizações podem ser parciais ou totais. Portanto, na determinação desses grupos tituláveis é muito importante a consideração do pH inicial da solução a ser analisada. No método desenvolvido em nosso laboratório, esse problema é experimentalmente contornado por adições de excesso de ácido forte à solução de proteína ou aminoácido. Os grupos tituláveis são assim protonados e a solução é tratada simplesmente como uma mistura de ácidos, podendo então ser titulada com base forte.

O programa PROTE tem condições de separar uma mistura de até seis ácidos, sendo um deles ácido forte, HCl, e cinco ácidos fracos denominados HA_1 , HA_2 , HA_3^+ , HA_4^+ e HA_5^+ . As equações usadas nesse trabalho para o cálculo das funções de Gran modificadas em sistemas não contendo uréia, foram aquelas usadas originalmente^(38,56). Para a aplicação desse método de cálculo em soluções concentradas de uréia, consideramos além dos equilíbrios devido a ionização dos grupos ácidos e básicos das proteínas ou aminoácidos, aquele decorrente da protonação da uréia. Dessa maneira, as equações de balanceamento de carga e massa usadas anteriormente^(38,56), foram modificadas. Seguindo o mesmo procedimento descrito na literatura⁽³⁸⁾ desenvolvemos as equações que permitem o cálculo das funções de Gran modificadas.

Como já foi exposto anteriormente, admitimos que a solução analisada se constitui numa mistura de ácidos monopróticos. Seja por exemplo, a titulação de uma solução contendo seis componentes ácidos, HCl, HA_1 , HA_2 , HA_3^+ , HA_4^+ , HA_5^+ com uma solução de base forte, no presente caso, NaOH. Os volumes totais de ti-

40

tulante, adicionados no ponto de equivalência da titulação de cada um desses ácidos são designados respectivamente por V_{HCl} , V_{HA} , V_{HA1} , V_{HA2} , V_{HA3^+} , V_{HA4^+} e V_{HA5^+} e portanto os volumes de solução padrão de NaOH necessários à neutralização de cada ácido são respectivamente: V_{HCl} , $(V_{HA1} - V_{HCl})$, $(V_{HA2} - V_{HA1})$, $(V_{HA3^+} - V_{HA2})$, $(V_{HA4^+} - V_{HA3^+})$ e $(V_{HA5^+} - V_{HA4^+})$.

As seguintes equações de balanceamento de massa expressam as concentrações analíticas em moles/l de cada um desses ácidos:

$$C_{HCl} = \frac{V_{HCl} C_B}{V_0 + V} = [Cl^-] \quad (24)$$

$$C_{HA1} = [HA_1] + [A_1^-] = \frac{(V_{HA1} - V_{HCl}) C_B}{V_0 + V} \quad (25)$$

$$C_{HA2} = [HA_2] + [A_2^-] = \frac{(V_{HA2} - V_{HA1}) C_B}{V_0 + V} \quad (26)$$

$$C_{HA3^+} = [HA_3^+] + [A_3^-] = \frac{(V_{HA3^+} - V_{HA2}) C_B}{V_0 + V} \quad (27)$$

$$C_{HA4^+} = [HA_4^+] + [A_4^-] = \frac{(V_{HA4^+} - V_{HA3^+}) C_B}{V_0 + V} \quad (28)$$

$$C_{HA5^+} = [HA_5^+] + [A_5^-] = \frac{(V_{HA5^+} - V_{HA4^+}) C_B}{V_0 + V} \quad (29)$$

Para a neutralização dos grupos ácidos HA_3^+ , HA_4^+ e HA_5^+ , admitimos a presença em solução dos íons X^- , Y^- e Z^- . Desse modo, as seguintes equações podem ser escritas:

$$C_{HA3^+} = [X^-] \quad (30)$$

$$C_{HA4^+} = [Y^-] \quad (31)$$

$$C_{HA5^+} = [Z^-] \quad (32)$$

Pela comparação da equação 30 com a equação 27, tem-se:

$$[X^-] = \frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) C_B}{V_0 + V} \quad (33)$$

Comparando-se a equação 31 com a equação 28:

$$[Y^-] = \frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) C_B}{V_0 + V} \quad (34)$$

A comparação da equação 32 com a equação 29 resulta em:

$$[Z^-] = \frac{(V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+}) C_B}{V_0 + V} \quad (35)$$

A concentração de íons de sódio em solução é dada pela seguinte relação:

$$[Na^+] = \frac{V C_B}{V_0 + V} \quad (36)$$

A partir dos equilíbrios que se estabelecem em solução, as seguintes equações podem ser escritas:

$$K_{HA_1} = \frac{[H^+] [A_1^-]}{[HA_1]} \quad (37)$$

$$K_{HA_2} = \frac{[H^+] [A_2^-]}{[HA_2]} \quad (38)$$

$$K_{HA_3^+} = \frac{[H^+] [A_3]}{[HA_3^+]} \quad (39)$$

$$K_{HA_4^+} = \frac{[H^+] [A_4]}{[HA_4^+]} \quad (40)$$

$$K_{HA_5^+} = \frac{[H^+] [A_5]}{[HA_5^+]} \quad (41)$$

A partir das equações acima, tem-se que:

$$[A_1^-] = \frac{K_{HA_1} [HA_1]}{[H^+]} \quad (42)$$

$$[A_2^-] = \frac{K_{HA_2} [HA_2]}{[H^+]} \quad (43)$$

$$[A_3] = \frac{K_{HA_3^+} [HA_3^+]}{[H^+]} \quad (44)$$

$$[A_4] = \frac{K_{HA_4^+} [HA_4^+]}{[H^+]} \quad (45)$$

$$[A_5] = \frac{K_{HA_5^+} [HA_5^+]}{[H^+]} \quad (46)$$

Das equações 8 e 17 pode-se escrever que:

$$[UH^+] = \frac{U_o V_o [H^+]}{(V_o + V) K_{UH^+}} \quad (47)$$

Substituindo-se as expressões de equilíbrio nas equações de balanceamento de massa, para cada ácido correspondente, tem-se:

$$[HA_1] = \frac{(V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B}{(V_o + V) \left(\frac{K_{HA_1}}{[H^+]} + 1 \right)} \quad (48)$$

$$[HA_2] = \frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B}{(V_o + V) \left(\frac{K_{HA_2}}{[H^+]} + 1 \right)} \quad (49)$$

$$[HA_3^+] = \frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) C_B}{(V_o + V) \left(\frac{K_{HA_3^+}}{[H^+]} + 1 \right)} \quad (50)$$

$$[HA_4^+] = \frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) C_B}{(V_0 + V) \left(\frac{K_{HA_4^+}}{[H^+]} + 1 \right)} \quad (51)$$

$$[HA_5^+] = \frac{(V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+}) C_B}{(V_0 + V) \left(\frac{K_{HA_5^+}}{[H^+]} + 1 \right)} \quad (52)$$

Nas condições experimentais das análises, a seguinte condição de eletroneutralidade é observada:

$$[H^+] + [Na^+] + [UH^+] + [HA_3^+] + [HA_4^+] + [HA_5^+] = [Cl^-] + [OH^-] + [A_1^-] + [A_2^-] + [X^-] + [Y^-] + [Z^-] \quad (53)$$

Substituindo-se as equações 24, 33-36, 42, 43, 47-52 na equação 53 e fazendo-se as devidas operações matemáticas, tem-se:

$$\begin{aligned} & ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) + \frac{U_0 V_0 [H^+]}{K_{UH^+}} - K_{HA_1} C_B \left(\frac{(V_{HA_1} - V_{HCl})}{K_{HA_1} + [H^+]} \right) - \\ & - K_{HA_2} C_B \left(\frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1})}{K_{HA_2} + [H^+]} \right) - K_{HA_3^+} C_B \left(\frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2})}{K_{HA_3^+} + [H^+]} \right) - \\ & - K_{HA_4^+} C_B \left(\frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+})}{K_{HA_4^+} + [H^+]} \right) - K_{HA_5^+} C_B \left(\frac{(V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+})}{K_{HA_5^+} + [H^+]} \right) = \\ & = (V_{HCl} - V) C_B \end{aligned} \quad (54)$$

Os termos do lado esquerdo da equação acima representam a função de Gran modificada para HCl e portanto:

$$F_{HCl} = (V_{HCl} - V) C_B \quad (55)$$

Um gráfico dessa função vs. V origina uma reta cuja intercessão com o eixo V corresponde ao volume de equivalência para HCl.

Para o componente ácido HA_1 , a função de Gran modificada, F_{HA_1} , é obtida pela multiplicação dos termos da equação 54 pela expressão: $(K_{HA_1} + [H^+]) (V + V_0)/C_B$ e os devidos rearranjos e operações matemáticas simples. Desse modo obtemos a seguinte expressão:

$$\begin{aligned}
 & ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) (K_{HA_1} + [H^+])/C_B + U_0 V_0 [H^+] (K_{HA_1} + \\
 & + [H^+])/C_B K_{UH^+} - K_{HA_2} \left(\frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1})}{K_{HA_2} + [H^+]} \right) (K_{HA_1} + [H^+]) - \\
 & - K_{HA_3}^+ \left(\frac{(V_{HA_3}^+ - V_{HA_2})}{K_{HA_3}^+ + [H^+]} \right) (K_{HA_1} + [H^+]) - K_{HA_4}^+ \left(\frac{(V_{HA_4}^+ - V_{HA_3}^+)}{K_{HA_4}^+ + [H^+]} \right) \\
 & (K_{HA_1} + [H^+]) - K_{HA_5}^+ \left(\frac{(V_{HA_5}^+ - V_{HA_4}^+)}{K_{HA_5}^+ + [H^+]} \right) (K_{HA_1} + [H^+]) + \\
 & + (V - V_{HCl}) [H^+] = (V_{HA_1} - V) K_{HA_1}
 \end{aligned} \tag{56}$$

A função F_{HA_1} é então dada pelos termos localizados à esquerda na equação acima e desse modo:

$$F_{HA_1} = (V_{HA_1} - V) K_{HA_1} \tag{57}$$

O gráfico dessa função vs. V dá uma reta cujo coeficiente angular é $-K_{HA_1}$ e o ponto de intercessão com o eixo V é $(V_{HA_1}, 0)$.

Desprezando-se a hidrólise de A_1^- , a equação 25 pode ser assim escrita:

$$C_{HA_1} = [A_1^-] = \frac{(V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B}{V_0 + V} \tag{58}$$

Substituindo-se as equações 24, 33-36, 43, 47, 49-52 e 58 na equação 53, multiplicando-se pelo termo $(K_{HA_2} + [H^+])(V_0 + V)/C_B$ e operando-se matematicamente:

$$\begin{aligned}
 & ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)(K_{HA_2} + [H^+])/C_B + V_0 V_0 [H^+](K_{HA_2} + [H^+])/ \\
 & /C_B K_{UH^+} - K_{HA_3^+} \left(\frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2^+})}{K_{HA_3^+} + [H^+]} \right) (K_{HA_2} + [H^+] - K_{HA_4^+} \cdot \\
 & \left(\frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+})}{K_{HA_4^+} + [H^+]} \right) (K_{HA_2} + [H^+]) - K_{HA_5^+} \left(\frac{(V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+})}{K_{HA_5^+} + [H^+]} \right) \\
 & (K_{HA_2} + [H^+]) + (V - V_{HA_1})[H^+] = (V_{HA_2} - V) K_{HA_2} \quad (59)
 \end{aligned}$$

Na equação acima, os termos do lado esquerdo referem-se a função de Gran modificada para F_{HA_2} . Assim:

$$F_{HA_2} = (V_{HA_2} - V) K_{HA_2} \quad (60)$$

Plotando-se essa equação em função de V , obtêm-se uma reta de coeficiente angular correspondente a $(-K_{HA_2})$. O ponto de intercessão dessa reta com o eixo V é $(V_{HA_2}, 0)$.

A hidrólise da espécie A_2^- também pode ser desprezada e nesse caso a equação 26 torna-se:

$$C_{HA_2} = [A_2^-] = \frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1})C_B}{V_0 + V} \quad (61)$$

Substituindo-se na equação 53 as equações 24, 33-36, 47, 50-52, 58 e 61, multiplicando-se pelo termo $(K_{HA_3^+} + [H^+])(V_0 + V)/C_B$ e após operações matemáticas, obtêm-se a seguinte relação:

$$([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)(K_{HA_3^+} + [H^+])/C_B + U_0 V_0 [H^+](K_{HA_3^+} + [H^+])/C_B$$

$$K_{UH^+} - K_{HA_4^+} \left(\frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+})}{K_{HA_4^+} + [H^+]} \right) (K_{HA_3^+} + [H^+]) - K_{HA_5^+}$$

$$\left(\frac{(V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+})}{K_{HA_5^+} + [H^+]} \right) (K_{HA_3^+} + [H^+]) + (V - V_{HA_2^+})[H^+] = (V_{HA_3^+} - V)K_{HA_3^+} \quad (62)$$

A função de Gran modificada para o ácido HA_3^+ é então:

$$F_{HA_3^+} = (V_{HA_3^+} - V) K_{HA_3^+} \quad (63)$$

Essa função plotada vs. V dá uma reta que intercepta o eixo V no ponto $(V_{HA_3^+}, 0)$ e que tem o coeficiente angular igual a $(-K_{HA_3^+})$.

Para a dedução da função de Gran característica do ácido HA_4^+ , foi desprezada também a hidrólise da espécie A_3 e assim a equação 27 torna-se:

$$C_{HA_3^+} = [A_3] = \frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2^+})C_B}{V_0 + V} \quad (64), \text{ pois } [HA_3^+] \approx 0 \quad (65)$$

Substituindo-se as equações 24, 33-36, 47, 51, 52, 58, 61, e 65 na equação 53, multiplicando-se por $(K_{HA_4^+} + [H^+])(V_0 + V)/C_B$ e resolvendo-se matematicamente:

$$\begin{aligned} & ([H^+] - [OH^+])(V_0 + V)(K_{HA_4^+} + [H^+])/C_B + U_0 V_0 [H^+](K_{HA_4^+} + [H^+])/ \\ & /C_B K_{UH^+} - K_{HA_5^+} \left(\frac{(V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+})}{K_{HA_5^+} + [H^+]} \right) (K_{HA_4^+} + [H^+]) + (V - V_{HA_3^+}) [H^+] = \\ & = (V_{HA_4^+} - V) K_{HA_4^+} \end{aligned} \quad (66)$$

Os termos do lado esquerdo da equação 66 representam a função de Gran modificada para o ácido HA_4^+ e portanto:

$$F_{HA_4^+} = (V_{HA_4^+} - V) K_{HA_4^+} \quad (67)$$

O gráfico dessa função vs. V origina uma reta cuja intercessão com o eixo V ocorre no ponto $(V_{HA_4^+}, 0)$ e cujo coeficiente angular é $(-K_{HA_4^+})$.

Para a espécie HA_5^+ a função de Gran é obtida considerando-se também desprezível a hidrólise da espécie A_4 e desse modo:

$$C_{HA_4^+} = [A_4] = \frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+})C_B}{V_0 + V} \quad (68) \text{ pois } [HA_4^+] = 0 \quad (69)$$

Substituindo-se na equação 53, as equações 24, 33-36, 47, 52, 58, 61, 65 e 69, multiplicando-se por $(K_{HA_5^+} + [H^+])(V_0 + V)/C_B$ e operando-se:

$$([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)(K_{HA_5^+} + [H^+])/C_B + U_0 V_0 [H^+](K_{HA_5^+} + [H^+])/C_B K_{UH^+} + (V - V_{HA_4^+}) [H^+] = (V_{HA_5^+} - V) K_{HA_5^+} \quad (70)$$

Ou seja:

$$F_{HA_5^+} = (V_{HA_5^+} - V) K_{HA_5^+} \quad (71)$$

O gráfico dessa função vs. V intercepta o eixo V no ponto $(V_{HA_5^+}, 0)$ e tem como inclinação $(-K_{HA_5^+})$.

Para sistemas não contendo uréia, os cálculos das funções de Gran modificadas, bem como dos volumes de equivalência e constantes de dissociação foram efetuados através do programa PROTE escrito em linguagem BASIC e cuja listagem original pode ser encontrada na literatura⁽³⁸⁾. Esse programa foi posteriormente adaptado para o cálculo de seis espécies ácidas, tendo si

do também introduzida uma análise do coeficiente de correlação das retas obtidas pelo gráfico das funções de Gran modificadas vs. $V^{(56)}$. Novamente adaptado às nossas condições experimentais, esse programa foi denominado PROTE MODIFICADO sendo utilizado no cálculo das funções de Gran modificadas, volumes de equivalência e constantes de dissociações para sistemas contendo uréia. Esse programa é apresentado no apêndice e a figura abaixo mostra sua representação esquemática:

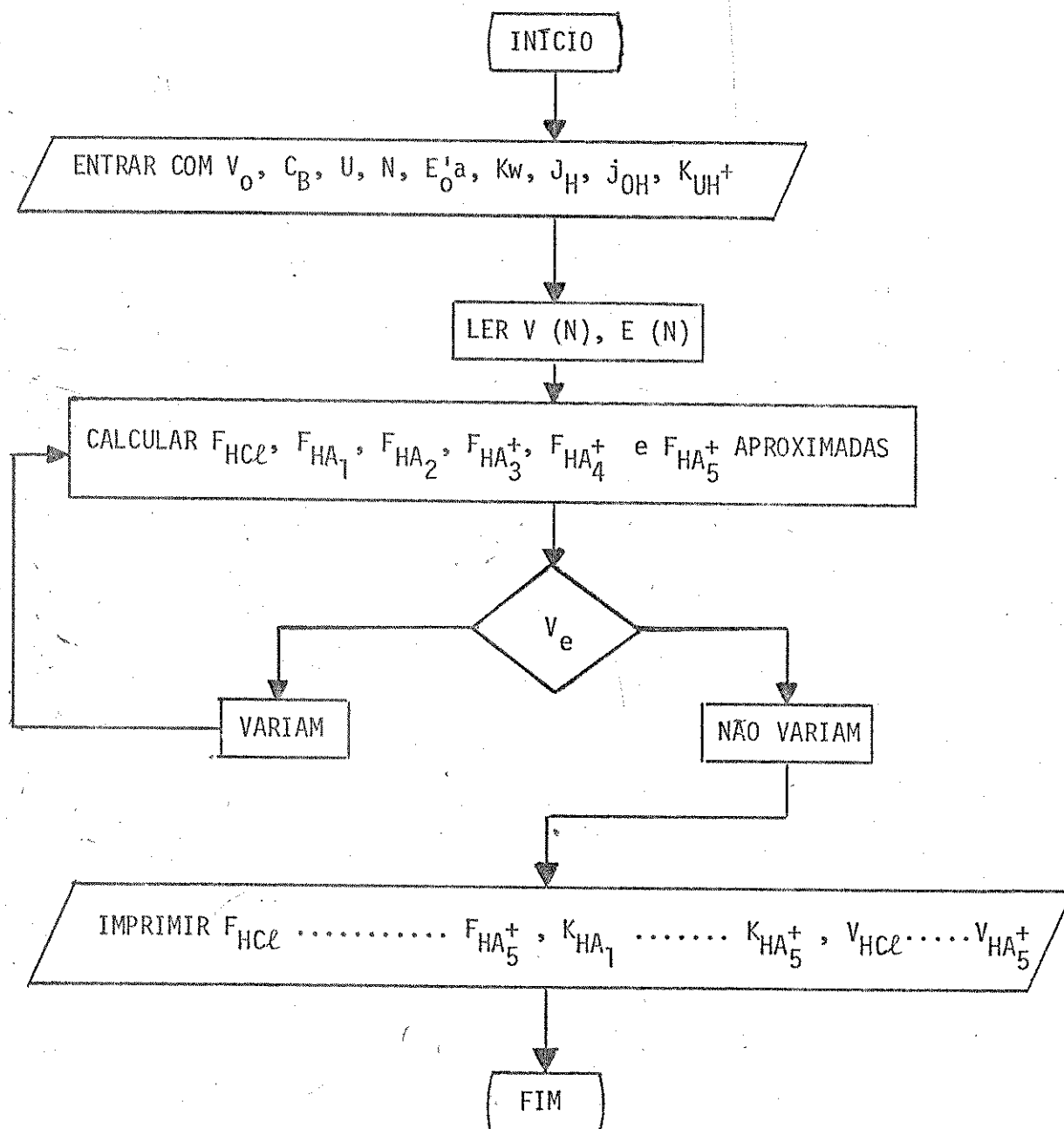


FIGURA 11 - Representação Esquemática do programa PROTE MODIFICADO.

As funções de Gran são calculadas em duas etapas, sendo primeiramente feito um cálculo aproximado e depois então são calculadas as funções refinadas. O cálculo de F_{HCl} aproximada é feito com os primeiros valores de $[H^+]$ e V usando-se apenas os dois primeiros termos do lado direito da equação 54. A intercessão com o eixo x do gráfico dessa função vs. V corresponde a V_{HCl} aproximado. Para o cálculo de F_{HA_1} aproximada são usados apenas os primeiros valores de V e $[H^+]$ situados na região da curva de titulação correspondentes a $V > V_{HCl}$ aproximado e apenas os três primeiros termos do lado direito da equação 56 são usados. Nesse cálculo, o termo K_{HA_1} pode ser desprezado pois nessa região da curva de titulação tem um valor menor que $[H^+]$. O gráfico da função F_{HA_1} aproximada vs. V intercepta o eixo x no ponto $(V_{HA_1}, 0)$. O coeficiente angular dessa reta corresponde a $(-K_{HA_1} \text{ aprox.})$. Para se determinar F_{HA_2} são usados valores de $V > V_{HA_1}$ aproximados e apenas os três primeiros termos do lado direito da equação 59 são utilizados. Nesse caso, obtém-se uma reta pelo gráfico de F_{HA_2} aproximada em função de V . Essa reta intercepta o eixo x em $(V_{HA_2} \text{ aprox.}, 0)$ e tem coeficiente angular igual a $(-K_{HA_2} \text{ aprox.})$. Essa sistemática de cálculo é seguida para a determinação das funções aproximadas dos demais ácidos. O gráfico dessas funções aproximadas vs. V possibilita o cálculo dos volumes de equivalência e das constantes de dissociação desses ácidos fracos. Dessa maneira, a curva de titulação pode ser segmentada em seis regiões e a partir dos segmentos de reta obtidos é possível determinar-se valores aproximados de V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , $V_{HA_3}^+$, $V_{HA_4}^+$, $V_{HA_5}^+$, K_{HA_1} , K_{HA_2} , $K_{HA_3}^+$, $K_{HA_4}^+$ e $K_{HA_5}^+$. Esses parâmetros são então usados nos cálculos das funções refinadas.

O cálculo da F_{HCl} refinada é feito através do uso de todos os termos da equação 54 na região da curva de titulação compreendida entre $0 < V < V_{HCl}$. Uma reta é obtida pelo gráfico de F_{HCl} refinada vs. V . A intercessão com o eixo V corresponde a um valor mais exato de V_{HCl} . Esse valor é então usado na equação 56 para o cálculo de F_{HA_1} refinada na região entre

$V_{HCl} < V < V_{HA_1}$, juntamente com os valores dos outros termos calculados aproximadamente na primeira etapa.

Um gráfico de F_{HA_1} refinada vs. V origina uma reta com intercessão no eixo X no ponto ($V_{HA_1 \text{ ref.}}, 0$) e com inclinação correspondente a $(-K_{HA_1 \text{ ref.}})$.

Esses valores mais exatos e os outros termos calculados aproximadamente, são usados na equação 59 na região da curva de titulação compreendida entre $V_{HA_1} < V < V_{HA_2}$ para o cálculo de F_{HA_2} refinada. Valores mais exatos de V_{HA_2} e K_{HA_2} são encontrados pelo gráfico de F_{HA_2} vs. V . Esses valores são então usados no refinamento de F_{HA_2} e $F_{HA_3}^+$ através das equações 60 e 62. Seguindo o procedimento já descrito, $F_{HA_3}^+$ é refinada através da equação 62 e na região de $V_{HA_2} < V < V_{HA_3}^+$. Valores mais exatos de $V_{HA_3}^+$ e $K_{HA_3}^+$ são obtidos e usados no refinamento de $F_{HA_3}^+$ e $F_{HA_4}^+$. Na região de $V_{HA_3}^+ < V < V_{HA_4}^+$, $F_{HA_4}^+$ é refinada através da equação 66 e assim valores mais exatos de $V_{HA_4}^+$ e $K_{HA_4}^+$ são encontrados. Na região de $V_{HA_4}^+ < V < V_{HA_5}^+$ é feito o refinamento de $F_{HA_5}^+$ pelo uso da equação 70 e valores mais exatos de $V_{HA_5}^+$ e $K_{HA_5}^+$ são encontrados.

Os valores mais exatos de V_{HCl} , V_{HA_1} , V_{HA_2} , $V_{HA_3}^+$, $V_{HA_4}^+$, $V_{HA_5}^+$, K_{HA_1} , K_{HA_2} , $K_{HA_3}^+$, $K_{HA_4}^+$ e $K_{HA_5}^+$ possibilitam refinamentos sucessivos com tantas interações quantas necessárias para atingir-se um limite imposto para a variação dos valores determinados em dois cálculos consecutivos. O ajuste desse sistema de equações através do método de aproximações sucessivas, é feito até que a diferença entre os valores dos parâmetros encontrados em dois cálculos consecutivos, seja menor ou igual a 1×10^{-5} .

Nesse trabalho, esse sistema de equações foi resolvido como já mencionado, através de programas em linguagem BASIC, denominados PROTE e PROTE MODIFICADO usando-se um microcomputador CP-500 da PROLÓGICA e eventualmente um computador digital PDP-10 do Centro de Computação da UNICAMP. Esses programas selecionam a melhor reta correspondente a cada função de Gran modificada, através do método dos mínimos quadrados.

Nas curvas de titulação linearizadas, a função F_{OH} refere-se a função de Gran clássica aplicada ao excesso de base. Desse modo, determinamos por um método independente, o ponto final de titulação.

4. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA OVALBUMINA

4.1 - Considerações Gerais

Dentre as proteínas encontradas na clara do ovo, a ovalbumina é o componente mais abundante, representando cerca de 65% do total dessas espécies. É uma proteína globular, complexa, e de massa molecular moderada. Diferentes massas moleculares têm sido consideradas (37.000 a 46.000) sendo o valor de 45.000 o mais aceito. Porém recentemente, Nisbet e colaboradores consideraram a massa molecular da cadeia de polipeptídeos como sendo 42.699⁽¹⁵³⁾. Foi uma das primeiras proteínas a ser obtida no estado puro e diversas investigações sobre aspectos químicos e biológicos de sua estrutura têm sido publicadas⁽¹⁵³⁻¹⁶⁶⁾. Foi sugerido que essa proteína pode agir como inibidora de proteinase e se for o caso, a ovalbumina é uma das poucas proteínas cuja função foi estabelecida a partir de estudos de determinação da sequência de aminoácidos⁽¹⁵³⁾.

Sua molécula é constituída de uma só cadeia de polipeptídeos e a complexidade de sua estrutura se deve à presença de uma cadeia lateral de carboidrato composto de manose e glucosamina e localizada no resíduo Asn-292, duas serinas fosforiladas ligadas aos resíduos 68 e 344 e de um N-terminal bloqueado por um grupo acetil. Contém ainda uma ponte dissulfeto envolvendo os resíduos Cys-73 e Cys-120⁽¹⁵³⁾. A completa sequência de aminoácidos dessa proteína, foi determinada recentemente, tendo sido encontrados 385 resíduos^(153,154). Cerca da metade desses resíduos encontram-se mascarados na proteína nativa incluindo 9 grupos fenólicos, cerca de 20 ϵ -aminos e possivelmente alguns resíduos contendo grupos imidazóis e cadeias laterais de grupos carboxílicos. Parte da molécula é helicoidal e uma fração desconhecida está provavelmente enrolada numa estrutura tipo- β ⁽¹⁵⁵⁾. Contém também no estado nativo, grupos SH localizados em regiões hidrofóbicas⁽¹⁵⁶⁾.

Comparações estruturais entre a ovalbumina de nove espécies indicam a existência de dois grupos estruturalmente diferentes: a ovalbumina de anserinos apresenta-se eletroforeticamente homogênea, enquanto que a ovalbumina de galináceos é he-

terogênea com relação a carga líquida, provavelmente devido a diferenças no teor de fosfato. Porém as ovalbuminas das diferentes espécies têm o mesmo número de resíduos de aminoácidos⁽¹⁵⁷⁾. Uma dada preparação dessa proteína pode resultar num produto consistindo de três componentes eletroforeticamente separáveis, denominados A₁, A₂ e A₃ contendo respectivamente 2, 1 ou nenhum grupos fosforilados^(155,158,159). Provavelmente, a presença ou ausência desses grupos, não afeta suas propriedades hidrodinâmicas⁽¹⁶⁰⁾.

Essa proteína apresenta um polimorfismo genético devido a mutação de Asn-311 → Asp-311. A diferença entre as duas formas de ovalbumina é apenas nesse resíduo e essas formas podem ser distinguidas imunoquimicamente por ensaios de precipitação química^(153,161).

Os primeiros estudos de curvas de titulação de proteínas foram realizados com a ovalbumina e dentre esses trabalhos destacam-se aqueles desenvolvidos por Kekwick e Cannan^(5,20) e Cannan e colaboradores⁽⁶⁾. As curvas de titulação dessa proteína, representam equilíbrios reversíveis na faixa de pH de 2 a 11. Além desses limites de pH, há indícios da participação de reações irreversíveis⁽⁶⁾. Os grupos ionizáveis dessa proteína são os carboxílicos de ácido glutâmico e aspártico, imidazóis da histidina, ε-aminos da lisina, fenólicos da tirosina e guanidina da arginina, sendo que contêm ainda dois resíduos de ácido fosfórico por cada mol de proteína. Porém alguns grupos fenólicos não são acessíveis à titulação da proteína nativa e portanto não podem ser estimados a partir da curva de titulação. Os grupos guanidina por serem bases suficientemente fortes, são convertidos quantitativamente a uma forma não ionizada, a valores de pH superiores a 12, região onde não é possível obter-se medidas precisas.

4.2 - Titulação Potenciométrica da Ovalbumina Desnaturada

Quando a ovalbumina sofre desnaturação desenrola-se completamente e irreversivelmente quaisquer que sejam as condições ou agentes desnaturantes usados⁽¹⁵⁵⁾. É uma proteína bastante sensível a desnaturantes de natureza hidrofóbica em virtude de

conter em sua estrutura grupos amidas e grupos hidrofóbicos⁽¹²⁰⁾. Foi sugerido por Kauzmann que a ação desnaturante da uréia se deve às suas propriedades hidrofóbicas⁽⁷⁷⁾, e portanto esse reagente é bastante efetivo na desnaturação da ovalbumina. Essa desnaturação é bastante lenta e um dos primeiros estudos sobre o processo foi feito por Hopkins em 1930, o qual observou que ocorre mais rapidamente em maiores concentrações de uréia⁽¹²¹⁾. Posteriormente, a cinética dessa desnaturação foi acompanhada através de medidas de rotação ótica, tendo sido observado que o simples contato da proteína com soluções de uréia, mesmo a altas concentrações, não é suficiente para influenciar as medidas. A variação de rotação ótica é indiscutivelmente resultante da desnaturação que parece ocorrer em dois estágios distintos e depende consideravelmente do tempo. Para soluções de uréia 8,01 M, o tempo requerido para desnaturação é cerca de 100 minutos⁽⁹⁶⁾. Essa dependência do desenrolamento da ovalbumina em uréia com o tempo, foi confirmada pelos experimentos de Warren & Gordon⁽⁹⁷⁾.

No estado nativo a molécula de ovalbumina é compacta e globular, porém no estado desnaturado em uréia 10 M é caracterizada por uma estrutura totalmente desenrolada permanecendo no entanto, intactas, as pontes dissulfeto^(160,162).

Como a curva de titulação dessa proteína não apresenta pontos de inflexão discretos, Godinho e Aleixo aplicaram um método de linearização a essa referida curva com o propósito de determinar e caracterizar os seus grupos tituláveis. Entretanto, essa proteína possui no estado nativo vários grupos inacessíveis à titulação por estarem protegidos numa região hidrofóbica, e assim não foi possível a titulação desses grupos⁽³⁸⁾. Desse modo, achamos que seria de interesse aplicarmos o método desenvolvido pelos autores acima citados, para a curva de titulação da ovalbumina desnaturada em soluções de uréia 8,0 M, com o propósito de verificar se realmente com a desnaturação esses grupos tornam-se acessíveis à titulação.

4.2.1 - Resultados

As soluções de ovalbumina foram tituladas em condições de força iônica 0,10 M em KCl, após desnaturação por 2 horas em

uréia 8,0 M. Essas soluções foram tratadas com excesso de HCl e tituladas com NaOH. A figura 12 mostra uma curva de titulação dessa proteína obtida pelo gráfico de pH vs. volume de NaOH adicionado. Nessa figura podemos observar também, a segmentação e linearização dessa curva, onde os segmentos de reta representam as regiões nas quais a referida curva foi dividida. Esses segmentos foram obtidos pelo gráfico das funções de Gran modificadas em função do volume de NaOH adicionado.

Nas tabelas 14, 16 e 18 são mostrados os dados das titulações de diferentes soluções de ovalbumina em uréia e em excesso de HCl. Os resultados das linearizações das curvas de titulação dessas soluções são apresentados nas tabelas 15, 17 e 19. A estequiometria e os valores de pK_a dos grupos tituláveis são dados respectivamente nas tabelas 20 e 21. Para efeito de comparação apresentamos nessas tabelas os resultados obtidos por outros pesquisadores. Os resultados referentes a esse trabalho apresentados na tabela 20, foram obtidos levando-se em conta as correções necessárias devido a presença de impurezas tituláveis em soluções de uréia e correspondem a média aritmética de 3 titulações diferentes. Nessa tabela são mostrados também o número de grupos dados pela sequência de aminoácidos. Na determinação do número de grupos tituláveis consideramos a massa molecular dessa proteína como sendo 42.699, valor também considerado num recente estudo⁽¹⁵³⁾.

TABELA 14 - Dados da titulação potenciométrica de 40,00 mL de solução con-
tendo 0,14932 g de ovalbumina em uréia 8,0M na presença de
HCl, com NaOH 0,1159 M. $I = 0,10$ M; $E_{0a}^1 = 177,4$ mV; $j_H =$
 $= -6.204,9$ mV/M; $j_{OH} = 425,5$ mV/M; $K_w = 9,89 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.200	212.6	3.945
0.400	209.5	3.996
0.500	207.8	4.025
0.600	206.0	4.055
0.700	204.0	4.088
0.800	201.9	4.123
0.901	199.6	4.162
1.000	197.3	4.200
1.100	195.8	4.242
1.200	194.0	4.289
1.300	187.0	4.339
1.400	185.8	4.393
1.500	182.3	4.452
1.602	178.5	4.515
1.650	176.6	4.547
1.700	174.5	4.582
1.751	172.3	4.619
1.800	170.1	4.656
1.850	167.9	4.693
1.900	165.1	4.740
1.950	162.8	4.779
2.000	160.0	4.826
2.050	157.1	4.874
2.100	153.9	4.928
2.160	149.8	4.997
2.200	147.0	5.044
2.250	143.0	5.111
2.300	139.0	5.178
2.400	129.8	5.353
2.450	124.7	5.419
2.500	119.3	5.510
2.550	113.2	5.613
2.600	106.5	5.725
2.645	100.0	5.835
2.660	97.6	5.875
2.675	95.2	5.916
2.690	92.7	5.958
2.705	90.1	6.002
2.720	87.4	6.047
2.760	79.7	6.177
2.815	67.4	6.384
2.860	56.5	6.568
2.946	31.6	6.988
2.975	21.9	7.152
2.985	18.1	7.216
3.000	12.0	7.319
3.015	5.5	7.429
3.025	0.8	7.508
3.035	-4.3	7.594
3.045	-9.9	7.689
3.055	-15.7	7.787
3.065	-22.3	7.898
3.075	-28.7	8.006

Continuação da Tabela 14

3.090	-38.5	8.172
3.101	-44.9	8.280
3.115	-53.1	8.418
3.140	-65.0	8.619
3.155	-71.0	8.720
3.175	-78.0	8.839
3.185	-81.3	8.894
3.200	-85.6	8.967
3.215	-89.7	9.036
3.225	-92.2	9.078
3.255	-99.1	9.194
3.300	-108.6	9.355
3.330	-114.2	9.449
3.360	-119.4	9.537
3.400	-126.1	9.650
3.445	-133.0	9.766
3.480	-138.1	9.852
3.520	-143.7	9.946
3.560	-149.1	10.037
3.600	-154.2	10.123
3.640	-159.0	10.204
3.680	-163.6	10.281
3.700	-165.9	10.320
3.725	-168.7	10.367
3.750	-171.4	10.412
3.775	-174.0	10.456
3.800	-176.5	10.498
3.825	-179.0	10.540
3.850	-181.5	10.582
3.875	-183.8	10.621
3.900	-186.2	10.661
3.925	-188.5	10.700
3.950	-190.8	10.739
3.980	-193.5	10.784
4.001	-195.4	10.816
4.025	-197.4	10.850
4.050	-199.6	10.887
4.101	-203.9	10.960
4.150	-207.8	11.026
4.175	-209.7	11.058
4.202	-211.7	11.091
4.250	-215.4	11.154
4.300	-218.9	11.213
4.350	-222.4	11.272
4.400	-225.6	11.326
4.450	-228.6	11.377
4.500	-231.5	11.426
4.550	-234.1	11.470
4.580	-235.6	11.496
4.600	-236.2	11.506
4.650	-238.6	11.547
4.700	-240.8	11.584
4.750	-243.0	11.622
4.800	-245.0	11.656
4.850	-246.9	11.688
4.900	-248.6	11.717
4.950	-250.1	11.744

TABELA 15 - Resultados da linearização da curva de titulação de ovalbumina em uréia. Valores relacionados aos dados da tabela 14.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.200	3.945		1.538E-01	1.685E-01
0.400	3.996		1.345E-01	1.453E-01
0.500	4.025		1.248E-01	1.338E-01
0.600	4.055		1.151E-01	1.222E-01
0.700	4.088		1.049E-01	1.106E-01
0.800	4.123		9.490E-02	9.898E-02
0.901	4.162		8.468E-02	8.728E-02
1.000	4.200		7.517E-02	7.580E-02
1.100	4.242		6.554E-02	6.421E-02
1.200	4.289		5.551E-02	5.262E-02
1.300	4.339		4.557E-02	4.103E-02
1.400	4.393		3.576E-02	2.944E-02
1.500	4.452		2.581E-02	1.785E-02
1.602	4.515		1.579E-02	6.029E-03
1.650	4.547		1.104E-02	4.662E-04
1.700	4.582		5.956E-03	-5.329E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.65402				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999992				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.160	4.997		5.046E-06	5.211E-06
2.200	5.044		4.882E-06	4.892E-06
2.250	5.111		4.558E-06	4.492E-06
2.300	5.178		4.223E-06	4.093E-06
2.400	5.333		3.390E-06	3.294E-06
2.450	5.419		2.950E-06	2.895E-06
2.500	5.510		2.519E-06	2.495E-06
2.550	5.613		2.073E-06	2.096E-06
2.600	5.725		1.643E-06	1.696E-06
2.645	5.835		1.283E-06	1.337E-06
2.660	5.875		1.161E-06	1.217E-06
2.675	5.916		1.047E-06	1.097E-06
2.690	5.958		9.332E-07	9.775E-07
2.705	6.002		8.212E-07	8.576E-07
2.720	6.047		7.108E-07	7.378E-07
2.760	6.177		4.243E-07	4.183E-07
2.815	6.384		2.753E-08	-2.107E-08
2.860	6.568		-2.890E-07	-3.805E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999122				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.81236				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO F/HA1= 7.98815E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.000	7.319		8.647E-09	8.559E-09
3.015	7.429		7.086E-09	7.053E-09
3.025	7.508		6.046E-09	6.049E-09
3.035	7.594		5.003E-09	5.044E-09
3.045	7.689		3.955E-09	4.040E-09
3.055	7.787		2.976E-09	3.036E-09
3.065	7.898		1.949E-09	2.032E-09
3.075	8.006		1.031E-09	1.027E-09
3.090	8.172		-3.319E-10	-4.792E-10
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999638				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 3.08523				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.00428E-07				

Continuação da Tabela 15

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.300	9.355		7.939E-11	7.739E-11
3.330	9.449		7.020E-11	6.950E-11
3.360	9.532		6.151E-11	6.160E-11
3.400	9.650		4.980E-11	5.108E-11
3.445	9.766		3.780E-11	3.923E-11
3.480	9.852		2.879E-11	3.002E-11
3.520	9.946		1.871E-11	1.950E-11
3.560	10.037		8.728E-12	8.972E-12
3.600	10.123		-9.384E-13	-1.554E-12
3.640	10.204		-1.034E-11	-1.208E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999185				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.59409				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 2.63153E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
4.001	10.816		4.228E-12	4.317E-12
4.025	10.850		4.035E-12	4.055E-12
4.050	10.887		3.778E-12	3.782E-12
4.101	10.960		3.246E-12	3.225E-12
4.150	11.026		2.731E-12	2.689E-12
4.175	11.058		2.471E-12	2.416E-12
4.202	11.091		2.188E-12	2.121E-12
4.250	11.154		1.614E-12	1.597E-12
4.300	11.213		1.061E-12	1.050E-12
4.350	11.272		4.633E-13	5.041E-13
4.400	11.326		-1.027E-13	-4.220E-14
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999437				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 4.39614				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.09259E-11				

TABELA 16 - Dados da titulação potenciométrica de 40,00 mL de solução con-
tendo 0,13952g de ovalbumina em uréia 8,0M na presença de
HCl com NaOH 0,1159 M. $I = 0,10M$; $E_{Oa}^1 = 181,8 \text{ mV}$; $j_H =$
 $= -10.891,0 \text{ mV/M}$; $j_{OH} = 415,5 \text{ mV/M}$; $K_w = 9,08 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	213.6	3.997
0.200	212.0	4.024
0.300	210.2	4.054
0.400	208.3	4.086
0.500	206.3	4.120
0.600	204.2	4.156
0.700	201.8	4.197
0.750	200.6	4.217
0.800	199.2	4.241
0.855	197.8	4.264
0.900	196.7	4.283
0.950	195.2	4.308
1.005	193.5	4.337
1.050	192.3	4.357
1.100	190.7	4.384
1.200	187.4	4.440
1.305	183.1	4.512
1.400	179.6	4.571
1.500	175.1	4.647
1.605	169.8	4.737
1.700	164.8	4.821
1.800	158.6	4.925
1.901	151.6	5.043
1.950	147.6	5.110
2.000	143.7	5.176
2.100	134.2	5.336
2.200	123.3	5.519
2.250	117.2	5.622
2.300	109.9	5.745
2.350	102.3	5.873
2.375	98.0	5.946
2.400	93.5	6.021
2.415	90.5	6.072
2.431	87.5	6.123
2.445	84.4	6.175
2.460	81.0	6.232
2.475	77.8	6.286
2.501	71.7	6.389
2.515	67.9	6.453
2.530	63.9	6.521
2.545	59.7	6.592
2.561	55.1	6.669
2.575	51.2	6.735
2.590	46.7	6.811
2.605	41.6	6.897
2.620	36.2	6.988
2.635	30.9	7.077
2.650	25.0	7.177
2.665	18.9	7.280
2.680	12.0	7.396
2.695	4.7	7.520
2.710	-4.0	7.667

Continuação da Tabela 16

2.725	-13.2	7.822
2.740	-23.3	7.993
2.755	-33.3	8.161
2.770	-42.3	8.313
2.785	-49.9	8.442
2.800	-57.3	8.567
2.815	-63.3	8.668
2.830	-68.5	8.756
2.845	-73.5	8.840
2.860	-78.0	8.916
2.876	-82.0	8.984
2.890	-85.5	9.043
2.905	-89.0	9.102
2.920	-92.2	9.155
2.936	-95.4	9.209
2.950	-98.2	9.257
2.965	-101.0	9.304
2.980	-103.8	9.351
2.995	-105.3	9.393
3.010	-108.8	9.435
3.025	-111.2	9.476
3.040	-113.6	9.516
3.055	-116.1	9.558
3.070	-118.2	9.594
3.085	-120.5	9.632
3.100	-122.8	9.671
3.115	-124.9	9.706
3.130	-127.0	9.742
3.145	-129.1	9.777
3.161	-131.3	9.814
3.175	-133.3	9.848
3.191	-135.4	9.883
3.205	-137.3	9.915
3.240	-141.8	9.991
3.280	-147.0	10.078
3.320	-151.8	10.159
3.360	-156.6	10.240
3.401	-161.3	10.319
3.450	-166.8	10.412
3.501	-172.1	10.501
3.540	-176.2	10.570
3.605	-182.6	10.678
3.660	-187.8	10.765
3.700	-191.5	10.828
3.760	-196.9	10.919
3.800	-200.4	10.978
3.850	-204.5	11.047
3.900	-208.6	11.116
3.951	-212.5	11.182
3.975	-214.3	11.212
4.000	-216.1	11.243
4.025	-217.9	11.273
4.055	-220.0	11.309
4.075	-221.2	11.329
4.100	-222.9	11.358
4.150	-226.0	11.410
4.201	-228.9	11.459
4.250	-231.6	11.505
4.300	-234.1	11.548
4.350	-236.5	11.588
4.400	-238.8	11.628

TABELA 17 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de solução de ovalbumina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da tabela 16.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.997		1.348E-01	1.486E-01
0.200	4.024		1.255E-01	1.370E-01
0.300	4.054		1.157E-01	1.254E-01
0.400	4.086		1.059E-01	1.138E-01
0.500	4.120		9.614E-02	1.022E-01
0.600	4.156		8.67E-02	9.061E-02
0.700	4.197		7.658E-02	7.902E-02
0.750	4.217		7.172E-02	7.322E-02
0.800	4.241		6.656E-02	6.743E-02
0.855	4.264		6.143E-02	6.106E-02
0.900	4.283		5.755E-02	5.584E-02
0.950	4.308		5.242E-02	5.004E-02
1.005	4.337		4.686E-02	4.367E-02
1.050	4.357		4.309E-02	3.845E-02
1.100	4.384		3.823E-02	3.266E-02
1.200	4.440		2.876E-02	2.107E-02
1.305	4.512		1.738E-02	8.900E-03
1.400	4.571		8.809E-03	-2.110E-03
1.500	4.647		-1.538E-03	-1.370E-02
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.38179				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999966				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.901	5.043		4.659E-06	4.745E-06
1.950	5.110		4.360E-06	4.358E-06
2.000	5.178		4.072E-06	3.983E-06
2.100	5.336		3.251E-06	3.173E-06
2.200	5.519		2.391E-06	2.383E-06
2.250	5.622		1.974E-06	1.988E-06
2.300	5.745		1.529E-06	1.593E-06
2.350	5.873		1.143E-06	1.198E-06
2.375	5.946		9.500E-07	1.000E-06
2.400	6.021		7.670E-07	8.029E-07
2.415	6.072		6.534E-07	6.844E-07
2.431	6.123		5.476E-07	5.579E-07
2.445	6.175		4.426E-07	4.473E-07
2.460	6.232		3.339E-07	3.288E-07
2.475	6.286		2.372E-07	2.103E-07
2.501	6.389		6.254E-08	4.937E-09
2.515	6.453		-4.164E-08	-1.057E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999423				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.50163				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 7.90018E-06				

Continuação da Tabela 17.

PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.620	6.988		1.211E-08	1.238E-08
2.635	7.077		1.100E-08	1.094E-08
2.650	7.177		9.614E-09	9.498E-09
2.665	7.280		8.219E-09	8.059E-09
2.680	7.396		6.686E-09	6.620E-09
2.695	7.520		5.227E-09	5.181E-09
2.710	7.667		3.657E-09	3.742E-09
2.725	7.822		2.225E-09	2.303E-09
2.740	7.993		8.073E-10	8.640E-10
2.755	8.161		-5.492E-10	-5.749E-10
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999604				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.74901				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 9.59292E-08				
PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.920	9.155		1.067E-10	1.046E-10
2.936	9.209		1.022E-10	1.003E-10
2.950	9.257		9.763E-11	9.650E-11
2.965	9.304		9.313E-11	9.244E-11
2.980	9.351		8.822E-11	8.838E-11
2.995	9.393		8.424E-11	8.432E-11
3.010	9.435		7.996E-11	8.026E-11
3.025	9.476		7.584E-11	7.620E-11
3.040	9.516		7.153E-11	7.215E-11
3.055	9.558		6.672E-11	6.809E-11
3.070	9.594		6.322E-11	6.403E-11
3.085	9.632		5.891E-11	5.997E-11
3.100	9.671		5.452E-11	5.591E-11
3.115	9.706		5.072E-11	5.185E-11
3.130	9.742		4.686E-11	4.779E-11
3.145	9.777		4.273E-11	4.374E-11
3.161	9.814		3.881E-11	3.941E-11
3.175	9.848		3.494E-11	3.562E-11
3.191	9.883		3.103E-11	3.129E-11
3.205	9.915		2.738E-11	2.750E-11
3.240	9.991		1.881E-11	1.803E-11
3.280	10.078		8.574E-12	7.207E-12
3.320	10.159		-9.491E-13	-3.616E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999273				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.30664				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 2.70576E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.700	10.828		4.056E-12	4.128E-12
3.760	10.919		3.493E-12	3.487E-12
3.800	10.978		3.081E-12	3.060E-12
3.850	11.047		2.576E-12	2.528E-12
3.900	11.116		2.019E-12	1.992E-12
3.951	11.182		1.468E-12	1.447E-12
3.975	11.212		1.201E-12	1.191E-12
4.000	11.243		9.294E-13	9.239E-13
4.025	11.273		6.471E-13	6.569E-13
4.055	11.309		3.080E-13	3.365E-13
4.075	11.329		1.205E-13	1.228E-13
4.100	11.358		-1.708E-13	-1.442E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99974				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 4.0865				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.06814E-11				

TABELA 18 - Dados da titulação potenciométrica de 40,00 mL de solução con-
tendo 0,14133g de ovalbumina em uréia 8,0M na presença de
HCl com NaOH 0,1159M; $I = 0,10M$; $E'_{0a} = 166,1$ mV; $j_H = -8.460,1$
mV/M; $j_{OH} = 415,5$ mV/M; $K_w = 9,07 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	200.3	3.959
0.205	198.6	3.987
0.300	197.0	4.014
0.400	195.2	4.045
0.500	193.3	4.077
0.601	191.2	4.112
0.700	189.0	4.149
0.800	186.7	4.188
0.900	184.2	4.230
1.000	181.4	4.277
1.100	178.5	4.326
1.200	175.4	4.378
1.300	171.9	4.437
1.350	170.1	4.467
1.400	168.2	4.499
1.500	164.1	4.568
1.600	159.6	4.644
1.700	154.6	4.728
1.800	149.1	4.820
1.900	142.8	4.926
2.000	135.9	5.042
2.100	127.8	5.179
2.200	118.4	5.337
2.300	107.4	5.522
2.346	101.7	5.618
2.400	94.2	5.744
2.430	89.6	5.822
2.460	84.6	5.906
2.475	81.9	5.951
2.490	79.3	5.995
2.505	76.4	6.044
2.520	73.4	6.095
2.535	70.3	6.147
2.550	67.0	6.203
2.575	61.3	6.299
2.590	57.7	6.359
2.601	55.1	6.403
2.615	51.5	6.464
2.630	47.5	6.532
2.645	43.4	6.601
2.660	39.0	6.675
2.681	32.8	6.779
2.700	26.8	6.881
2.715	21.7	6.967
2.730	16.6	7.053
2.745	10.7	7.152
2.760	4.6	7.255
2.780	-4.8	7.414
2.800	-15.0	7.586
2.815	-24.2	7.742
2.830	-34.3	7.912
2.845	-45.0	8.093

Continuação da tabela 18

2.860	-55.7	8.274
2.880	-67.5	8.473
2.901	-77.8	8.647
2.915	-83.8	8.748
2.945	-94.6	8.930
2.960	-99.4	9.011
2.980	-105.0	9.106
3.000	-110.2	9.194
3.030	-117.1	9.310
3.065	-124.5	9.435
3.100	-131.3	9.549
3.130	-136.7	9.640
3.160	-141.9	9.728
3.200	-148.4	9.837
3.230	-152.9	9.913
3.261	-157.5	9.991
3.300	-163.1	10.085
3.330	-167.0	10.151
3.360	-170.9	10.216
3.380	-173.4	10.258
3.400	-175.7	10.297
3.430	-179.3	10.358
3.460	-182.7	10.415
3.500	-187.1	10.489
3.560	-193.3	10.594
3.600	-197.3	10.661
3.646	-201.7	10.735
3.700	-206.8	10.821
3.760	-212.1	10.910
3.805	-216.0	10.976
3.835	-218.4	11.016
3.875	-221.7	11.072
3.900	-223.6	11.104
3.925	-225.6	11.138
3.950	-227.4	11.168
3.976	-229.4	11.202
4.000	-231.1	11.231
4.025	-232.9	11.261
4.050	-234.6	11.290
4.075	-236.3	11.319
4.100	-237.8	11.344
4.126	-239.5	11.373
4.150	-240.9	11.397
4.200	-243.8	11.446
4.300	-248.9	11.532
4.400	-253.4	11.609
4.501	-257.5	11.678
4.600	-261.0	11.738

TABELA 19 - Resultados da linearização da curva de titulação de ovalbumina em uréia. Valores relacionados aos dados da tabela 18.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL					
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG	AJUSTADA
0.100	3.959		1.487E-01		1.615E-01
0.205	3.987		1.381E-01		1.493E-01
0.300	4.014		1.287E-01		1.383E-01
0.400	4.045		1.188E-01		1.267E-01
0.500	4.077		1.089E-01		1.151E-01
0.601	4.112		9.864E-02		1.034E-01
0.700	4.149		8.864E-02		9.193E-02
0.800	4.188		7.891E-02		8.034E-02
0.900	4.230		6.908E-02		6.875E-02
1.000	4.277		5.888E-02		5.716E-02
1.100	4.326		4.913E-02		4.557E-02
1.200	4.378		3.950E-02		3.398E-02
1.300	4.437		2.945E-02		2.239E-02
1.350	4.467		2.459E-02		1.659E-02
1.400	4.499		1.964E-02		1.080E-02
1.500	4.568		9.554E-03		-7.949E-04
1.600	4.644		-7.515E-04		-1.238E-02
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.49314					
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999993					
PARA ACIDO HA1					
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG	AJUSTADA
2.100	5.179		3.965E-06		3.935E-06
2.200	5.337		3.185E-06		3.136E-06
2.300	5.522		2.332E-06		2.336E-06
2.346	5.618		1.946E-06		1.969E-06
2.400	5.744		1.498E-06		1.537E-06
2.430	5.822		1.256E-06		1.297E-06
2.460	5.906		1.019E-06		1.058E-06
2.475	5.951		9.004E-07		9.378E-07
2.490	5.995		7.937E-07		8.179E-07
2.505	6.044		6.799E-07		6.980E-07
2.520	6.095		5.687E-07		5.782E-07
2.535	6.147		4.600E-07		4.583E-07
2.550	6.203		3.501E-07		3.384E-07
2.575	6.299		1.722E-07		1.386E-07
2.590	6.359		-6.591E-08		1.874E-08
2.601	6.403		-8.385E-09		-6.917E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999535					
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.59235					
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 7.99176E-06					
PARA ACIDO HA2					
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG	AJUSTADA
2.730	7.053		1.209E-08		1.206E-08
2.745	7.152		1.055E-08		1.050E-08
2.760	7.255		9.018E-09		8.946E-09
2.780	7.414		6.782E-09		6.869E-09
2.800	7.586		4.725E-09		4.792E-09
2.815	7.742		3.128E-09		3.234E-09
2.830	7.912		1.618E-09		1.676E-09
2.845	8.093		1.606E-10		1.188E-10
2.860	8.274		-1.314E-09		-1.439E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999852					
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.84614					
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.03843E-07					

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.960	9.011		9.632E-11	9.440E-11
2.980	9.106		8.948E-11	8.815E-11
3.000	9.194		8.217E-11	8.190E-11
3.030	9.310		7.215E-11	7.252E-11
3.085	9.435		6.035E-11	6.157E-11
3.100	9.549		4.808E-11	5.063E-11
3.130	9.640		3.974E-11	4.125E-11
3.160	9.728		3.011E-11	3.187E-11
3.200	9.837		1.859E-11	1.936E-11
3.230	9.913		1.034E-11	9.982E-12
3.261	9.991		1.767E-12	2.889E-13
3.300	10.085		-1.010E-11	-1.191E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999324				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.26192				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 3.12672E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.700	10.821		4.725E-12	4.765E-12
3.760	10.910		4.033E-12	4.026E-12
3.805	10.976		3.473E-12	3.471E-12
3.835	11.016		3.129E-12	3.102E-12
3.875	11.072		2.615E-12	2.609E-12
3.900	11.104		2.322E-12	2.301E-12
3.925	11.138		1.992E-12	1.993E-12
3.950	11.168		1.704E-12	1.685E-12
3.976	11.202		1.359E-12	1.364E-12
4.000	11.231		1.068E-12	1.069E-12
4.025	11.261		7.466E-13	7.605E-13
4.050	11.290		4.403E-13	4.525E-13
4.075	11.319		1.229E-13	1.444E-13
4.100	11.344		-1.533E-13	-1.636E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999926				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 4.08672				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.23211E-11				

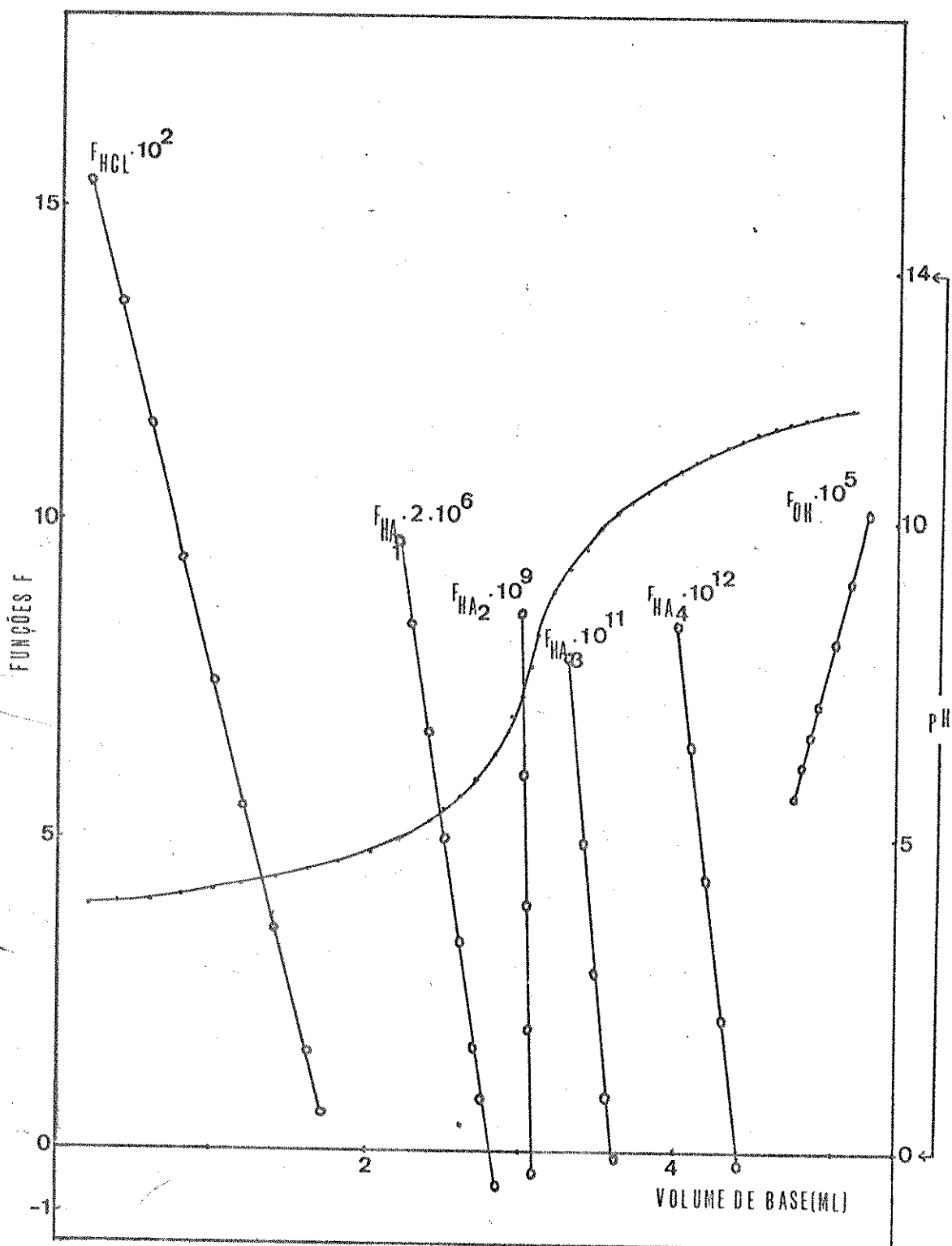


FIGURA 12 - Curva linearizada de titulação de 40,00 mL de solução contendo 0,14932g de ovalbumina em uréia 8,0 M e na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1159 M. $I = 0,10$ M.

TABELA 20 - Valores obtidos para estequiometria dos grupos tituláveis da ovalbumina

Número de moles dos grupos titulados por mol de ovalbumina					Sequência de Aminoácidos (153)
Método de Linearização		Outros métodos			
Este trabalho (em uréia 8,0 M)	Ref. 38	Ref. 6	Ref. 22		
Carboxílicos					
HA ₁	38,69 ± 0,46	27,3 ± 0,5	-	-	14 ASP
HA ₂	8,24 ± 0,22	15,9 ± 0,5	-	-	33 GLU
TOTAL	46,94 ± 0,27	43,2 ± 0,5	51	46	47
Imidazóis					
HA ₃ ⁺	14,88 ± 2,25	3,7 ± 0,3	5	7	7 HIS
Aminos					
HA ₄ ⁺	27,59 ± 1,18	12,8 ± 0,4	23	19	20 LYS
Fenólicos	-	-	-	-	10 TYR
Total de grupos	89,41 ± 2,14	59,7	79	72	84

TABELA 21 - Valores obtidos de pK_a dos grupos tituláveis da ovalbumina

	Método de Linearização		Referência (6)
	Este trabalho (em uréia 8,0M)	Referência 38 (proteína nativa)	
Carboxílicos			
HA ₁	5,10 ± 0,00	3,48 ± 0,04	-
HA ₂	7,02 ± 0,02	5,15 ± 0,05	-
Total	-	-	4,29
Imidazóis			
HA ₃ ⁺	9,55 ± 0,04	7,33 ± 0,14	6,7
Aminos			
HA ₄ ⁺	10,95 ± 0,03	10,06 ± 0,03	10,07

4.2.2 - Discussão

Podemos observar que a partir do método de linearização caracterizou-se dois tipos de grupos carboxílicos o que não foi possível através do método convencional de titulação usado por Cannan et alii⁽⁶⁾, nem através do método de titulação termométrica usado por Jespersen⁽²²⁾. Cannan e colaboradores estudando a ovalbumina em diversas forças iônicas, interpretaram os resultados através do modelo de Linderstrøm-Lang. Os resultados obtidos por Aleixo e Godinho⁽³⁸⁾ diferem daqueles encontrados por esses pesquisadores, sobretudo quanto ao número de grupos carboxílicos e aminos. A discrepância entre esses resultados foi atribuída à diferença dos métodos empregados⁽³⁸⁾. Cannan e colaboradores determinaram apenas um valor de pK_a para os grupos carboxílicos aplicando a equação baseada no modelo de Linderstrøm-Lang para o ponto médio da curva de titulação entre pH 2 e 6. Caracterizaram 51 moles de carboxílicos/mol de ovalbumina, com pK_a intrínseco de 4,29. Através do método de linearização da curva de titulação, foram obtidos 2 segmentos de reta para a região ácida, atribuídos à presença de carboxílicos provenientes de resíduos de ácido aspártico e glutâmico, tendo sido caracterizados por mol de proteína, 27,3 moles de grupos com pK_a 3,48 e 15,9 moles de grupos com pK_a 5,15, perfazendo um total de 43,2 grupos carboxílicos por mol de ovalbumina⁽³⁸⁾. Esse valor é bastante concordante com o valor determinado termometricamente por Jespersen e Jordan⁽²²⁾.

Pela seqüência de aminoácidos, o número total de resíduos aspárticos e glutâmicos é 47 grupos por mol de ovalbumina, sendo que o valor por nós encontrado para a soma do nº de moles desses grupos carboxílicos foi de $(46,94 \pm 0,27)$ /mol de proteína. Comparando-se esse resultado com aquele obtido para a proteína nativa pelo mesmo método⁽³⁸⁾, observamos que alguns grupos carboxílicos tornaram-se acessíveis à titulação após desnaturação em uréia. Ahmad e Salabruddin observaram que 2 grupos carboxílicos tornaram-se acessíveis à titulação após desnaturação em cloridrato de guanidina. Obviamente esses grupos têm um menor pK_a na proteína nativa, o que pode ser devido a presença de cargas positivas próximas ou à localização desses grupos em regiões inacessíveis à titulação. Como a maioria dos resíduos de tirosina encontram-se nessas regiões, acreditam esses auto-

res que os 2 grupos carboxílicos devem formar ligações de hidrogênio com esses resíduos no interior da proteína nativa⁽¹²⁵⁾.

A estequiometria encontrada para os grupos imidazóis foi muito discordante dos valores encontrados na literatura^(6, 22, 38 e 153). Rasper e Kauzman estudando as variações de volume que ocorrem em reações de proteínas, verificaram que na faixa de pH 5,3 a 6,8 essas variações para a ovalbumina refletem um estado anômalo que em parte pode ser explicado pela presença de fosfatos na proteína⁽²¹⁾. A influência dessas espécies sobre a curva de titulação, foi também observada por Cannan e colaboradores que sugeriram uma contribuição de 2 equivalentes desses grupos para a curva de titulação, sendo um desses grupos titulados na faixa de pH 2 e o outro na região de imidazol⁽⁶⁾.

Com relação ao número de grupos aminos observamos que para a proteína nativa, Aleixo e Godinho⁽³⁸⁾ encontraram cerca de 7 grupos a menos que aqueles dados pela seqüência de aminoácidos⁽¹⁵³⁾. Steven e Tristam estudaram a reatividade desses grupos a fluordinitrobenzeno tanto para a ovalbumina nativa quanto desnaturada⁽¹²⁴⁾. Os resultados obtidos pelos referidos autores sugerem a existência de 3 tipos de resíduos de lisina quanto à reatividade:

- a) 3 resíduos muito reativos;
- b) 9 resíduos que reagem apenas após desnaturação parcial;
- c) 8 resíduos que só reagem após a desnaturação ter atingido um estado definitivo.

Esses fatos, segundo Steven e Tristam sugerem que a proteína no estado nativo encontra-se numa forma enrolada e quando ocorre a desnaturação, a molécula desenrola-se, tornando-se os grupos aminos progressivamente acessíveis à reação⁽¹²⁴⁾.

Estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear revelaram que na lisozima, 2 resíduos de lisina interagem com grupos carboxílicos formando pares iônicos, enquanto que outros desses resíduos formam ligações de hidrogênio com outros resíduos de aminoácidos dessa proteína⁽¹⁶⁶⁾. Caso esses tipos de interações ocorram entre os grupos aminos da ovalbumina, é provável que o número desses grupos titulados não corresponda ao número de grupos esperados pela seqüência de aminoácidos o

que talvez explique o valor obtido por Godinho e Aleixo para a proteína nativa⁽³⁸⁾.

Quanto aos grupos fenólicos da tirosina, sabe-se que para a ovalbumina nativa esses grupos são estericamente inacessíveis à titulação. Katz e Miller estudaram a variação de volume produzida pela reação da proteína com algumas bases, verificando que em uréia 8,0 M essa variação é muito reduzida em relação àquela observada para a proteína nativa. Os autores atribuem essa redução, que é de 15 a 20%, à titulação de resíduos de tirosina, anteriormente localizados no interior da proteína nativa⁽²³⁾. A investigação espectrofotométrica da ionização desses grupos foi feita por Cannan e Neuberger, que observaram o efeito da desnaturação sobre essa reação, verificando que o desenrolamento da proteína provoca uma variação nos seus valores de pK_a . As variações que ocorrem no espectro de absorção, indicam que com a desnaturação a ionização desses grupos pode ocorrer em valores de pH menores que 12⁽⁷⁾. É provável que em soluções concentradas de uréia, esses grupos sejam titulados na mesma região de pH que os grupos aminos o que explica o elevado valor obtido nesse trabalho para o número de moles de grupos aminos titulados por mol de ovalbumina ($27,59 \pm 1,18$).

Comparando-se o número total de moles de grupos titulados encontrados nesse trabalho àqueles resultados determinados por Godinho e Aleixo para a proteína nativa pelo mesmo método de linearização da curva de titulação, observamos que para a proteína desnaturada em uréia, os resultados obtidos estão melhores correlacionados à sequência de aminoácidos.

O número total de moles de grupos titulados encontrados nesse trabalho excede àquele dado pela sequência de aminoácidos num valor de aproximadamente 5. Dois desses grupos excedentes podem provavelmente ser atribuídos à titulação de resíduos de ácido fosfórico presentes na proteína. Os 3 grupos restantes podem ser devido a presença de impurezas tituláveis nas soluções de ovalbumina que foram preparadas a partir do produto comercial. Além do mais, a maior discrepância observada é quanto ao número de grupos imidazóis. Esses grupos são titulados na mesma região de pH que a impureza encontrada em maior concentração nas soluções de uréia. Possivelmente, as correções de volume de titulante feitas nessa região da curva, não correspondem

ao verdadeiro volume de titulante gasto na titulação dos grupos imidazóis. Esse fato poderia ser confirmado através de titulações da proteína em soluções puras de uréia. Porém como já foi comentado, soluções desse agente desnaturante mesmo após recristalizações, possuem ainda impurezas que podem ser detectadas pelo método de linearização.

Talvez esses resultados confirmem as observações feitas por outros autores de que soluções concentradas de uréia expõem certos grupos localizados em regiões hidrofóbicas da proteína, tornando-os acessíveis a reações, comprovando portanto o desenrolamento da ovalbumina em soluções desse agente desnaturante.

Podemos observar na tabela 21 que os valores de pK_a dos grupos tituláveis encontrados em soluções de uréia, são maiores que os valores obtidos para a proteína nativa.

Levy, titulando ácido acético em uréia, determinou os valores de pK_a desse ácido nesse meio e os valores encontrados podem ser observados na tabela abaixo⁽¹⁵²⁾:

TABELA 22 - Valores de pK_a de Ácido Acético em Ureia.

Ureia (moles/l)	0	3,5	7,0
pK_a	4,78	4,97	5,28

Os resultados obtidos no nosso trabalho, comprovam a mudança do comportamento ácido-base dos grupos tituláveis em soluções de uréia. Entretanto, é difícil fazer-se uma comparação, pois os números de grupos tituláveis na proteína nativa e desnaturada são diferentes. Outro ponto a considerar é que a desnaturação altera a posição dos grupos na molécula, podendo causar mudanças no valor de pK_a . No entanto, as variações dos valores de pK_a observadas nos casos dos aminoácidos são consistentes com as conclusões de Levy⁽¹⁵²⁾.

5. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA INSULINA

5.1 - Considerações Gerais

A insulina é uma proteína bastante estudada devido ao interesse que se tem em suas propriedades fisiológicas. É um dos hormônios segregados pelos pâncreas que funciona como regulador do metabolismo dos carboidratos. Facilita a transferência de glicose do líquido extracelular para o interior das células e aumenta a taxa de transferência de aminoácidos e ácidos graxos através da membrana celular. É um poderoso agente anabólico promovendo a síntese de glicogênio no fígado e músculos, a incorporação de aminoácidos em peptídeos e proteínas e a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos. Em suma, a insulina promove o armazenamento energético regulando a concentração de glicose no sangue, sendo o único hormônio que tende a diminuir essa concentração⁽¹⁶⁷⁾.

A cristalização dessa proteína a valores de pH aproximadamente 6 só ocorre na presença de certos íons metálicos divalentes. Como há suficiente Zn^{2+} no pâncreas, essa cristalização ocorre normalmente em combinação com traços desse íon metálico⁽¹⁶⁸⁾. Há diferenças entre o comportamento da insulina contendo ou não zinco. Por exemplo, a molécula dessa proteína pode polimerizar-se em solução aquosa e essa polimerização depende da presença de íons metálicos sobretudo zinco. Marcker demonstrou que na faixa de pH 2,1 a 9,1, a massa molecular da proteína livre de zinco não é homogênea dependendo do pH e da concentração em solução. A massa molecular mínima encontrada na região ácida foi de 12.000 indicando que nessa região de pH a molécula apresenta-se como dímero, enquanto que na região alcalina a molécula existe como monômero com uma massa molecular de 6.000⁽¹⁶⁹⁾.

Para a proteína contendo zinco, Fredericq evidenciou na região ácida, a existência do monômero em soluções muito diluídas⁽¹⁷⁰⁾ e Marcker observou que essa proteína é monodispersa em soluções básicas e neutras, tendo uma massa molecular de 36.000 o que corresponde a 6 unidades de monômero⁽¹⁷¹⁾. A dimerização da proteína contendo ou não zinco, foi estudada por Marcker e

Graae que chegaram a conclusão de que o mecanismo de reação envolve as pontes dissulfeto⁽¹⁷²⁾. Porém, a menor massa molecular observada em solução aquosa foi de 12.000⁽¹⁷³⁾.

A formação do hexâmero é resultante da ligação de três dímeros a dois íons de zinco cuja coordenação altera a densidade das cadeias de polipeptídeos no hexâmero de tal modo que há uma intergeminção. O tamanho dos agregados aumenta com o aumento da concentração de proteína e de íons Zn^{2+} ⁽¹⁷⁴⁾.

A natureza da ligação de zinco com a insulina tem sido investigada^(26,171 e 175). Estudos d interação de seroalbumina com esse íon indicam que os principais sítios de ligação são os grupos imidazóis^(176,177). Tanford observou que para a insulina a combinação desse íon metálico se dá também com esses resíduos de aminoácidos, porém nesse caso dois grupos imidazóis estão envolvidos para cada íon Zn^{2+} ⁽²⁶⁾. No entanto, Gurd e Wilcox acreditam na participação de grupos α -aminos nessa ligação⁽¹⁷⁵⁾, possibilidade também aceita por Marcker que a partir de dados experimentais concluiu que os grupos N-amino terminais são essenciais nessa ligação e provavelmente o zinco está ligado ao N-terminal da fenilalanina⁽¹⁷¹⁾.

A estrutura do monômero é relativamente simples, constituída de duas cadeias distintas designadas por A e B e interligadas covalentemente por duas pontes dissulfeto. Há ainda uma terceira ponte dissulfeto intracadeia entre os resíduos 6 e 11 da cadeia A. As pontes dissulfeto intercadeias estão localizadas nos resíduos 7-7 e 20-19 das cadeias A e B respectivamente. Em 1949 Sanger separou as duas cadeias de polipeptídeos quebrando as pontes S-S por oxidação⁽¹⁷⁸⁾. É possível que essas pontes estejam envolvidas na atividade biológica dessa proteína, pois quando sofrem redução, há um grande decréscimo nessa atividade. A semelhança entre o anel 6-11 da insulina e os hormônios oxitocina e vasopressina sugerem que possivelmente essa região da molécula está intimamente relacionada à essa atividade⁽¹⁷³⁾. A presença dessas 3 pontes dissulfeto confere considerável restrição à configuração espacial da molécula⁽²⁸⁾.

A molécula de insulina é originalmente sintetizada na célula sob a forma de um precursor constituído por uma só cadeia e denominado proinsulina. A cadeia B da insulina é a porção amino enquanto que a cadeia A é a porção carboxílica desse precur-

52

sor⁽¹⁷⁹⁾. A conversão de proinsulina à insulina ocorre em grânulos formados por vesiculação do aparelho de Golgi e o processo completo para a biossíntese da insulina ocorre em aproximadamente 6 a 8 horas⁽¹⁸⁰⁾. A proinsulina contém 81 resíduos de aminoácidos, enquanto que a insulina tem apenas 51 resíduos.

A sequência de aminoácidos para as insulinas de diversas espécies difere em algumas regiões da estrutura. Devido a essas variações, Blundell et alii acham conveniente considerar-se a sequência de aminoácidos em 4 grupos. Essas insulinas têm geralmente 21 resíduos de aminoácidos na cadeia A e 30 na cadeia B⁽¹⁸⁰⁾, sendo que cerca de 30 grupos são tituláveis.

5.2 - Titulação Potenciométrica da Insulina Nativa

As curvas de titulação dessa proteína têm sido estudadas^(7, 25-29) observando-se que diferem para a insulina contendo ou não íons de zinco na estrutura^(25,26). Seus grupos ionizáveis são os α -carboxílicos, carboxílicos de ácido glutâmico, imidazóis da histidina, α -aminos, ϵ -aminos da lisina, fenólicos da tirosina e guanidina da arginina. A valores de pH 9,9 todos os grupos imidazóis e a maioria dos α -aminos dessa proteína devem estar ionizados, enquanto que muitos ϵ -aminos e todos os grupos guanidinos retêm ainda suas cargas positivas. Os grupos fenólicos dissociam-se a maiores valores de pH e a pH 13,0 suas ionizações não devem ser ainda completas⁽⁷⁾.

Fredericq estudou a curva de titulação da insulina cristalina em KCl 0,1 M no intervalo de pH 2 a 11 e observou que na faixa alcalina de pH a titulação não é reversível. Considerou 3 regiões: a) região onde a curva é homogênea na faixa de pH 2 a 3,6; b) na faixa de pH 3,6 a 7 onde há um desdobramento da curva; c) meio alcalino onde a curva é mais complexa e a pH 9 a proteína é insolúvel, porém se for dissolvida anteriormente em álcali ou ácido, sua solubilidade entre pH 7 e 9 aumenta consideravelmente. O referido autor separou a porção insolúvel em frações de acordo com a fraca solubilidade e observou que a fração mais solúvel apresentava uma curva reversível, enquanto que a menos solúvel dissociava-se em número menor de íons H^+ em soluções alcalinas, mas esse número aumentava acima de pH 10,5.

Essas variações dos grupos dissociáveis foram interpretadas como sendo devido a presença de ligações especiais envolvendo grupos fenólicos e imidazóis⁽²⁷⁾.

Tanford e Epstein estudaram a curva de dissociação da insulina contendo zinco e da insulina livre deste elemento, observando que no primeiro caso a proteína não se comporta reversivelmente. O número de grupos titulados para a insulina contendo zinco é maior que o número de grupos titulados para essa proteína livre de zinco e a diferença é de 2 grupos por monômero, segundo esses autores, esses resultados correspondem possivelmente à dissociação de íons H^+ da esfera de hidratação de íons de zinco^(25 e 26).

Nesse nosso trabalho o comportamento ácido-base da proteína contendo zinco foi investigado em 2 condições de força iônica e na presença de uréia. Observamos a formação de um precipitado para as soluções tituladas na ausência de uréia. Tanford e Epstein sugerem que esse precipitado é altamente hidratado e portanto não afeta a reprodutibilidade dos resultados⁽²⁶⁾.

5.2.1 - Resultados

As soluções de insulina considerada nativa foram tituladas em condições de força iônica 0,10 M e 1,0 M em KCl. Essas soluções foram tratadas com excesso de HCl e tituladas com NaOH. As curvas de titulação dessa proteína em KCl 0,10 M e 1,0 M podem ser observadas nas figuras 13 e 14 respectivamente, onde também são apresentados os segmentos de reta obtidos pela linearização das curvas segmentadas em 5 regiões. Esses segmentos foram obtidos, como já foi citado, através do gráfico das funções de Gran modificadas vs. volume de base adicionada. As determinações dos volumes de equivalência e constantes de dissociação foram feitas conforme procedimento já descrito. As tabelas 23 e 25 apresentam os dados das titulações de diferentes soluções de insulina em KCl 0,10 M, enquanto que as tabelas 27, 29 e 31 mostram os dados das titulações dessa proteína em KCl 1,0 M. Os resultados da linearização dessas curvas são apresentados nas tabelas 24, 26, 28, 30 e 32. A estequiometria e os valores de pK_a dos grupos tituláveis são dados respectivamente nas tabelas 33 e 34 e referem-se a média aritmética de titulações dife-

rentes. Na determinação do número de grupos tituláveis consideramos a massa molecular como sendo 11.466 valor também considerado no trabalho de Tanford e Epstein^(25 e 26). Nas tabelas 33 e 34 são apresentados também os resultados obtidos em outros trabalhos. Convém salientar que os valores de pK_a obtidos nos trabalhos citados na tabela 34^(26 e 27) são valores de pK_a intrínsecos.

TABELA 23 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,0189 g de insulina na presença de HCl, com NaOH 0,1369 M. $I = 0,10M$; $E_{oa}^i = 254,1$ mV; $j_H = 0,0$ mV/M; $j_{OH} = 376,4$ mV/M; $K_w = 1,81 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.250	325.5	1.793
0.500	323.5	1.827
0.750	321.3	1.864
1.000	319.0	1.903
1.250	316.4	1.947
1.500	313.6	1.994
1.750	310.6	2.045
2.000	307.1	2.104
2.250	303.2	2.170
2.500	298.7	2.246
2.750	293.3	2.337
3.000	286.6	2.451
3.260	277.3	2.608
3.500	264.5	2.824
3.750	239.5	3.247
3.800	230.3	3.402
3.820	225.8	3.478
3.835	222.1	3.541
3.850	217.7	3.615
3.875	212.9	3.696
3.880	207.2	3.793
3.890	203.0	3.864
3.900	198.4	3.942
3.910	193.1	4.031
3.920	187.6	4.124
3.930	181.2	4.232
3.940	173.6	4.361
3.950	164.7	4.511
3.960	153.8	4.695
3.970	140.5	4.920
3.980	124.5	5.191
3.990	109.9	5.437
4.000	95.1	5.688
4.010	79.5	5.951
4.020	66.8	6.166
4.030	49.4	6.460
4.040	30.8	6.775
4.050	11.0	7.109
4.060	-9.5	7.456
4.070	-31.4	7.826
4.080	-54.9	8.223
4.091	-76.6	8.590
4.100	-92.7	8.862
4.110	-108.3	9.126
4.120	-120.0	9.324
4.130	-130.0	9.493
4.140	-138.0	9.628
4.150	-145.1	9.748
4.160	-150.7	9.843
4.170	-155.5	9.925
4.180	-159.9	9.999

Continuação da Tabela 23.

4.190	-163.6	10.062
4.200	-167.1	10.121
4.210	-170.1	10.172
4.220	-173.0	10.221
4.230	-175.6	10.265
4.241	-178.1	10.308
4.251	-180.3	10.345
4.260	-182.2	10.378
4.270	-184.2	10.412
4.281	-186.3	10.447
4.290	-187.8	10.473
4.300	-189.4	10.500
4.340	-195.2	10.599
4.400	-202.2	10.719
4.440	-205.9	10.783
4.480	-209.3	10.841
4.500	-210.8	10.867
4.550	-214.3	10.927
4.600	-217.3	10.979
4.650	-220.1	11.028
4.700	-222.6	11.071

TABELA 24 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de solução de insulina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 23.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS			
PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.250	1.793	4.869E-01	4.912E-01
0.500	1.827	4.541E-01	4.570E-01
0.750	1.864	4.202E-01	4.227E-01
1.000	1.903	3.873E-01	3.885E-01
1.250	1.947	3.528E-01	3.543E-01
1.500	1.994	3.183E-01	3.201E-01
1.750	2.045	2.859E-01	2.858E-01
2.000	2.104	2.53E-01	2.516E-01
2.250	2.170	2.15E-01	2.174E-01
2.500	2.246	1.837E-01	1.832E-01
2.750	2.337	1.498E-01	1.489E-01
3.000	2.451	1.159E-01	1.147E-01
3.260	2.608	8.060E-02	7.912E-02
3.500	2.824	4.795E-02	4.627E-02
3.750	3.247	1.411E-02	1.204E-02
3.800	3.402	6.963E-03	5.197E-03
3.820	3.478	4.061E-03	2.459E-03
3.835	3.541	1.910E-03	4.051E-04
3.850	3.615	-4.090E-04	-1.648E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 3.83796			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999995			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.910	4.031	1.338E-05	1.313E-05
3.920	4.124	1.113E-05	1.106E-05
3.930	4.232	8.886E-06	8.992E-06
3.940	4.361	6.689E-06	6.923E-06
3.950	4.511	4.646E-06	4.854E-06
3.960	4.695	2.695E-06	2.786E-06
3.970	4.920	8.248E-07	7.173E-07
3.980	5.191	-1.138E-06	-1.351E-06
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999325			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 3.97347			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 2.06854E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.000	5.688	5.510E-08	5.325E-08
4.010	5.951	4.020E-08	4.171E-08
4.020	6.166	3.036E-08	3.018E-08
4.030	6.460	1.704E-08	1.864E-08
4.040	6.775	6.530E-09	7.103E-09
4.050	7.109	-2.787E-09	-4.434E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.997571			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 4.04616			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.15371E-06			
PARA ACIDA HA3			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.060	7.456	4.660E-10	4.565E-10
4.070	7.826	3.300E-10	3.218E-10
4.080	8.223	1.585E-10	1.871E-10
4.091	8.590	3.276E-11	3.900E-11
4.100	8.862	-6.513E-11	-8.220E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996487			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 4.0939			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.3467E-08			

Continuação da Tabela 24.

PARA ACIDO HA4			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.130	9.493	5.420E-12	5.277E-12
4.140	9.628	4.052E-12	3.972E-12
4.150	9.748	2.484E-12	2.666E-12
4.160	9.843	1.217E-12	1.361E-12
4.170	9.925	1.278E-14	5.596E-14
4.180	9.999	-1.264E-12	-1.249E-12
4.190	10.062	-2.394E-12	-2.555E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998858			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 4.17043			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.30522E-10			

TABELA 25 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,0210g de insulina na presença de HCl, com NaOH 0,1369 M. $I = 0,10$ M; $E_{0a}^I = 252,8$ mV; $j_H = 0,0$ mV/M; $j_{OH} = 376,4$ mV/M; $K_w = 1,81 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.500	326.6	1.753
1.000	322.7	1.818
1.502	318.3	1.893
2.000	313.2	1.979
2.500	307.0	2.084
3.000	299.1	2.217
3.200	295.2	2.283
3.400	290.7	2.359
3.600	285.3	2.451
3.810	278.2	2.571
4.000	269.8	2.713
4.210	255.8	2.949
4.300	246.9	3.100
4.350	240.5	3.208
4.380	235.9	3.286
4.402	232.0	3.352
4.420	228.5	3.411
4.430	226.3	3.448
4.440	224.0	3.487
4.450	221.6	3.527
4.460	219.1	3.570
4.470	216.2	3.619
4.480	213.2	3.669
4.490	209.8	3.727
4.500	206.2	3.788
4.510	202.3	3.854
4.520	198.0	3.926
4.530	193.1	4.009
4.540	187.9	4.097
4.551	181.4	4.207
4.560	175.6	4.305
4.570	167.6	4.440
4.580	158.1	4.601
4.590	147.2	4.785
4.600	133.6	5.015
4.610	120.0	5.245
4.620	106.6	5.471
4.630	93.0	5.701
4.641	78.4	5.948
4.650	67.2	6.137
4.660	53.8	6.364
4.670	37.1	6.646
4.680	19.2	6.949
4.690	0.8	7.260
4.700	-18.8	7.591
4.710	-38.6	7.926
4.720	-59.1	8.272
4.730	-77.8	8.588
4.740	-94.3	8.867
4.750	-108.3	9.104
4.760	-120.0	9.302
4.770	-129.9	9.469
4.780	-137.9	9.605

Continuação da Tabela 25.

4.790	-144.6	9.718
4.800	-149.9	9.808
4.810	-154.8	9.891
4.821	-159.4	9.969
4.830	-163.0	10.030
4.840	-166.1	10.082
4.850	-169.1	10.133
4.860	-171.7	10.177
4.870	-174.1	10.218
4.880	-176.5	10.259
4.891	-179.0	10.301
4.900	-180.8	10.332
4.920	-184.6	10.396
4.940	-188.1	10.456
4.960	-190.9	10.504
5.000	-196.2	10.594
5.040	-200.9	10.674
5.080	-204.7	10.740
5.130	-209.1	10.815
5.160	-211.3	10.853
5.191	-213.5	10.891
5.220	-215.5	10.926

TABELA 26 - Resultados da linearização da curva de titulação de solução de insulina. Valores relacionados aos dados da Tabela 25.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.500	1.753	5.390E-01	5.424E-01
1.000	1.818	4.706E-01	4.740E-01
1.502	1.893	4.029E-01	4.053E-01
2.000	1.979	3.355E-01	3.371E-01
2.500	2.084	2.675E-01	2.686E-01
3.000	2.217	1.994E-01	2.002E-01
3.200	2.283	1.722E-01	1.728E-01
3.400	2.359	1.452E-01	1.454E-01
3.600	2.451	1.180E-01	1.181E-01
3.810	2.571	8.955E-02	8.931E-02
4.000	2.713	6.412E-02	6.330E-02
4.210	2.949	3.559E-02	3.455E-02
4.300	3.100	2.346E-02	2.223E-02
4.350	3.208	1.667E-02	1.538E-02
4.380	3.286	1.255E-02	1.127E-02
4.402	3.352	9.454E-03	8.263E-03
4.420	3.411	6.949E-03	5.799E-03
4.430	3.448	5.489E-03	4.430E-03
4.440	3.487	4.049E-03	3.061E-03
4.450	3.527	2.632E-03	1.692E-03
4.460	3.570	1.242E-03	3.229E-04
4.470	3.619	-2.701E-04	-1.046E-03
4.480	3.669	-1.729E-03	-2.415E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 4.46236			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999999			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.520	3.926	1.618E-05	1.577E-05
4.530	4.009	1.376E-05	1.374E-05
4.540	4.097	1.138E-05	1.172E-05
4.551	4.207	9.245E-06	9.496E-06
4.560	4.305	7.502E-06	7.675E-06
4.570	4.440	5.461E-06	5.652E-06
4.580	4.601	3.523E-06	3.629E-06
4.590	4.785	1.749E-06	1.606E-06
4.600	5.015	-1.250E-07	-4.165E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999108			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 4.59794			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 2.02291E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.630	5.701	6.440E-08	6.160E-08
4.641	5.948	4.793E-08	4.863E-08
4.650	6.137	3.669E-08	3.803E-08
4.660	6.364	2.476E-08	2.624E-08
4.670	6.646	1.264E-08	1.446E-08
4.680	6.949	2.724E-09	2.677E-09
4.690	7.260	-6.617E-09	-9.107E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.997158			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 4.68227			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.17839E-06			

PARA ACIDA HA3			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.710	7.926	3.016E-10	2.888E-10
4.720	8.272	1.577E-10	1.727E-10
4.730	8.588	4.814E-11	5.656E-11
4.740	8.867	-4.900E-11	-5.958E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.995809			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 4.73487			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.16127E-08			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
4.770	9.469	5.908E-12	5.761E-12
4.780	9.605	4.679E-12	4.666E-12
4.790	9.718	3.436E-12	3.571E-12
4.800	9.808	2.443E-12	2.476E-12
4.810	9.891	1.310E-12	1.381E-12
4.821	9.969	1.656E-13	1.760E-13
4.830	10.030	-8.869E-13	-8.095E-13
4.840	10.082	-1.740E-12	-1.905E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99922			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 4.82261			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.09504E-10			

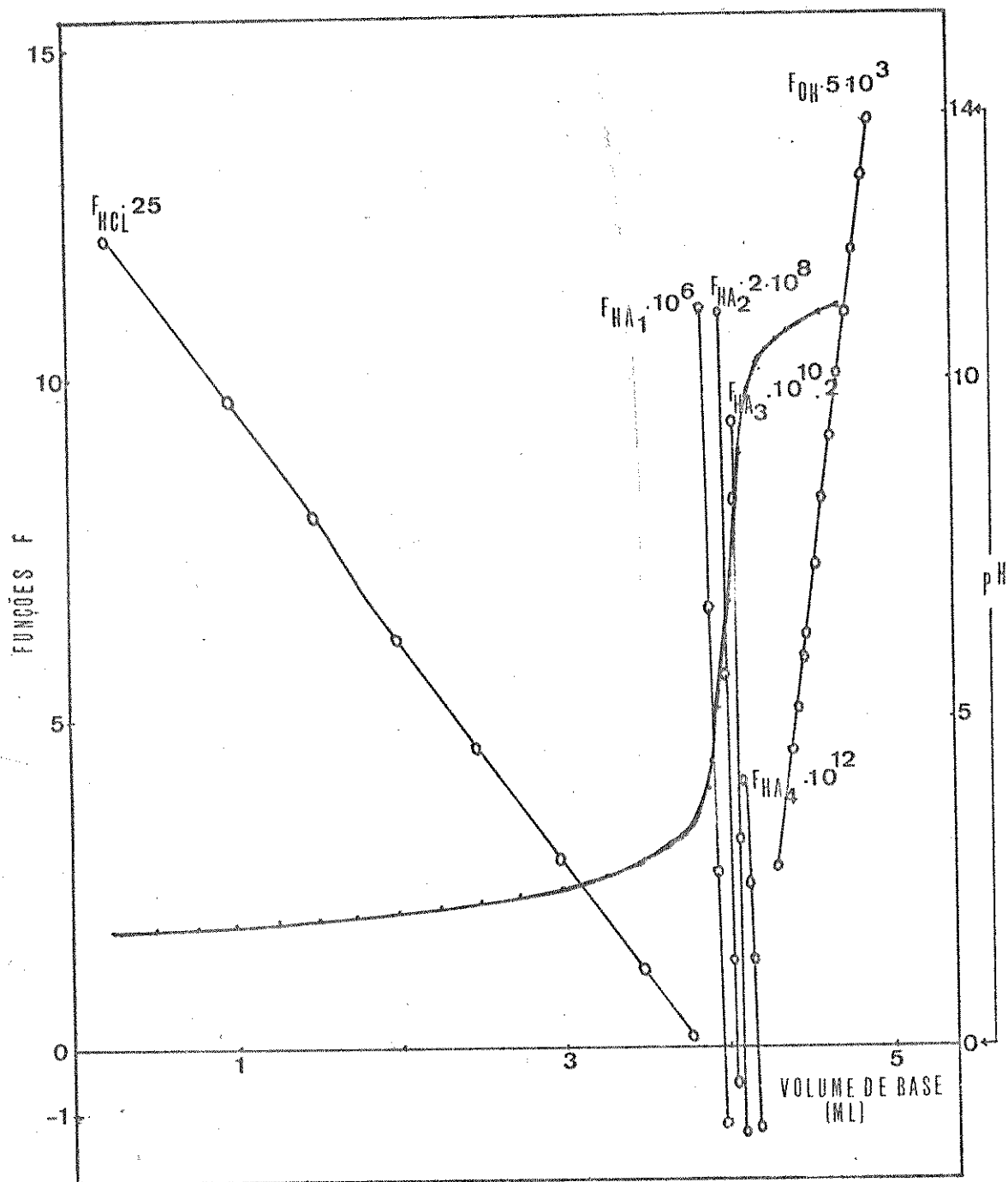


FIGURA 13 - Curva linearizada de titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,0189 g de insulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1369 M. $I = 0,10$ M.

TABELA 27 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,0127g de insulina na presença de HCl, com NaOH 0,1150 M. $I = 1,0M$; $E_{Oa}^I = 246,6$ mV; $j_H = 0,0mV/M$; $j_{OH} = 370,1$ mV/M; $K_W = 1,74 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.300	307.1	1.977
0.500	305.1	2.011
0.750	302.3	2.058
1.000	299.2	2.111
1.200	296.5	2.157
1.400	293.5	2.207
1.600	290.1	2.265
1.800	286.3	2.329
2.000	281.9	2.403
2.101	279.4	2.446
2.200	276.7	2.491
2.300	273.6	2.544
2.401	270.2	2.601
2.500	266.3	2.667
2.600	261.7	2.745
2.700	256.2	2.838
2.800	249.3	2.954
2.860	244.2	3.041
2.900	240.1	3.110
2.942	235.1	3.194
3.000	226.4	3.341
3.020	222.5	3.407
3.040	218.3	3.478
3.060	213.2	3.565
3.080	207.8	3.656
3.100	200.7	3.776
3.120	191.6	3.930
3.140	180.6	4.116
3.160	165.2	4.376
3.182	145.3	4.712
3.200	123.3	5.084
3.220	95.8	5.549
3.240	63.7	6.092
3.260	21.0	6.813
3.281	-32.2	7.713
3.300	-79.7	8.516
3.320	-116.3	9.134
3.340	-138.8	9.515
3.360	-153.1	9.757
3.380	-163.6	9.935
3.400	-171.4	10.067
3.420	-177.8	10.175
3.441	-183.2	10.267
3.460	-187.6	10.342
3.480	-191.3	10.405
3.500	-194.7	10.463
3.520	-197.8	10.515
3.540	-200.6	10.563
3.560	-203.1	10.606
3.580	-205.4	10.645
3.600	-207.5	10.681
3.620	-209.5	10.715

Continuação da Tabela 27.

3.641	-211.4	10.748
3.660	-213.1	10.777
3.680	-214.6	10.803
3.700	-216.2	10.830
3.720	-217.6	10.854
3.740	-219.0	10.878
3.761	-220.3	10.901
3.780	-221.5	10.922
3.801	-222.7	10.942
3.821	-223.9	10.963
3.840	-224.9	10.980
3.860	-226.0	10.999
3.885	-227.2	11.020
3.900	-227.9	11.032
3.920	-228.9	11.050
3.940	-229.8	11.065
3.960	-230.7	11.081
3.980	-231.5	11.095
4.000	-232.4	11.111
4.020	-233.1	11.123
4.040	-233.9	11.137
4.060	-234.7	11.151
4.080	-235.4	11.163
4.100	-236.1	11.176
4.120	-236.9	11.190
4.140	-237.5	11.200
4.160	-238.2	11.212
4.200	-239.4	11.234
4.300	-242.3	11.285
4.400	-244.9	11.331
4.500	-247.3	11.374
4.601	-249.4	11.412

TABELA 28 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de solução de insulina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 27.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS			
PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.300	1.977	3.191E-01	3.218E-01
0.500	2.011	2.971E-01	2.988E-01
0.750	2.058	2.686E-01	2.701E-01
1.000	2.111	2.391E-01	2.413E-01
1.200	2.157	2.171E-01	2.183E-01
1.400	2.207	1.941E-01	1.953E-01
1.600	2.265	1.713E-01	1.723E-01
1.800	2.329	1.483E-01	1.493E-01
2.000	2.403	1.260E-01	1.263E-01
2.101	2.446	1.146E-01	1.147E-01
2.200	2.491	1.034E-01	1.033E-01
2.300	2.544	9.186E-02	9.184E-02
2.401	2.601	8.059E-02	8.023E-02
2.500	2.667	6.928E-02	6.884E-02
2.600	2.745	5.786E-02	5.734E-02
2.700	2.838	4.653E-02	4.584E-02
2.800	2.954	3.518E-02	3.434E-02
2.860	3.041	2.843E-02	2.744E-02
2.900	3.110	2.383E-02	2.284E-02
2.942	3.194	1.904E-02	1.801E-02
3.000	3.341	1.239E-02	1.134E-02
3.020	3.407	9.963E-03	9.044E-03
3.040	3.478	7.651E-03	6.744E-03
3.060	3.565	5.195E-03	4.444E-03
3.080	3.656	2.945E-03	2.144E-03
3.100	3.776	4.247E-04	-1.561E-04
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 3.09864			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999998			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.120	3.930	1.106E-05	1.069E-05
3.140	4.116	7.691E-06	7.800E-06
3.160	4.376	4.352E-06	4.912E-06
3.182	4.712	1.670E-06	1.735E-06
3.200	5.084	-5.061E-07	-8.641E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996493			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 3.19402			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.44403E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.220	5.549	7.637E-08	7.225E-08
3.240	6.092	3.672E-08	4.105E-08
3.260	6.813	6.369E-09	9.855E-09
3.281	7.713	-1.920E-08	-2.291E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99392			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 3.26632			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.55999E-06			

Continuação da Tabela 28.

PARA ACIDO HA3			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.281	7.713	2.704E-10	2.586E-10
3.300	8.516	6.593E-11	8.893E-11
3.320	9.134	-7.851E-11	-8.971E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.993524			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.30996			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 8.93212E-09			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.340	9.515	2.965E-12	3.066E-12
3.360	9.757	1.671E-12	1.542E-12
3.380	9.935	1.72E-14	1.785E-14
3.400	10.067	-1.503E-12	-1.506E-12
3.420	10.175	-3.045E-12	-3.031E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=.9994			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.38023			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 7.6209E-11			

TABELA 29 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução com tendo 0,01881 g de insulina na presença de HCl, com NaOH 0,1150 M; $I = 1,0M$; $E_{Oa}^i = 246,6 \text{ mV}$; $j_H = 0,0 \text{ mV/M}$; $j_{OH} = 370,1 \text{ mV/M}$; $K_w = 1,74 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	291.8	2.236
0.200	290.0	2.266
0.300	288.0	2.300
0.400	285.9	2.336
0.500	283.7	2.373
0.600	281.3	2.413
0.700	278.6	2.459
0.800	275.6	2.510
0.900	272.3	2.566
1.000	268.6	2.628
1.100	264.2	2.703
1.200	259.0	2.790
1.300	252.6	2.899
1.400	244.4	3.037
1.420	242.4	3.071
1.440	240.3	3.106
1.460	238.0	3.145
1.480	235.4	3.189
1.500	232.7	3.235
1.515	230.5	3.272
1.530	228.1	3.313
1.545	225.5	3.357
1.561	222.6	3.406
1.581	218.5	3.475
1.600	213.6	3.558
1.615	209.5	3.627
1.630	205.1	3.701
1.645	199.7	3.793
1.660	193.5	3.898
1.675	186.7	4.013
1.690	178.6	4.149
1.701	172.1	4.259
1.715	162.0	4.430
1.730	151.0	4.616
1.745	138.7	4.824
1.761	124.3	5.067
1.775	109.4	5.319
1.790	94.8	5.566
1.801	84.3	5.743
1.816	65.2	6.066
1.830	41.4	6.469
1.846	13.3	6.944
1.860	-11.5	7.363
1.880	-50.6	8.024
1.900	-86.8	8.636
1.915	-109.7	9.023
1.930	-127.1	9.317
1.945	-140.8	9.549
1.960	-151.2	9.725
1.975	-159.3	9.862
1.990	-165.6	9.969
2.001	-169.8	10.040

Continuação da Tabela 29.

2.015	-174.2	10.114
2.030	-178.6	10.189
2.045	-182.4	10.253
2.060	-185.8	10.311
2.075	-188.7	10.361
2.100	-195.6	10.478
2.145	-199.7	10.548
2.200	-206.1	10.657
2.245	-210.6	10.734
2.300	-215.2	10.813
2.345	-218.4	10.868
2.401	-222.1	10.932
2.445	-224.7	10.977
2.500	-227.6	11.027
2.545	-229.8	11.065
2.601	-232.2	11.107
2.700	-236.1	11.176
2.800	-239.5	11.235
2.900	-242.6	11.290
3.000	-245.2	11.337

TABELA 30 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de solução de insulina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 29.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	2.236	1.746E-01	1.763E-01
0.200	2.266	1.633E-01	1.648E-01
0.300	2.300	1.515E-01	1.533E-01
0.400	2.336	1.400E-01	1.418E-01
0.500	2.373	1.289E-01	1.303E-01
0.600	2.413	1.177E-01	1.188E-01
0.700	2.459	1.063E-01	1.073E-01
0.800	2.510	9.176E-02	9.584E-02
0.900	2.566	8.150E-02	8.434E-02
1.000	2.628	7.139E-02	7.284E-02
1.100	2.703	6.099E-02	6.134E-02
1.200	2.790	4.970E-02	4.984E-02
1.300	2.899	3.846E-02	3.834E-02
1.400	3.037	2.738E-02	2.684E-02
1.420	3.071	2.514E-02	2.454E-02
1.440	3.106	2.294E-02	2.224E-02
1.460	3.145	2.071E-02	1.994E-02
1.480	3.189	1.839E-02	1.764E-02
1.500	3.235	1.619E-02	1.534E-02
1.515	3.272	1.453E-02	1.361E-02
1.530	3.313	1.285E-02	1.189E-02
1.545	3.357	1.116E-02	1.016E-02
1.561	3.406	9.430E-03	8.321E-03
1.581	3.475	7.212E-03	6.021E-03
1.600	3.558	4.862E-03	3.836E-03
1.615	3.627	3.103E-03	2.111E-03
1.630	3.701	1.390E-03	3.856E-04
1.645	3.793	-5.077E-04	-1.339E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.63335			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999993			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.690	4.149	7.051E-06	6.793E-06
1.701	4.259	5.706E-06	5.665E-06
1.715	4.430	3.936E-06	4.228E-06
1.730	4.616	2.467E-06	2.689E-06
1.745	4.824	1.124E-06	1.150E-06
1.761	5.067	-2.483E-07	-4.911E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996559			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 1.75621			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.02596E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.790	5.566	9.414E-08	9.382E-08
1.801	5.743	8.152E-08	7.623E-08
1.816	6.066	5.036E-08	5.225E-08
1.830	6.469	2.224E-08	2.987E-08
1.846	6.944	2.692E-09	4.286E-09
1.860	7.363	-1.259E-08	-1.810E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.993338			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 1.84868			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.59881E-06			

Continuação da Tabela 30.

PARA ACIDO HA3			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.860	7.363	4.782E-10	4.718E-10
1.880	8.024	2.751E-10	2.776E-10
1.900	8.636	6.571E-11	8.349E-11
1.915	9.023	-4.828E-11	-6.212E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998289			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 1.9086			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 9.70743E-09			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.945	9.549	4.315E-12	4.242E-12
1.960	9.725	3.141E-12	3.136E-12
1.975	9.862	1.941E-12	2.030E-12
1.990	9.969	9.077E-13	9.240E-13
2.001	10.040	5.104E-14	1.131E-13
2.015	10.114	-8.710E-13	-9.190E-13
2.030	10.189	-1.984E-12	-2.025E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999639			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 2.00253			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 7.37218E-11			

TABELA 31 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução con-
tendo 0,01881 g de insulina na presença de HCl, com NaOH
0,1150 M; $I = 1,0M$; $E'_{0a} = 246,6 \text{ mV}$; $j_H = 0,0 \text{ mV/M}$; $j_{OH} =$
 $= 370,1 \text{ mV/M}$; $k_w = 1,74 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	292.1	2.231
0.200	290.3	2.261
0.300	288.4	2.293
0.400	286.3	2.329
0.500	284.1	2.366
0.600	281.7	2.407
0.700	279.1	2.451
0.800	276.2	2.500
0.900	272.9	2.555
1.000	269.2	2.618
1.060	266.7	2.660
1.100	264.9	2.691
1.160	262.0	2.740
1.200	259.9	2.775
1.245	257.3	2.819
1.300	253.8	2.878
1.345	250.5	2.934
1.400	245.8	3.014
1.445	241.4	3.088
1.500	234.9	3.198
1.545	228.3	3.309
1.560	225.7	3.353
1.600	217.6	3.490
1.615	214.0	3.551
1.630	210.0	3.619
1.645	205.3	3.698
1.660	200.1	3.786
1.675	194.1	3.887
1.690	187.1	4.006
1.700	182.0	4.092
1.710	176.4	4.187
1.720	170.2	4.291
1.731	162.7	4.418
1.740	155.7	4.537
1.750	147.6	4.673
1.760	139.2	4.815
1.770	129.8	4.974
1.780	119.9	5.142
1.790	110.6	5.299
1.800	101.3	5.456
1.810	92.5	5.605
1.820	82.2	5.779
1.830	70.4	5.978
1.840	54.1	6.254
1.850	37.3	6.538
1.860	21.4	6.807
1.875	-4.3	7.241
1.890	-31.6	7.703
1.900	-51.0	8.030
1.915	-78.5	8.495
1.930	-103.0	8.909
1.945	-122.1	9.232

Continuação da Tabela 31.

1.960	-136.2	9.471
1.975	-147.0	9.654
1.990	-155.7	9.801
2.000	-160.1	9.875
2.015	-166.6	9.986
2.030	-171.9	10.075
2.045	-176.5	10.153
2.075	-183.8	10.277
2.100	-188.7	10.361
2.145	-196.3	10.490
2.175	-200.5	10.561
2.200	-207.4	10.611
2.245	-208.3	10.695
2.300	-217.2	10.779
2.345	-217.7	10.839
2.400	-220.5	10.904
2.500	-236.2	11.003
2.600	-241.0	11.086
2.700	-235.1	11.158
2.800	-238.5	11.218
2.900	-241.6	11.273
3.000	-244.4	11.322
3.100	-246.8	11.365
3.202	249.1	2.958
3.300	-251.1	11.443
3.500	-254.8	11.511

TABELA 32 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de solução de insulina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 31.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	2.231	1.766E-01	1.779E-01
0.200	2.261	1.651E-01	1.664E-01
0.300	2.293	1.538E-01	1.549E-01
0.400	2.329	1.422E-01	1.434E-01
0.500	2.366	1.309E-01	1.319E-01
0.600	2.407	1.195E-01	1.204E-01
0.700	2.451	1.083E-01	1.089E-01
0.800	2.500	9.694E-02	9.736E-02
0.900	2.555	8.540E-02	8.586E-02
1.000	2.618	7.401E-02	7.436E-02
1.060	2.660	6.715E-02	6.746E-02
1.100	2.691	6.258E-02	6.286E-02
1.160	2.740	5.584E-02	5.596E-02
1.200	2.775	5.138E-02	5.136E-02
1.245	2.819	4.631E-02	4.618E-02
1.300	2.878	4.020E-02	3.986E-02
1.345	2.934	3.511E-02	3.468E-02
1.400	3.014	2.882E-02	2.836E-02
1.445	3.088	2.381E-02	2.318E-02
1.500	3.198	1.765E-02	1.686E-02
1.545	3.309	1.261E-02	1.168E-02
1.560	3.353	1.088E-02	9.960E-03
1.600	3.490	6.282E-03	5.360E-03
1.615	3.551	4.539E-03	3.635E-03
1.630	3.619	2.777E-03	1.910E-03
1.645	3.698	9.073E-04	1.849E-04
1.660	3.786	-9.489E-04	-1.540E-03
1.675	3.887	-2.857E-03	-3.265E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.64661			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999995			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.690	4.006	9.993E-06	9.640E-06
1.700	4.092	8.480E-06	8.366E-06
1.710	4.187	7.025E-06	7.092E-06
1.720	4.291	5.623E-06	5.818E-06
1.731	4.418	4.176E-06	4.416E-06
1.740	4.537	3.006E-06	3.269E-06
1.750	4.673	1.838E-06	1.995E-06
1.760	4.815	7.572E-07	7.213E-07
1.770	4.974	-3.854E-07	-5.528E-07
1.780	5.142	-1.576E-06	-1.827E-06
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998419			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 1.76566			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.27408E-04			

PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.800	5.456	1.245E-07	1.256E-07
1.810	5.605	1.122E-07	1.062E-07
1.820	5.779	9.086E-08	8.674E-08
1.830	5.978	6.692E-08	6.733E-08
1.840	6.254	3.936E-08	4.792E-08
1.850	6.538	2.046E-08	2.851E-08
1.860	6.807	7.712E-09	9.098E-09
1.875	7.241	-1.071E-08	-2.002E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.991935			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 1.86469			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.94117E-06			
PARA ACIDA HA3			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.900	8.030	3.101E-10	2.770E-10
1.915	8.495	1.230E-10	1.530E-10
1.930	8.909	5.293E-12	2.908E-11
1.945	9.232	-9.573E-11	-9.486E-11
1.960	9.471	-1.993E-10	-2.188E-10
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.990922			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 1.93352			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 8.26277E-09			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
1.990	9.801	2.044E-12	2.146E-12
2.000	9.875	1.582E-12	1.462E-12
2.015	9.986	4.436E-13	4.358E-13
2.030	10.075	-5.943E-13	-5.900E-13
2.045	10.153	-1.638E-12	-1.616E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998621			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 2.02137			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 6.8387E-11			

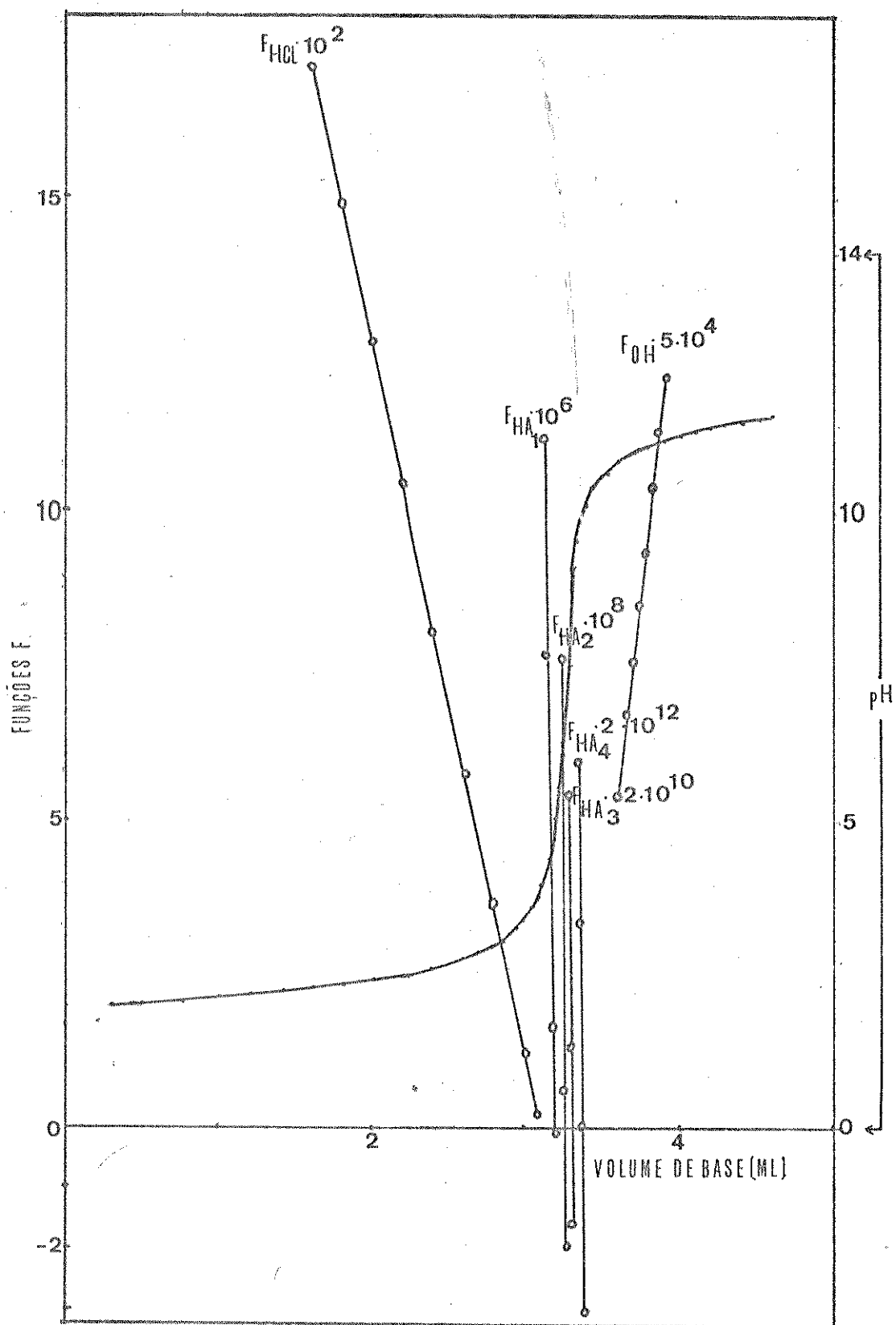


FIGURA 14 - Curva linearizada de titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,0127 g de insulina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1150 M.

$I = 1,0$ M.

TABELA 33 - Número de moles dos grupos tituláveis por mol de insulina

	Nesse trabalho		Referência (26)	Sequência de Aminoácidos
	KCl 0,10 M*	KCl 1,0 M		
Carboxílicos				
HA ₁	10,69 ± 0,74	8,94 ± 0,81	-	4 α-COOH
HA ₂	6,17 ± 0,16	6,98 ± 0,48	-	8 GLU
Total	16,86 ± 0,58		14,5	
Imidazóis				
HA ₃ ⁺	3,98 ± 0,02	4,54 ± 0,32	2	4 HIS
Aminos				
ε-amino	-	-	-	2 LYS
α-amino	-	-	4	4 α-NH ₂
HA ₄ ⁺	6,45 ± 0,19	6,65 ± 0,59	-	
Fenólicos	-	-	10	8 TYR
Total	27,28 ± 0,41	27,11 ± 1,80	32,5	30

* Resultados referentes a média aritmética de 2 titulações.

TABELA 34 - Valores de pK_a dos grupos tituláveis da insulina

	Nesse trabalho		Referência (27)	Referência (26)
	KCl 0,10 M*	KCl 1,0 M	KCl 0,1 M	KCl 0,075 M
Carboxílicos				
α -COOH	-	-	-	3,6
HA ₁	3,56 $\pm$ 0,22	3,91 $\pm$ 0,08	-	4,7
HA ₂	5,87 $\pm$ 0,12	5,77 $\pm$ 0,06	-	-
Imidazóis				
HA ₃ ⁺	7,80 $\pm$ 0,14	8,05 $\pm$ 0,04	6,6	6,4
Aminos				
α -NH ₂	-	-	7,8	7,4
HA ₄ ⁺	9,81 $\pm$ 0,20	10,14 $\pm$ 0,03	-	-
ϵ -amino	-	-	10,0	-
Fenólicos	-	-	9,9	9,6

* Resultados referentes a média aritmética de 2 titulações.

5.3 - Titulação Potenciométrica da Insulina Desnaturada

Como as propriedades hidrodinâmicas de macromoléculas em soluções são sensíveis a mudanças conformacionais, Tanford mediu a viscosidade da insulina em cloridrato de guanidina, observando que o desenrolamento dessa proteína é uma reação instantânea⁽¹²⁶⁾. Determinações de dispersão ótica rotatória podem ser correlacionadas à estrutura de macromoléculas. A elevada constante de dispersão (267 mμ) da insulina nativa diminui quando desnaturada em uréia (226 mμ). Medidas desse parâmetro foram feitas para diversas proteínas globulares tendo sido observado que há uma convergência dos valores dessas medidas para a faixa de 210 - 220 mμ quando as proteínas são desnaturadas. Isso sugere que o estado desnaturado dessas proteínas caracteriza-se por uma conformação desordenada comum a todas elas⁽¹⁸²⁾.

Shrake e Rupley desenvolveram um programa computacional para investigar o envolvimento e a exposição de proteínas a solventes, apresentando resultados para a lisozima e insulina⁽¹⁸³⁾. Esses resultados sugerem que os contatos dos cristais dessas proteínas são caracterizados por um menor envolvimento dos grupos laterais não polares enquanto que os grupos ionizáveis das cadeias laterais estão muito mais envolvidos.

Com o propósito de investigar a influência da uréia sobre os grupos ionizáveis da insulina, nesse nosso trabalho essa proteína foi também estudada nesse meio desnaturante.

5.3.1 - Resultados

As soluções de insulina após contato de duas horas com soluções de uréia foram tratadas com excesso de HCl e tituladas nas condições de força iônica 0,10 M em KCl. Na figura 15 são mostrados a curva de titulação dessa proteína nessas condições, bem como os segmentos de reta obtidos pela linearização dessa curva após segmentação em 5 regiões. As determinações dos volumes de equivalência e constantes de dissociação dos ácidos fracos foram feitas usando-se o programa PROTE MODIFICADO de acordo com o procedimento já citado. As tabelas 35, 37 e 39 mostram os dados resultantes das titulações de diferentes soluções de

TABELA 35 - Dados da titulação potenciométrica de 40,00 mL de solução con-
tendo 0,02561 g de insulina em uréia 8,0 M na presença de
HCl, com NaOH 0,1092 M. $I = 0,10$ M; $E_{Oa}^I = 147,3$ mV; $j_H =$
 $= -9.669,3$ mV/M; $j_{OH} = 370,7$ mV/M; $K_w = 9,09 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.200	192.7	3.755
0.500	189.2	3.815
0.700	186.6	3.859
0.800	185.3	3.882
1.000	182.2	3.934
1.260	177.5	4.014
1.500	172.2	4.104
1.601	169.7	4.147
1.702	166.8	4.196
1.800	163.6	4.250
1.900	159.9	4.313
2.000	155.6	4.386
2.100	150.6	4.471
2.200	144.6	4.572
2.250	140.8	4.637
2.300	136.7	4.706
2.400	126.5	4.879
2.500	111.3	5.135
2.575	93.4	5.438
2.590	89.0	5.512
2.600	85.5	5.571
2.615	80.0	5.664
2.625	75.7	5.737
2.635	71.1	5.815
2.650	63.8	5.938
2.665	55.5	6.078
2.681	46.2	6.235
2.690	40.4	6.333
2.701	33.4	6.451
2.715	23.2	6.624
2.730	12.1	6.811
2.745	0.0	7.016
2.760	-12.4	7.225
2.775	-26.6	7.465
2.790	-41.2	7.712
2.801	-52.6	7.904
2.815	-67.5	8.156
2.830	-82.5	8.409
2.845	-96.5	8.646
2.860	-107.7	8.835
2.870	-115.1	8.960
2.880	-121.3	9.065
2.890	-127.1	9.163
2.900	-132.4	9.252
2.915	-140.1	9.382
2.930	-147.3	9.504
2.945	-154.2	9.620
2.960	-160.8	9.732
2.975	-166.9	9.835
2.990	-172.9	9.936
3.000	-176.8	10.002
3.015	-182.6	10.100

Continuação da Tabela 35.

3.030	-187.9	10.189
3.045	-193.2	10.279
3.060	-198.2	10.363
3.080	-204.2	10.464
3.100	-209.9	10.561
3.120	-215.1	10.649
3.140	-219.8	10.728
3.160	-224.1	10.801
3.180	-228.1	10.868
3.200	-231.7	10.929
3.225	-235.9	11.000
3.250	-239.5	11.061
3.275	-243.9	11.118
3.300	-247.5	11.179
3.325	-251.3	11.218
3.351	-255.1	11.264
3.375	-258.9	11.305
3.400	-263.0	11.340
3.425	-268.1	11.376
3.450	-270.0	11.408
3.475	-271.9	11.440
3.502	-273.7	11.471
3.530	-276.7	11.522
3.603	-269.5	11.569
3.650	-272.0	11.611
3.700	-274.3	11.651
3.750	-276.5	11.688
3.800	-278.6	11.724

TABELA 36 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de insulina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 35.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.200	3.755		2.512E-01	2.547E-01
0.500	3.815		2.189E-01	2.219E-01
0.700	3.859		1.977E-01	2.001E-01
0.800	3.882		1.879E-01	1.892E-01
1.000	3.934		1.663E-01	1.673E-01
1.260	4.014		1.183E-01	1.390E-01
1.500	4.104		1.123E-01	1.127E-01
1.601	4.147		1.017E-01	1.017E-01
1.702	4.196		9.074E-02	9.069E-02
1.800	4.250		7.995E-02	7.998E-02
1.900	4.313		6.903E-02	6.906E-02
2.000	4.386		5.815E-02	5.814E-02
2.100	4.471		4.756E-02	4.722E-02
2.200	4.572		3.722E-02	3.630E-02
2.250	4.637		3.176E-02	3.084E-02
2.300	4.706		2.666E-02	2.538E-02
2.400	4.879		1.674E-02	1.446E-02
2.500	5.135		6.766E-03	3.544E-03
2.575	5.438		-1.201E-03	-4.646E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.53245				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999969				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.625	5.737		1.662E-07	1.639E-07
2.635	5.815		1.534E-07	1.495E-07
2.650	5.938		1.313E-07	1.280E-07
2.665	6.078		1.055E-07	1.065E-07
2.681	6.235		7.986E-08	8.350E-08
2.690	6.333		6.546E-08	7.058E-08
2.701	6.451		5.021E-08	5.479E-08
2.715	6.624		3.067E-08	3.470E-08
2.730	6.811		1.260E-08	1.317E-08
2.745	7.016		-5.374E-09	-8.361E-09
2.760	7.225		-2.348E-08	-2.989E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998055				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.73917				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.43533E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.775	7.465		1.172E-09	1.175E-09
2.790	7.712		8.936E-10	8.704E-10
2.801	7.904		6.434E-10	6.473E-10
2.815	8.156		3.370E-10	3.632E-10
2.830	8.409		5.230E-11	5.894E-11
2.845	8.646		-2.287E-10	-2.454E-10
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999427				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.83291				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 2.02874E-08				

Continuação da Tabela 36.

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.915	9.382		3.069E-11	2.979E-11
2.930	9.504		2.669E-11	2.629E-11
2.945	9.620		2.264E-11	2.279E-11
2.960	9.732		1.874E-11	1.929E-11
2.975	9.835		1.525E-11	1.579E-11
2.990	9.936		1.178E-11	1.229E-11
3.000	10.002		9.536E-12	9.956E-12
3.015	10.100		6.153E-12	6.456E-12
3.030	10.189		3.066E-12	2.956E-12
3.045	10.279		-1.697E-13	-5.440E-13
3.060	10.363		-3.365E-12	-4.044E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998884				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.04267				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 2.3333E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.180	10.868		3.657E-13	3.895E-13
3.200	10.929		2.946E-13	2.914E-13
3.225	11.000		1.788E-13	1.688E-13
3.250	11.061		7.144E-14	4.626E-14
3.275	11.118		-5.513E-14	-7.632E-14
3.300	11.179		-2.346E-13	-1.989E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.993951				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.25943				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 4.90333E-12				

TABELA 37 - Dados da titulação potenciométrica de 37,00 mL de solução contendo 0,02305 g de insulina em uréia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1092 M. $I = 0,10$ M; $E_{0a}^i = 147,1$ mV; $j_H = -12.166,9$ mV/M; $j_{OH} = 723,3$ mV/M; $K_w = 9,31 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	193.5	3.730
0.300	191.1	3.772
0.500	188.4	3.819
0.700	185.2	3.874
0.851	182.6	3.919
1.000	179.7	3.969
1.200	175.1	4.049
1.350	171.4	4.112
1.500	166.1	4.203
1.650	160.2	4.304
1.800	152.6	4.433
1.900	146.1	4.544
2.000	137.8	4.684
2.100	126.0	4.884
2.150	118.2	5.016
2.175	113.3	5.099
2.190	110.1	5.153
2.200	107.8	5.192
2.210	105.2	5.236
2.225	101.2	5.304
2.235	98.4	5.351
2.250	93.7	5.431
2.261	89.7	5.498
2.295	84.3	5.589
2.290	77.7	5.701
2.301	72.3	5.792
2.310	67.1	5.880
2.325	58.0	6.034
2.336	50.9	6.154
2.350	40.8	6.324
2.362	32.0	6.473
2.375	21.8	6.645
2.390	8.6	6.868
2.400	-0.2	7.017
2.415	-15.4	7.274
2.430	-31.6	7.547
2.445	-48.6	7.835
2.455	-60.1	8.029
2.470	-78.5	8.340
2.485	-95.2	8.622
2.500	-109.8	8.869
2.510	-118.2	9.010
2.525	-129.6	9.203
2.540	-139.5	9.370
2.555	-148.6	9.524
2.575	-159.6	9.710
2.590	-167.4	9.841
2.600	-172.7	9.931
2.610	-177.4	10.010
2.625	-183.9	10.120
2.638	-188.6	10.200

Continuação da Tabela 37.

2.650	-194.2	10.294
2.660	-197.9	10.357
2.677	-203.9	10.458
2.700	-211.0	10.578
2.720	-216.6	10.673
2.760	-226.0	10.832
2.780	-230.1	10.902
2.800	-233.9	10.966
2.825	-238.0	11.036
2.850	-241.7	11.099
2.875	-245.0	11.155
2.900	-248.1	11.208
2.925	-250.8	11.254
2.950	-253.4	11.298
2.976	-255.8	11.339
3.000	-257.9	11.375
3.025	-259.9	11.409
3.055	-262.1	11.447
3.100	-265.3	11.502
3.150	-268.3	11.553
3.200	-271.1	11.601

TABELA 38 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de insulina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 37.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.730		2.466E-01	2.386E-01
0.300	3.772		2.240E-01	2.168E-01
0.500	3.819		2.010E-01	1.949E-01
0.700	3.874		1.769E-01	1.731E-01
0.851	3.919		1.595E-01	1.566E-01
1.000	3.969		1.421E-01	1.403E-01
1.200	4.049		1.184E-01	1.185E-01
1.350	4.112		1.024E-01	1.021E-01
1.500	4.203		8.299E-02	8.573E-02
1.650	4.304		6.577E-02	6.935E-02
1.800	4.433		4.875E-02	5.297E-02
1.900	4.544		3.772E-02	4.205E-02
2.000	4.684		2.714E-02	3.113E-02
2.100	4.884		1.687E-02	2.021E-02
2.150	5.016		1.219E-02	1.475E-02
2.175	5.099		9.848E-03	1.202E-02
2.190	5.153		8.524E-03	1.038E-02
2.200	5.192		7.656E-03	9.290E-03
2.210	5.236		6.749E-03	8.198E-03
2.225	5.304		5.491E-03	6.560E-03
2.235	5.351		4.694E-03	5.468E-03
2.250	5.431		3.486E-03	3.830E-03
2.261	5.498		2.560E-03	2.629E-03
2.295	5.589		1.428E-03	-1.084E-03
2.298	5.701		1.627E-04	-5.381E-04
2.301	5.792		-8.079E-04	-1.739E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.28507				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999576				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.325	6.034		3.640E-08	3.820E-08
2.336	6.154		3.516E-08	3.407E-08
2.350	6.324		3.009E-08	2.881E-08
2.362	6.473		2.509E-08	2.431E-08
2.375	6.645		1.936E-08	1.942E-08
2.390	6.868		1.283E-08	1.379E-08
2.400	7.017		9.278E-09	1.003E-08
2.415	7.274		4.112E-09	4.399E-09
2.430	7.547		-5.198E-10	-1.235E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996992				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.42671				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 3.75605E-07				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.445	7.835		2.338E-10	2.538E-10
2.455	8.029		2.237E-10	2.049E-10
2.470	8.340		1.410E-10	1.316E-10
2.485	8.622		5.646E-11	5.831E-11
2.500	8.869		-2.130E-11	-1.498E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.990755				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.49693				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 4.88615E-09				

Continuação da Tabela 38.

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.555	9.524		1.416E-11	1.441E-11
2.575	9.710		1.139E-11	1.117E-11
2.590	9.841		8.935E-12	8.745E-12
2.600	9.931		7.063E-12	7.128E-12
2.610	10.010		5.436E-12	5.511E-12
2.625	10.120		3.112E-12	3.085E-12
2.636	10.200		1.302E-12	1.306E-12
2.650	10.294		-9.741E-13	-9.585E-13
2.660	10.357		-2.564E-12	-2.576E-12
2.677	10.458		-5.368E-12	-5.325E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99978				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.64407				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.6173E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.800	10.966		1.557E-13	1.591E-13
2.825	11.036		4.541E-14	4.099E-14
2.850	11.099		-7.569E-14	-7.715E-14
2.875	11.155		-1.977E-13	-1.953E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999713				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 2.83367				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 4.72541E-12				

TABELA 39 - Dados da titulação potenciométrica de 40,00 mL de solução con-
tendo 0,02561 g de insulina em uréia 8,0 M na presença de
HCl, com NaOH 0,1092 M; $I = 0,10$ M; $E_{Oa}^i = 149,5$ mV; $j_H =$
 $= -13.538,3$ mV/M; $j_{OH} = 444,5$ mV/M; $K_w = 9,34 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	191.7	3.803
0.300	189.2	3.847
0.500	186.4	3.896
0.750	182.4	3.965
1.000	177.6	4.048
1.201	172.9	4.129
1.400	167.3	4.225
1.500	164.0	4.281
1.600	160.1	4.348
1.700	155.5	4.426
1.800	150.2	4.516
1.900	143.5	4.630
2.000	134.9	4.776
2.050	129.5	4.868
2.100	123.0	4.978
2.150	115.0	5.113
2.160	113.1	5.145
2.170	111.2	5.177
2.180	109.1	5.213
2.190	107.0	5.248
2.200	104.7	5.287
2.210	102.3	5.328
2.220	99.5	5.375
2.230	96.8	5.421
2.242	93.3	5.480
2.251	90.5	5.527
2.260	87.4	5.580
2.270	83.7	5.642
2.280	79.7	5.710
2.290	75.2	5.786
2.302	70.0	5.874
2.310	65.7	5.946
2.320	60.2	6.039
2.332	53.4	6.154
2.343	46.3	6.274
2.350	41.9	6.348
2.360	35.3	6.460
2.370	28.4	6.576
2.380	21.1	6.700
2.390	13.5	6.828
2.400	5.8	6.958
2.410	-2.3	7.095
2.420	-10.8	7.238
2.430	-19.8	7.391
2.441	-29.9	7.561
2.450	-39.6	7.725
2.460	-50.4	7.907
2.470	-60.7	8.081
2.480	-71.3	8.261
2.490	-81.6	8.435
2.500	-91.5	8.602
2.510	-100.9	8.761
2.520	-109.6	8.908

Continuação da Tabela 39.

2.531	-117.9	9.048
2.540	-124.3	9.156
2.550	-131.2	9.272
2.560	-137.2	9.374
2.571	-143.2	9.475
2.580	-148.4	9.563
2.590	-153.7	9.652
2.600	-158.6	9.735
2.610	-163.3	9.815
2.620	-167.7	9.889
2.631	-171.5	9.970
2.640	-174.4	10.036
2.650	-180.5	10.105
2.660	-184.2	10.167
2.670	-187.9	10.230
2.680	-191.3	10.287
2.690	-194.7	10.345
2.700	-198.0	10.401
2.710	-201.1	10.453
2.720	-204.1	10.504
2.731	-207.1	10.554
2.740	-209.6	10.597
2.750	-212.1	10.639
2.760	-214.6	10.681
2.770	-216.8	10.718
2.780	-219.2	10.759
2.790	-221.2	10.793
2.800	-223.2	10.826
2.820	-227.0	10.891
2.840	-230.6	10.952
2.860	-233.8	11.006
2.880	-236.8	11.056
2.900	-239.4	11.100
2.920	-242.0	11.145
2.940	-244.4	11.185
2.960	-246.6	11.222
2.980	-248.7	11.258
3.000	-250.7	11.292
3.020	-252.5	11.323
3.040	-254.3	11.353
3.080	-257.5	11.407
3.100	-259.0	11.433

TABELA 40 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de insulina em uréia, com NaOH. Valores relacionados com dados da Tabela 39.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.803		2.249E-01	2.288E-01
0.300	3.847		2.034E-01	2.069E-01
0.500	3.896		1.818E-01	1.851E-01
0.750	3.965		1.550E-01	1.578E-01
1.000	4.048		1.280E-01	1.305E-01
1.201	4.129		1.061E-01	1.085E-01
1.400	4.225		8.488E-02	8.681E-02
1.500	4.281		7.441E-02	7.589E-02
1.600	4.348		6.365E-02	6.497E-02
1.700	4.426		5.289E-02	5.405E-02
1.800	4.516		4.264E-02	4.313E-02
1.900	4.630		3.229E-02	3.221E-02
2.000	4.776		2.223E-02	2.129E-02
2.050	4.868		1.729E-02	1.583E-02
2.100	4.978		1.240E-02	1.037E-02
2.150	5.113		7.527E-03	4.910E-03
2.160	5.145		6.514E-03	3.818E-03
2.170	5.177		5.547E-03	2.726E-03
2.180	5.213		4.525E-03	1.634E-03
2.190	5.248		3.548E-03	5.420E-04
2.200	5.287		2.523E-03	-5.500E-04
2.210	5.328		1.500E-03	-1.642E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.19496				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999909				
PARA ACIDO-HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.302	5.874		1.379E-07	1.342E-07
2.310	5.946		1.244E-07	1.223E-07
2.320	6.039		1.078E-07	1.073E-07
2.332	6.154		8.846E-08	8.946E-08
2.343	6.274		6.956E-08	7.306E-08
2.350	6.348		5.912E-08	6.262E-08
2.360	6.460		4.471E-08	4.771E-08
2.370	6.576		3.107E-08	3.280E-08
2.380	6.700		1.785E-08	1.790E-08
2.390	6.828		5.008E-09	2.986E-09
2.400	6.958		-7.486E-09	-1.192E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998312				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.392				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.49091E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.430	7.391		1.502E-09	1.509E-09
2.441	7.561		1.271E-09	1.226E-09
2.450	7.725		9.894E-10	9.945E-10
2.460	7.907		7.002E-10	7.374E-10
2.470	8.081		4.558E-10	4.803E-10
2.480	8.261		2.199E-10	2.232E-10
2.490	8.435		-2.948E-12	-3.395E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998606				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.48868				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 2.57109E-08				

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.540	9.156		3.184E-11	3.113E-11
2.550	9.272		2.839E-11	2.825E-11
2.560	9.374		2.541E-11	2.537E-11
2.571	9.475		2.232E-11	2.220E-11
2.580	9.563		1.920E-11	1.961E-11
2.590	9.652		1.612E-11	1.674E-11
2.600	9.735		1.331E-11	1.386E-11
2.610	9.815		1.058E-11	1.098E-11
2.620	9.889		8.021E-12	8.100E-12
2.631	9.970		5.113E-12	4.933E-12
2.640	10.036		2.658E-12	2.343E-12
2.650	10.105		1.056E-14	-5.358E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99917				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.64814				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 2.87856E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.780	10.759		7.127E-13	7.368E-13
2.790	10.793		6.611E-13	6.597E-13
2.800	10.826		5.949E-13	5.826E-13
2.820	10.891		4.469E-13	4.285E-13
2.840	10.952		2.787E-13	2.743E-13
2.860	11.006		1.204E-13	1.201E-13
2.880	11.058		-4.518E-14	-3.407E-14
2.900	11.100		-1.897E-13	-1.883E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999233				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 2.87558				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 7.70894E-12				

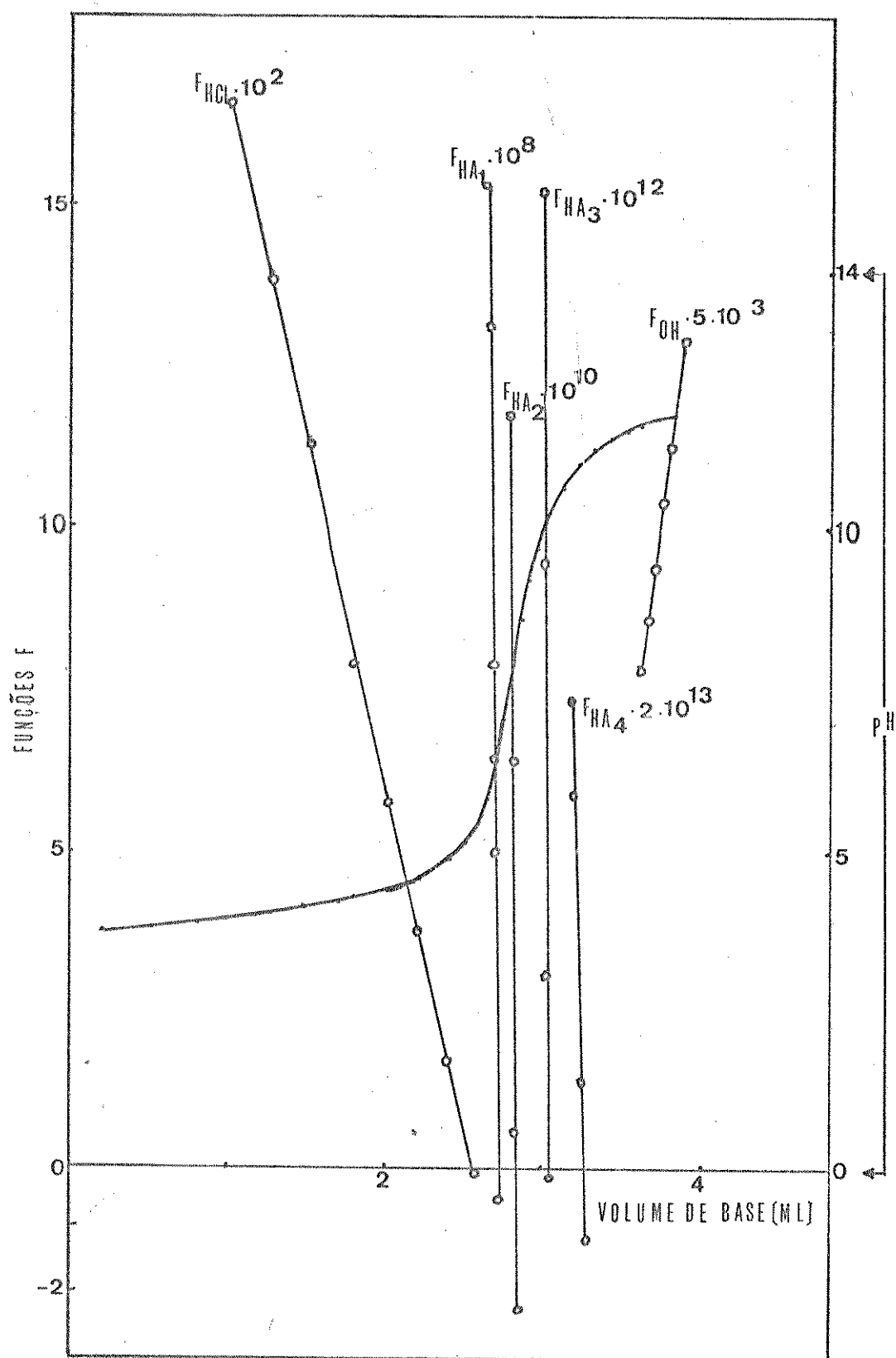


FIGURA 15 - Curva linearizada de titulação de 40,00 mL de solução contendo 0,02561 g de insulina em uréia 8,0 M e na presença de HCl, com NaOH 0,1092 M. $I = 0,10$ M.

insulina nas condições acima mencionadas. Os resultados obtidos pela linearização dessas curvas são apresentados nas tabelas 36, 38 e 40. A estequiometria e os valores de pK_a dos grupos ionizáveis são dados na tabela 41. Salientamos que na determinação do número de grupos tituláveis foram feitas as devidas correções de volumes de titulante gastos na titulação das impurezas presentes no solvente.

TABELA 41 - Valores obtidos para a estequiometria e pK_a dos grupos tituláveis da insulina em uréia 8,0 M. $I = 0,10M$

	Número de moles dos grupos titulados por mol de insulina	Valores de pK_a
Carboxílicos		
HA ₁	$9,15 \pm 1,27$	$6,03 \pm 0,34$
HA ₂	$3,38 \pm 0,54$	$7,86 \pm 0,39$
Imidazóis		
HA ₃ ⁺	$5,07 \pm 0,77$	$9,65 \pm 0,13$
Aminos		
HA ₄ ⁺	$10,68 \pm 0,43$	$11,25 \pm 0,13$

5.4 - Discussão

Para fins comparativos, os resultados da estequiometria e valores de pK_a obtidos para a insulina nas 3 condições estudadas são apresentados respectivamente nas tabelas 42 e 43, juntamente com os valores encontrados em outros trabalhos.

TABELA 42 - Número de moles dos grupos tituláveis por mol de insulina

	Nesse trabalho			Referência (26)	Sequência de Aminoácidos
	KCl 0,10 M	KCl 1,0 M	Uréia 8,0 M		
Carboxílicos					
HA ₁	10,69 ± 0,74	8,94 ± 0,81	9,15 ± 1,27	-	-
HA ₂	6,17 ± 0,16	6,98 ± 0,48	3,38 ± 0,54	-	-
Total	16,86 ± 0,58	15,92 ± 1,23	12,54 ± 1,79	14,5	12 4 α-COOH 8 GLU
Imidazóis					
HA ₃ ⁺	3,98 ± 0,02	4,54 ± 0,32	5,07 ± 0,77	2	4 HIS
Aminos					
HA ₄ ⁺	6,45 ± 0,19	6,65 ± 0,59	10,68 ± 0,43	4 α-NH ₂	6 4 α-NH ₂ 2 LIS
Fenólicos	-	-	-	10	8 TYR
Z _n (H ₂ O) ²⁺	-	-	-	2	-
Total	27,28 ± 0,41	27,11 ± 1,80	28,28 ± 2,58	32,5	30

TABELA 43 - Valores de pK_a dos grupos tituláveis da Insulina.

	Nesse Trabalho			Referência (27) KCl 0,1 M	Referência (26) KCl 0,075 M
	KCl 0,10 M	KCl 1,0 M	Uréia 8,0 M		
Carboxílicos					
HA ₁	3,56 ± 0,22	3,91 ± 0,08	6,03 ± 0,34	-	3,6 α-COOH
HA ₂	5,87 ± 0,12	5,77 ± 0,06	7,86 ± 0,39	-	4,7 GLU
Imidazóis					
HA ₃ ⁺	7,80 ± 0,19	8,05 ± 0,04	9,65 ± 0,13	6,6	6,4 HIS
Aminos					
HA ₄ ⁺	9,81 ± 0,20	10,14 ± 0,03	11,25 ± 0,13	7,8	7,4 α-AMINO
Fenólicos	-	-	-	9,9	9,6 ε-AMINO + FENÓLICO

Examinando-se a tabela 42 pode ser observado que a interpretação dos resultados não é tão simples. Por esse motivo, procuramos associar nossos resultados àqueles obtidos por outros autores^(7,25-29).

Tanford e Epstein estudando as curvas de titulação da insulina livre e contendo zinco, observaram que nesse último caso dois novos grupos são titulados para cada átomo de zinco presente na molécula. Um desses grupos é titulado próximo a pH 8 e o outro a pH 12. Uma outra observação feita por esses autores, é que na presença de zinco, dois grupos imidazóis são titulados na região de carboxílicos^(25,26).

Estudos termodinâmicos da ionização dos grupos ϵ -amino da insulina indicam que eles interagem com outros grupos na proteína. A interação com grupos fenólicos é de tal modo que podem ser titulados conjuntamente. Interação também com grupos de menores valores de pK_a , provavelmente α -aminos^(28,29).

Além das observações acima referidas, para uma melhor interpretação dos resultados é importante considerar-se as diferenças de solubilidade da proteína nas 3 condições estudadas: em força iônica 0,10 M as soluções mostraram-se menos solúveis entre pH 4 e 7 e em força iônica 1,0 M a fraca solubilidade foi observada antes do início da titulação, ao adicionar-se KCl, até pH aproximadamente 6. Nas soluções contendo uréia não houve turvação da solução. Fredericq admite que ligações especiais entre grupos imidazóis e fenólicos devem contribuir para a fraca solubilidade aumentando a cristalização e conseqüentemente diminuindo a solubilidade. Os grupos dissociáveis são alterados pela presença dessas ligações⁽²⁷⁾.

Analisando os dados das tabelas 42 e 43 chegamos as seguintes conclusões:

1. O número total de grupos carboxílicos titulados é maior para a proteína nativa que desnaturada. Em soluções de uréia onde os valores são concordantes com a seqüência de aminoácidos, todos os grupos α -carboxílicos e resíduos de glutâmico devem provavelmente ter sido titulados. Nas condições de força iônica 0,10 M e 1,0 M, na região de pH onde são titulados carboxílicos e imidazóis, a insulina apresenta fraca solubilidade, podendo haver alterações dos grupos ionizáveis. Os resultados sugerem que outros grupos devem também ter sido titulados junta

mente com carboxílicos. Esses grupos devem ser imidazóis, dois dos quais de acordo com Tanford e Epstein^(25,26) são titulados nessa região para a insulina contendo zinco que foi a proteína utilizada. Comparando-se os valores de pK_a encontrados para HA_2 na proteína nativa, àqueles da literatura^(25,27), observamos que os valores obtidos nesse trabalho são mais elevados, reforçando talvez a hipótese de que grupos imidazóis com pK_a anormais tenham sido titulados numa região de menor pH.

2. Na região de titulação dos grupos imidazóis, os resultados indicam que em uréia todos esses grupos foram titulados juntamente com um grupo $Zn(H_2O)^{2+}$. Na proteína nativa é provável que grupos α -aminos tenham sido titulados nessa região de pH o que pode ser confirmado pelo alto valor de pK_a mais característico desses grupos que de imidazóis.

3. Tanto para a proteína nativa quanto desnaturada é possível que alguns grupos fenólicos tenham sido titulados anormalmente na região de titulação de grupos aminos, o que é concordante com as observações feitas por Gruen et alii^(28,29). Os elevados valores de pK_a encontrados para HA_4^+ na proteína nativa são condizentes com essa conclusão.

4. Como a insulina é uma proteína de estrutura relativamente simples com cadeias polipeptídicas praticamente "abertas", a diferença do número total de grupos titulados para a proteína analisada na ausência e na presença de uréia é muito pequena, indicando que a proteína no estado nativo possui praticamente todos os grupos acessíveis ao solvente.

5. Fazendo-se uma comparação entre os resultados obtidos em força iônica 0,10 M e 1,0 M, observamos que exceto para HA_2 , os valores de pK_a diferem de aproximadamente 0,3 unidades sendo logicamente maiores para as condições de força iônica, 1,0 M.

6. Como é de se esperar, os valores de pK_a dos grupos tituláveis em uréia são muito maiores que nas soluções não contendo essa base.

Quanto aos íons Zn^{2+} uma conclusão só poderia ser feita após titulações de soluções de insulina livres desses íons, o que não foi possível por falta do produto comercial em nosso laboratório. Através de diálise poderíamos separar os íons metálicos e obter-se a proteína livre. No entanto, por motivos de or-

dem prática fomos impossibilitados de fazer esse estudo que provavelmente nos levaria a concluir se os íons de zinco estão ligados a grupos imidazóis como sugerem Tanford e Epstein⁽²⁶⁾ ou a grupos aminos como supõe Marcker⁽¹⁷¹⁾. Acreditamos que através do método de linearização essas conclusões possam ser feitas e portanto sugerimos futuros trabalhos com essa proteína, a fim de investigar-se a natureza das ligações de seus resíduos de aminoácidos com esses íons metálicos.

6. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA MIOGLOBINA

6.1 - Considerações Gerais

A mioglobina é uma proteína globular encontrada nos músculos de mamíferos vertebrados e invertebrados. Combina-se reversivelmente com oxigênio tendo com função armazená-lo temporariamente nas células, papel particularmente importante para os mamíferos mergulhadores cujo conteúdo muscular dessa proteína é muito elevado. Nas aves, os músculos das asas são ricos em mioglobina enquanto que no corpo humano essa proteína é apenas abundante no músculo cardíaco⁽¹⁸⁴⁾.

Sua molécula é constituída por uma porção peptídica, a globina, e por uma porção não peptídica que consiste de um complexo Fe^{2+} -protoporfirina, conhecido como grupo heme, que é o grupo que realmente se combina com oxigênio. Nesse quelato o átomo de ferro ocupa posição central e possui quatro ligações no plano do anel de porfirina dirigidas a átomos de nitrogênio pirrólicos. Possui ainda duas ligações perpendiculares a esse plano sendo uma delas dirigidas a átomos de nitrogênio de resíduos de histidina⁽¹⁸⁵⁾. A sexta posição está disponível para a combinação rápida com oxigênio⁽¹⁸⁴⁾.

Há interações altamente hidrofóbicas entre a globina e o grupo heme resultantes da localização de cadeias de aminoácidos aromáticos ao redor desse grupo. Essas interações parecem desempenhar importante função na ligação reversível entre oxigênio e o grupo heme⁽¹⁸⁵⁾.

A função da estrutura da mioglobina é acomodar a molécula de oxigênio no sítio heme e permitir sua saída sem interferir no processo de oxidação-redução. Os processos reativos que podem ocorrer são:



Apesar da hemoglobina e mioglobina apresentarem algumas semelhanças tais como absorção de luz na região visível e presença de ferro em suas moléculas, algumas diferenças ocorrem entre essas proteínas. Estudos de Coryell e Pauling sugerem que

hã dois grupos ionizáveis ligados ao grupo heme da hemoglobina sendo um desses grupos um resíduo de histidina⁽¹⁸⁷⁾. Theorell e Ehrenberg propuseram que a mioglobina também possui dois grupos ionizáveis ligados a esse grupo. Porém como o efeito Bohr apresentado por essa proteína é muito menor que aquele apresentado pela hemoglobina, esses autores sugerem que o átomo de ferro está ligado a um grupo muito mais negativo que a histidina⁽³⁰⁾. Evidências experimentais de estudos de equilíbrio e cinética sugerem a presença de apenas um grupo ionizável ligado ao grupo heme da mioglobina⁽¹⁸⁸⁾.

A mioglobina é uma proteína globular pequena com uma massa molecular de aproximadamente 7.000 e constituída de 153 resíduos de aminoácidos todos arranjados em uma única cadeia polipeptídica. Para a mioglobina de cachalote, que é um grande cetáceo, a massa molecular foi determinada como sendo 17.816⁽¹⁸⁹⁾. A completa sequência de aminoácidos dessa proteína já foi bem estabelecida^(189,190). Não possui pontes dissulfeto e caracteriza-se por um elevado conteúdo helicoidal que compreende cerca de 75-80% da molécula⁽¹⁹⁰⁾ e cerca de 20% desse conteúdo helicoidal é perdido por remoção do grupo heme prostético⁽¹⁹¹⁾.

As mioglobinas de diferentes espécies têm composições de aminoácidos muito semelhantes, diferindo apenas em certos detalhes. A composição da mioglobina de focas foi determinada por Rumen⁽¹⁹²⁾, e Hapner e colaboradores, compararam os resultados obtidos pela caracterização da composição de aminoácidos desta mioglobina e da mioglobina de marsopa com a composição encontrada para a mioglobina de cachalote. Essas composições de aminoácidos indicam semelhanças muito grandes entre os três tipos de mioglobina, havendo apenas algumas diferenças no tipo ou posição de alguns aminoácidos na estrutura primária⁽¹⁹³⁾.

O modelo tridimensional da molécula de mioglobina de cachalote foi obtida por Kendrew e colaboradores através da análise de raios X que permitiu a elucidação da estrutura terciária dessa molécula⁽¹⁹⁴⁾. Esse foi o primeiro estudo bem sucedido de conformação de proteínas. Atassi e Shinghal através de estudos conformacionais obtidos pela clivagem da mioglobina, mostraram que os peptídeos apresentam no estado livre uma forma helicoidal menor que aquela apresentada pela proteína nativa. Do mesmo modo, dois fragmentos separados de hélice apresentam

menor caráter helicoidal⁽¹⁹⁵⁾. As regiões não helicoidais são estabilizadas por várias interações como pontes de hidrogênio com os grupos OH da treonina e ligações hidrofóbicas entre dois anéis aromáticos paralelos⁽¹⁸⁴⁾. Em seu estudo inicial, Kendrew e colaboradores apresentaram dúvidas quanto a identificação das cadeias laterais⁽¹⁹⁴⁾. Num estudo posterior, determinaram algumas características da estrutura, incluindo as cadeias laterais. A molécula contém oito regiões não helicoidais complexas e há tendência dos grupos polares de cadeias laterais projetarem-se para o exterior, enquanto que os grupos não polares são mantidos no interior; cerca de 30% dos grupos polares e 45% dos não polares localizam-se no interior da molécula. Essa tendência é mais acentuada para certas cadeias laterais, sobretudo as maiores. Todos os resíduos de fenilalanina e metionina são internos e a maioria dos resíduos de lisina, arginina e ácido glutâmico são externos. A maioria das alaninas não polares projetam-se para o exterior da molécula⁽¹⁹⁶⁾.

A partir de medidas de dispersão ótica rotatória, foi estabelecido que a mioglobina de cachalotes no estado cristallino é estruturalmente semelhante à proteína em solução⁽¹⁹⁷⁾. Estudos detalhados sobre a reatividade de seus grupos ácidos e básicos em solução aquosa e em solução de agentes desnaturantes têm sido discutidos na literatura^(8,30-34,127,137,188,198 e 199).

6.2 - Titulação Potenciométrica da Mioglobina Nativa

A mioglobina de cachalote possui 43 grupos ionizáveis, tendo três regiões tipicamente básicas, duas ácidas e um sítio contendo tanto grupos ácidos quanto básicos⁽²⁰⁰⁾. Sua curva de titulação foi analisada por Breslow e Gurd tanto para a proteína nativa quanto desnaturada e algumas diferenças foram encontradas sobretudo quanto ao número de grupos imidazóis titulados. Foi observado que o fator de interação eletrostática, W , para a proteína desnaturada é muito menor que para a nativa, indicando que com a desnaturação há um desenrolamento⁽³¹⁾.

Um grupo que tem sido estudado detalhadamente é o heme ácido característico da ferrimioglobina^(30,31,33,188,198 e 199), onde o átomo de ferro no estado de oxidação (III) tem uma carga

formal +1 e está ligado a 4 átomos de nitrogênio do anel de porfirina e a um nitrogênio da histidina. A sexta posição de coordenação é ocupada por uma molécula de água. A ionização desse grupo que ocorre aproximadamente a pH 9 pode ser representada simplesmente por $\text{Fe}^+\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{FeOH} + \text{H}^+$ (199). Só é possível medir se essa constante de ionização dentro da faixa de pH 7,8 - 9,2, pois fora desses limites ocorrem outros tipos de ionização na molécula (198). A termodinâmica dessa ionização é influenciada por fatores como a carga do metal, envoltórios eletrostáticos da molécula e o modo pelo qual a molécula de água está envolvida na ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio da histidina (199).

Além dos grupos imidazóis e do grupo heme ácido outros grupos tituláveis investigados foram os grupos fenólicos da tirosina. Os resultados obtidos por Hermans indicam que abaixo de pH 13 apenas dois desses grupos são titulados (8).

6.2.1 - Resultados

Nesse trabalho foram feitas titulações de soluções de mioglobina tipo II, extraída de cachalote e contendo ferro primariamente no estado férrico. As soluções dessa proteína foram tituladas em condições de força iônica 0,10 M em KCl e durante as titulações foi observada uma turvação na faixa de pH 6,5 a 11. Breslow e Gurd acreditam que acima de pH 6 deve ocorrer alguma alteração na curva de titulação como consequência da formação desse precipitado (31).

A figura 16 mostra a curva de titulação convencional dessa proteína referente ao gráfico de pH em função do volume de NaOH adicionado. Nessa mesma figura podem ser também observadas as retas obtidas pela segmentação e linearização da curva de titulação. Os segmentos de reta mostrados nessa figura correspondem às funções de Gran modificadas para cada grupo ácido em função do volume de titulante. Através do programa PROTE foram determinados os volumes de equivalência e constantes de dissociação dos ácidos fracos. Nas tabelas 44, 46 e 48 são mostrados os dados resultantes das titulações de diferentes soluções de mioglobina em KCl 0,10 M. Os resultados obtidos pela linearização

das curvas de titulação dessas soluções são mostrados nas tabelas 45, 47 e 49. Na tabela 50 são apresentados os resultados obtidos para a estequiometria e os valores de pK_a dos grupos tituláveis. Esses resultados correspondem a média aritmética das titulações realizadas. Salientamos que na determinação do número de grupos tituláveis, consideramos a massa molecular dessa proteína como sendo 17.000.

Para efeito de comparação, na tabela 50 são mostrados também os resultados encontrados por Breslow e Gurd⁽³¹⁾, bem como o número de grupos dados pela sequência de aminoácidos dessa proteína⁽¹⁷⁹⁾.

TABELA 44 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,05623 g de mioglobina na presença de HCl, com NaOH 0,1369 M; I = 0,10 M; $E'_{0a} = 256,2$ mV; $j_H = 0,0$ mV/M; $j_{OH} = 376,4$ mV/M; $K_w = 1,81 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	PH
0.200	311.4	2.067
0.400	308.4	2.118
0.600	305.1	2.173
0.800	301.4	2.236
1.000	297.1	2.309
1.101	294.6	2.351
1.200	292.0	2.395
1.300	289.1	2.444
1.400	285.8	2.500
1.500	282.3	2.559
1.600	278.1	2.630
1.700	273.3	2.711
1.800	267.7	2.806
1.900	260.9	2.921
2.000	252.6	3.061
2.100	242.1	3.238
2.150	235.8	3.345
2.200	228.7	3.465
2.230	223.9	3.546
2.260	218.9	3.631
2.300	211.5	3.756
2.330	205.3	3.860
2.360	199.0	3.967
2.400	190.2	4.116
2.420	185.7	4.192
2.440	180.6	4.278
2.460	175.3	4.367
2.480	169.6	4.464
2.500	163.3	4.570
2.520	156.9	4.679
2.540	149.9	4.797
2.560	142.4	4.924
2.580	133.7	5.071
2.590	129.2	5.147
2.601	124.3	5.230
2.610	119.7	5.307
2.620	114.7	5.392
2.630	109.8	5.475
2.641	104.2	5.569
2.650	99.5	5.649
2.660	94.3	5.737
2.670	89.3	5.821
2.680	84.0	5.911
2.690	78.8	5.999
2.700	73.5	6.088
2.710	67.9	6.183
2.720	62.5	6.274
2.730	56.7	6.372
2.740	51.0	6.469
2.750	45.1	6.568
2.760	38.7	6.676

Continuação da Tabela 44.

2.790	17.3	7.038
2.800	8.8	7.182
2.810	-0.6	7.341
2.820	-10.1	7.501
2.830	-21.9	7.701
2.840	-34.8	7.919
2.850	-49.2	8.162
2.860	-63.9	8.411
2.870	-78.1	8.651
2.880	-90.7	8.864
2.890	-100.5	9.030
2.910	-117.0	9.309
2.920	-122.8	9.407
2.930	-128.6	9.505
2.940	-133.6	9.589
2.950	-138.4	9.671
2.960	-142.5	9.740
2.972	-147.2	9.820
2.980	-149.8	9.864
2.990	-152.8	9.914
3.000	-155.8	9.965
3.010	-158.5	10.011
3.020	-161.1	10.055
3.030	-163.6	10.097
3.040	-165.9	10.136
3.050	-168.1	10.174
3.060	-170.1	10.208
3.070	-172.1	10.242
3.081	-174.0	10.274
3.090	-175.6	10.301
3.100	-177.3	10.330
3.110	-179.0	10.359
3.120	-180.4	10.383
3.130	-181.9	10.408
3.140	-183.3	10.432
3.150	-184.7	10.456
3.160	-186.0	10.478
3.170	-187.3	10.500
3.185	-189.1	10.531
3.200	-190.8	10.560
3.230	-194.1	10.616
3.260	-196.9	10.664
3.301	-200.5	10.726
3.330	-202.8	10.765
3.350	-204.3	10.791
3.370	-205.8	10.817
3.400	-207.8	10.851
3.430	-209.8	10.886
3.450	-211.0	10.907
3.480	-212.8	10.938
3.500	-213.9	10.957
3.600	-218.9	11.044
3.700	-223.2	11.119
3.800	-226.9	11.184
3.900	-230.1	11.240
4.000	-232.9	11.290

TABELA 45 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de mioglobina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 44.

FUNÇÕES DE GRAM MODIFICADAS			
PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.200	2.067	2.576E-01	2.608E-01
0.400	2.118	2.304E-01	2.334E-01
0.600	2.173	2.036E-01	2.060E-01
0.800	2.236	1.770E-01	1.787E-01
1.000	2.309	1.501E-01	1.513E-01
1.101	2.351	1.342E-01	1.375E-01
1.200	2.395	1.210E-01	1.239E-01
1.300	2.444	1.077E-01	1.102E-01
1.400	2.500	9.704E-02	9.653E-02
1.500	2.559	8.720E-02	8.284E-02
1.600	2.630	6.769E-02	6.915E-02
1.700	2.711	5.642E-02	5.546E-02
1.800	2.806	4.336E-02	4.177E-02
1.900	2.931	3.022E-02	2.808E-02
2.000	3.061	1.719E-02	1.439E-02
2.100	3.238	3.829E-03	6.970E-04
2.150	3.345	-3.100E-03	-6.148E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.10509			
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999988			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.300	3.756	4.817E-05	4.544E-05
2.330	3.860	4.045E-05	3.998E-05
2.360	3.967	3.376E-05	3.452E-05
2.400	4.116	2.585E-05	2.724E-05
2.420	4.192	2.238E-05	2.360E-05
2.440	4.278	1.871E-05	1.996E-05
2.460	4.367	1.532E-05	1.632E-05
2.480	4.464	1.204E-05	1.268E-05
2.500	4.570	8.779E-06	9.038E-06
2.520	4.678	5.830E-06	5.398E-06
2.540	4.797	2.863E-06	1.759E-06
2.560	4.924	-1.216E-07	-1.881E-06
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.996227			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.54966			
CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO P/HA1= 1.81989E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.630	5.475	2.637E-07	2.571E-07
2.641	5.569	2.385E-07	2.335E-07
2.650	5.649	2.158E-07	2.142E-07
2.660	5.737	1.910E-07	1.928E-07
2.670	5.821	1.685E-07	1.714E-07
2.680	5.911	1.447E-07	1.499E-07
2.690	5.999	1.231E-07	1.265E-07
2.700	6.088	1.022E-07	1.071E-07
2.710	6.183	8.120E-08	8.568E-08
2.720	6.274	6.259E-08	6.426E-08
2.730	6.372	4.348E-08	4.283E-08
2.740	6.469	2.580E-08	2.141E-08
2.750	6.568	8.127E-09	-1.319E-11
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.998358			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.74979			
CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO PARA HA2= 2.14231E-06			

Continuação da Tabela 45.

PARA ACIDO HA3			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.800	7.182	3.240E-09	3.206E-09
2.810	7.341	2.677E-09	2.657E-09
2.820	7.501	2.130E-09	2.107E-09
2.830	7.701	1.487E-09	1.557E-09
2.840	7.919	9.279E-10	1.008E-09
2.850	8.162	4.354E-10	4.583E-10
2.860	8.411	5.098E-12	-9.133E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998632			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.85834			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 5.4958E-08			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.940	9.589	1.460E-11	1.364E-11
2.960	9.740	1.122E-11	1.122E-11
2.972	9.820	9.351E-12	9.762E-12
2.980	9.864	8.409E-12	8.791E-12
2.990	9.914	7.302E-12	7.578E-12
3.000	9.965	6.069E-12	6.364E-12
3.010	10.011	4.961E-12	5.151E-12
3.020	10.055	3.828E-12	3.938E-12
3.030	10.097	2.677E-12	2.724E-12
3.040	10.136	1.601E-12	1.511E-12
3.050	10.174	5.192E-13	2.973E-13
3.060	10.208	-4.775E-13	-9.161E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996275			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.05245			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.21342E-10			

TABELA 46 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução con-
tendo 0,05623 g de mioglobina na presença de HCl, com NaOH
0,1369 M; I = 0,10 M; $E_{O_a}^{\circ} = 258,4 \text{ mV}$; $j_H = 0,0 \text{ mV/M}$; $j_{OH} =$
 $= 376,4 \text{ mV/M}$; $K_W = 1,81 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	PH
0.200	313.9	2.062
0.400	311.0	2.111
0.600	307.8	2.165
0.800	304.2	2.226
1.000	300.0	2.297
1.200	295.2	2.378
1.400	289.3	2.478
1.600	282.0	2.601
1.800	272.3	2.765
1.900	266.1	2.870
2.000	258.6	2.997
2.050	254.1	3.073
2.100	249.2	3.156
2.150	243.5	3.252
2.175	240.4	3.304
2.200	237.2	3.358
2.225	233.7	3.418
2.240	231.5	3.455
2.260	228.4	3.507
2.280	225.2	3.561
2.300	221.7	3.620
2.310	220.1	3.647
2.320	218.3	3.678
2.330	216.5	3.708
2.340	214.5	3.742
2.360	210.7	3.806
2.380	206.6	3.876
2.400	202.3	3.948
2.420	197.9	4.023
2.440	193.3	4.100
2.460	188.3	4.185
2.480	183.1	4.273
2.500	177.5	4.367
2.520	171.6	4.467
2.540	165.2	4.575
2.560	158.9	4.682
2.570	155.6	4.738
2.580	152.1	4.797
2.590	148.4	4.859
2.600	144.7	4.922
2.610	140.6	4.991
2.620	136.3	5.064
2.630	131.9	5.138
2.640	127.3	5.216
2.650	122.5	5.297
2.660	117.8	5.377
2.680	108.0	5.542
2.700	98.3	5.706
2.720	88.5	5.872
2.740	78.8	6.036
2.760	68.9	6.203

Continuação da Tabela 46.

2.770	63.7	6.291
2.780	58.4	6.381
2.790	53.0	6.472
2.800	47.4	6.567
2.810	41.4	6.668
2.821	34.5	6.785
2.830	28.2	6.891
2.840	21.0	7.013
2.860	4.9	7.285
2.870	-4.6	7.446
2.880	-14.7	7.616
2.900	-39.5	8.036
2.920	-66.1	8.485
2.940	-89.8	8.886
2.960	-106.7	9.172
2.980	-120.0	9.397
2.990	-125.6	9.491
3.000	-130.6	9.576
3.010	-135.0	9.650
3.020	-138.9	9.716
3.030	-142.8	9.782
3.040	-146.2	9.840
3.050	-149.4	9.894
3.060	-152.4	9.945
3.070	-155.1	9.991
3.080	-157.7	10.035
3.100	-162.3	10.113
3.121	-166.6	10.186
3.140	-170.2	10.247
3.160	-173.6	10.305
3.180	-176.7	10.357
3.200	-179.5	10.405
3.220	-182.1	10.449
3.240	-184.7	10.493
3.260	-186.9	10.531
3.280	-189.1	10.569
3.300	-191.1	10.603
3.320	-193.1	10.637
3.340	-194.9	10.668
3.360	-196.6	10.697
3.380	-198.3	10.726
3.400	-199.9	10.753
3.415	-201.0	10.772
3.430	-202.1	10.791
3.445	-203.1	10.808
3.460	-204.1	10.826
3.480	-205.5	10.850
3.500	-206.7	10.870
3.520	-208.0	10.893
3.540	-209.1	10.912
3.560	-210.3	10.932
3.580	-211.4	10.951
3.600	-212.4	10.969
3.620	-213.4	10.986
3.640	-214.4	11.004
3.660	-215.3	11.019
3.680	-216.2	11.035
3.700	-217.1	11.050
3.750	-219.2	11.087
3.800	-221.2	11.122
3.900	-224.7	11.184
4.000	-227.9	11.240

TABELA 47 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de mioglobina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 46.

FUNÇÕES DE GRAN MODIFICADAS			
PARA HCL			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.200	2.062	2.606E-01	2.661E-01
0.400	2.111	2.340E-01	2.388E-01
0.600	2.165	2.076E-01	2.114E-01
0.800	2.226	1.812E-01	1.840E-01
1.000	2.297	1.542E-01	1.566E-01
1.200	2.378	1.280E-01	1.292E-01
1.400	2.478	1.012E-01	1.019E-01
1.600	2.601	7.479E-02	7.448E-02
1.800	2.765	4.842E-02	4.710E-02
1.900	2.870	3.536E-02	3.341E-02
2.000	2.997	2.238E-02	1.972E-02
2.050	3.073	1.570E-02	1.287E-02
2.100	3.156	9.144E-03	6.026E-03
2.150	3.252	2.249E-03	-8.186E-04
2.175	3.304	-1.242E-03	-4.241E-03
2.200	3.358	-4.688E-03	-7.664E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.14402			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999997			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.330	3.708	5.361E-05	5.006E-05
2.360	3.806	4.575E-05	4.426E-05
2.400	3.948	3.591E-05	3.653E-05
2.420	4.023	3.147E-05	3.267E-05
2.440	4.100	2.725E-05	2.881E-05
2.460	4.185	2.308E-05	2.494E-05
2.480	4.273	1.923E-05	2.108E-05
2.500	4.367	1.552E-05	1.721E-05
2.520	4.467	1.208E-05	1.335E-05
2.540	4.575	8.750E-06	9.485E-06
2.560	4.682	5.839E-06	5.621E-06
2.570	4.738	4.406E-06	3.689E-06
2.580	4.797	2.933E-06	1.757E-06
2.590	4.859	1.416E-06	-1.750E-07
2.600	4.922	-6.782E-08	-2.107E-06
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.994933			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.58909			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.93202E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.680	5.542	2.588E-07	2.441E-07
2.700	5.706	2.138E-07	2.093E-07
2.720	5.872	1.695E-07	1.745E-07
2.740	6.036	1.304E-07	1.396E-07
2.760	6.203	9.560E-08	1.048E-07
2.770	6.291	7.922E-08	8.735E-08
2.780	6.381	6.386E-08	6.993E-08
2.790	6.472	4.944E-08	5.251E-08
2.800	6.567	3.551E-08	3.509E-08
2.810	6.668	2.144E-08	1.767E-08
2.821	6.785	6.127E-09	-1.497E-09
2.830	6.891	-7.459E-09	-1.718E-08
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99547			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.82014			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.74215E-06			

PARA ACIDO HA3			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.870	7.446	1.742E-09	1.682E-09
2.880	7.616	1.393E-09	1.370E-09
2.900	8.036	6.304E-10	7.471E-10
2.920	8.485	7.671E-11	1.238E-10
2.940	8.886	-4.191E-10	-4.995E-10
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.995872			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.92397			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 3.11633E-08			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.010	9.650	1.320E-11	1.249E-11
3.020	9.716	1.213E-11	1.162E-11
3.030	9.782	1.085E-11	1.075E-11
3.040	9.840	9.801E-12	9.884E-12
3.050	9.894	8.761E-12	9.014E-12
3.060	9.945	7.751E-12	8.144E-12
3.070	9.991	6.857E-12	7.273E-12
3.080	10.035	5.944E-12	6.403E-12
3.100	10.113	4.309E-12	4.663E-12
3.121	10.186	2.677E-12	2.835E-12
3.140	10.247	1.185E-12	1.182E-12
3.160	10.305	-3.030E-13	-5.588E-13
3.180	10.357	-1.754E-12	-2.299E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996567			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.15358			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 8.70247E-11			

TABELA 48 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,05623 g de mioglobina na presença de HCl, com NaOH 0,1369 M. $I = 0,10$ M; $E_{0a}' = 257,9$ mV; $j_H = 0,0$ mV/M; $j_{OH} = 376,4$ mV/M; $K_W = 1,81 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	PH
0.200	314.0	2.052
0.400	311.2	2.099
0.600	308.0	2.153
0.800	304.4	2.214
1.000	300.3	2.283
1.205	295.5	2.364
1.450	288.3	2.486
1.600	282.9	2.577
1.800	273.7	2.733
2.000	260.8	2.951
2.060	255.8	3.036
2.100	252.1	3.098
2.145	247.5	3.176
2.175	244.1	3.233
2.210	239.8	3.306
2.240	235.8	3.374
2.271	231.5	3.446
2.285	229.4	3.482
2.300	227.0	3.522
2.315	224.6	3.563
2.330	222.1	3.605
2.345	219.4	3.651
2.360	216.7	3.696
2.375	213.9	3.744
2.390	210.9	3.794
2.405	208.0	3.843
2.420	204.8	3.898
2.435	201.6	3.952
2.450	198.3	4.007
2.465	194.9	4.065
2.480	191.4	4.124
2.510	183.8	4.253
2.540	175.4	4.395
2.570	166.2	4.550
2.585	161.6	4.628
2.600	156.7	4.711
2.615	151.6	4.797
2.630	145.9	4.893
2.645	140.1	4.991
2.660	133.6	5.101
2.675	126.6	5.219
2.690	119.6	5.338
2.705	112.6	5.456
2.720	105.4	5.578
2.735	98.1	5.701
2.750	90.4	5.831
2.765	82.7	5.961
2.780	75.2	6.088
2.796	66.9	6.229
2.810	59.1	6.360
2.825	50.9	6.499
2.840	41.8	6.653

Continuação da Tabela 48.

2.855	31.8	6.822
2.870	20.9	7.006
2.895	-0.8	7.373
2.910	-16.3	7.635
2.925	-34.5	7.943
2.940	-54.0	8.272
2.956	-76.7	8.656
2.970	-92.6	8.925
2.985	-105.6	9.145
3.000	-116.4	9.327
3.015	-125.0	9.473
3.030	-132.3	9.596
3.045	-138.6	9.703
3.060	-144.0	9.794
3.075	-148.8	9.875
3.090	-153.1	9.948
3.105	-157.0	10.014
3.120	-160.5	10.074
3.135	-163.7	10.128
3.150	-166.8	10.181
3.165	-169.6	10.228
3.180	-172.1	10.271
3.195	-174.5	10.311
3.210	-176.8	10.350
3.225	-178.9	10.386
3.240	-181.0	10.422
3.255	-182.8	10.453
3.275	-185.2	10.493
3.285	-186.3	10.512
3.300	-188.0	10.541
3.320	-190.0	10.575
3.340	-192.0	10.610
3.360	-193.9	10.642
3.380	-194.6	10.654
3.400	-197.3	10.700
3.420	-198.8	10.726
3.440	-200.3	10.752
3.460	-201.7	10.776
3.501	-204.4	10.822
3.540	-206.8	10.863
3.580	-209.1	10.903
3.620	-211.2	10.939
3.660	-213.2	10.974
3.701	-215.1	11.007
3.750	-217.2	11.044
3.800	-219.2	11.078
3.850	-221.1	11.112
3.900	-222.8	11.141

TABELA 49 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de mioglobina, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 48.

FUNCOES DE GRAM MODIFICADAS			
PARA HCL			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
0.200	2.052	2.666E-01	2.703E-01
0.400	2.099	2.403E-01	2.429E-01
0.600	2.153	2.132E-01	2.155E-01
0.800	2.214	1.860E-01	1.881E-01
1.000	2.283	1.589E-01	1.607E-01
1.205	2.364	1.318E-01	1.327E-01
1.450	2.486	9.875E-02	9.914E-02
1.600	2.577	7.885E-02	7.861E-02
1.800	2.733	5.223E-02	5.123E-02
2.000	2.951	2.569E-02	2.385E-02
2.060	3.035	1.768E-02	1.563E-02
2.100	3.098	1.233E-02	1.016E-02
2.145	3.176	6.244E-03	3.999E-03
2.175	3.233	2.072E-03	-1.096E-04
2.210	3.306	-2.873E-03	-4.901E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.1742			
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999996			
PARA ACIDO HA1			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.345	3.651	6.092E-05	5.853E-05
2.360	3.696	5.654E-05	5.498E-05
2.375	3.744	5.224E-05	5.143E-05
2.390	3.794	4.780E-05	4.789E-05
2.405	3.843	4.392E-05	4.434E-05
2.420	3.898	3.974E-05	4.079E-05
2.435	3.952	3.591E-05	3.724E-05
2.450	4.007	3.221E-05	3.370E-05
2.465	4.065	2.865E-05	3.015E-05
2.480	4.124	2.524E-05	2.660E-05
2.510	4.253	1.854E-05	1.951E-05
2.540	4.395	1.209E-05	1.241E-05
2.570	4.550	5.904E-06	5.320E-06
2.585	4.628	3.059E-06	1.773E-06
2.600	4.711	1.169E-07	-1.774E-06
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.997727			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.5925			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 2.36471E-04			
PARA ACIDO HA2			
VOLUME	pH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.660	5.101	5.416E-07	5.406E-07
2.675	5.219	4.951E-07	4.858E-07
2.690	5.338	4.383E-07	4.310E-07
2.705	5.456	3.783E-07	3.762E-07
2.720	5.578	3.163E-07	3.214E-07
2.735	5.701	2.569E-07	2.666E-07
2.750	5.831	1.983E-07	2.119E-07
2.765	5.961	1.457E-07	1.571E-07
2.780	6.088	9.943E-08	1.023E-07
2.796	6.229	5.146E-08	4.383E-08
2.810	6.360	8.063E-09	-7.306E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998674			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.808			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 3.65263E-06			

PARA ACIDA HA3			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
2.855	6.822	7.057E-09	6.801E-09
2.870	7.006	6.077E-09	5.693E-09
2.895	7.373	3.624E-09	3.846E-09
2.910	7.635	2.267E-09	2.738E-09
2.925	7.943	1.162E-09	1.630E-09
2.940	8.272	3.620E-10	5.221E-10
2.956	8.656	-4.589E-10	-6.598E-10
2.970	8.925	-1.215E-09	-1.694E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.992113			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.94707			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 7.38654E-08			
PARA ACIDO HA4			
VOLUME	PH	FG REFINADA	FG AJUSTADA
3.120	10.074	6.204E-12	6.081E-12
3.135	10.128	5.069E-12	5.022E-12
3.150	10.181	3.873E-12	3.962E-12
3.165	10.228	2.773E-12	2.902E-12
3.180	10.271	1.784E-12	1.843E-12
3.195	10.311	7.695E-13	7.830E-13
3.210	10.350	-2.633E-13	-2.766E-13
3.225	10.386	-1.231E-12	-1.336E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999397			
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.20608			
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 7.06425E-11			

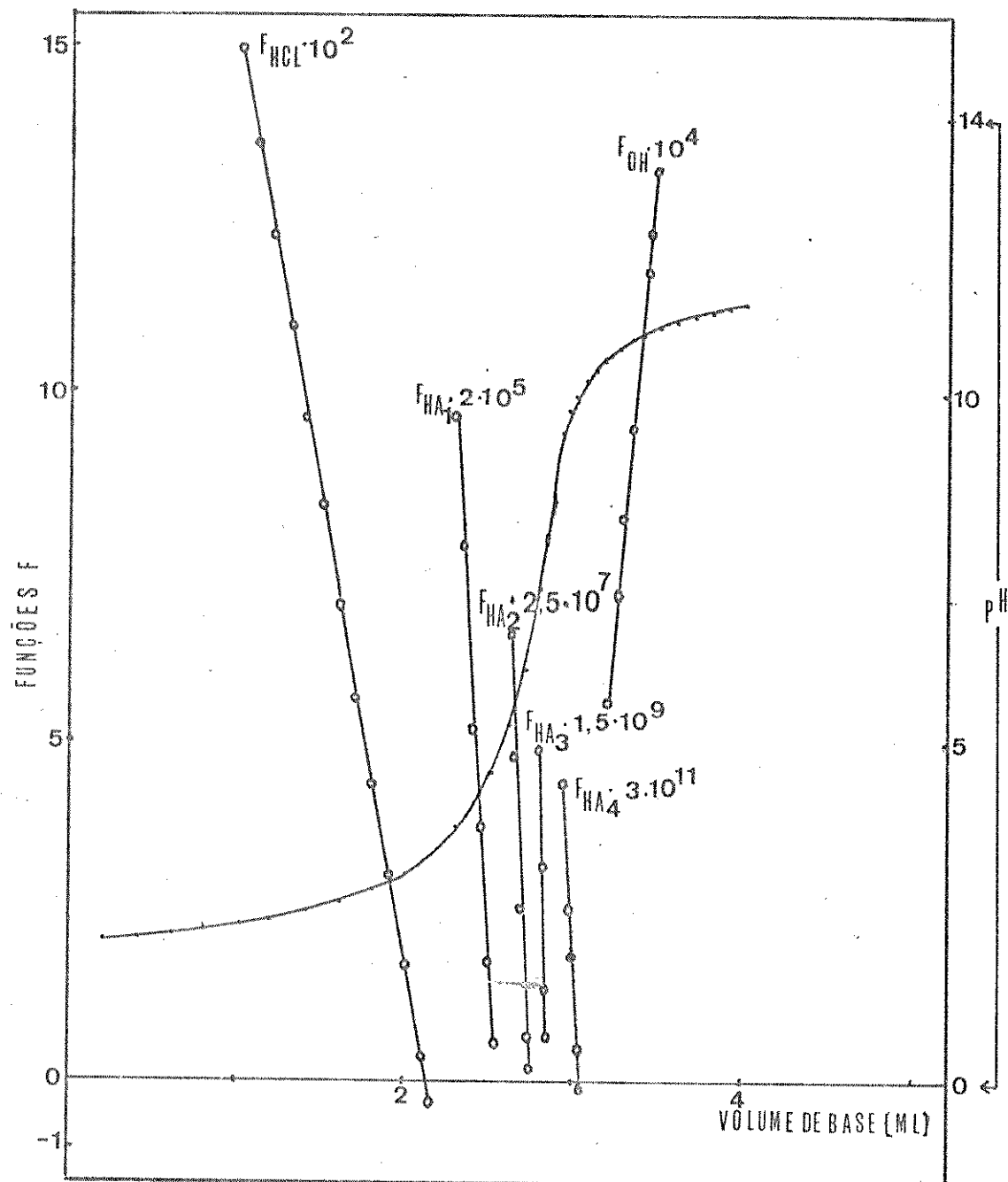


FIGURA 16 - Curva linearizada de titulação de 30,00 mL de solução contendo 0,05623 g de mioglobina na presença de HCl, com solução de NaOH 0,1369 M. $I = 0,10M$.

TABELA 50. - Valores obtidos para a estequiometria e pK_a dos grupos tituláveis da mioglobina em KCl 0,10 M

	Número de moles de grupos titulados por mol de mioglobina		Sequência de Aminoácidos (179)	Valores de pK_a
	Este trabalho	Referência (31)		
Carboxílicos				
HA ₁	18,06 ± 0,62	-	6 ASP	3,69 ± 0,06
HA ₂	8,91 ± 0,64	-	14 GLU	5,62 ± 0,17
Total	26,97 ± 0,90	23	20	
Imidazóis				
HA ₃ ⁺	4,84 ± 0,79	6	12 HIS	7,30 ± 0,19
Aminos				
HA ₄ ⁺	9,42 ± 1,34	19	19 LYS	10,04 ± 0,12
Fenólicos	-	-	3 TYR	-
Total de Grupos	41,24 ± 1,82	48	54	

6.3 - Titulação Potenciométrica da Mioglobina Desnaturada

Um dos interesses que se tem em estudar o fenômeno de desnaturação, é que através do seu conhecimento detalhado é possível investigar-se a respeito da natureza e magnitude das forças que contribuem para a estabilização de proteínas globulares como a mioglobina. Apesar dessa proteína ser uma das poucas cuja estrutura tridimensional é conhecida, segundo opinião de Acampora e Hermans nenhuma descrição detalhada de sua desnaturação tem sido publicada. Esses autores estudaram esse processo como função do pH e temperatura, verificando que na faixa de pH 5,5 a 9,0 ocorre precipitação da proteína desnaturada. Além desses limites de pH a desnaturação irreversível é muito rápida e abaixo de pH 4,0 as transições de temperatura decrescem rapidamente atribuindo-se essas mudanças de estabilidade à presença de 6 resíduos de histidina localizados no interior da proteína nativa⁽¹²⁷⁾.

Estudos da desnaturação em uréia e cloridrato de guanidina foram realizados com o intuito de verificar-se o efeito do grupo heme na conformação dessa proteína. Foi observado que a velocidade de desnaturação é dependente da concentração do desnaturante empregado. Em solução de uréia 10 M a mioglobina de cachalote apresenta 15% do seu caráter de hélice, significando que a desnaturação provoca um decréscimo das características helicoidais⁽¹²⁸⁾.

A desnaturação desta mioglobina por álcoois apresenta efeitos semelhantes à desnaturação por uréia. Fatores hidrofóbicos aumentam a eficiência do processo com aumento da substituição de grupos alquila na uréia^(129,130). O aumento do caráter hidrofóbico com a substituição alquila na molécula de uréia, é relacionado a alterações na estrutura da água. As tendências de uréias substituídas de agirem como formadoras ou quebradoras da estrutura da água, devem contribuir para suas eficiências como desnaturantes⁽¹³⁰⁾.

A cinética das mudanças conformacionais dessa proteína foi investigada através de variações de pH na faixa de 3,0 a 4,5. A pH 4,25 o processo ocorre em uma única etapa, porém a pH abaixo de 3,8 a desnaturação ocorre em duas etapas. Essa cinética é governada pelas interações entre o grupo heme e a globina

e portanto as propriedades desse grupo podem descrever a complexidade do processo. Quando a ligação entre a mioglobina e esse grupo é destruída, a proteína desenrola-se mais rapidamente⁽¹³³⁾.

Puett analisou os efeitos de soluções de uréia e cloridrato de guanidina sobre esse desenrolamento, observando que o equilíbrio só é atingido após diversas horas⁽¹³⁷⁾. Nesse nosso trabalho, as soluções dessa proteína foram tituladas após 2 horas de contato com as soluções de uréia 8,0 M.

6.3.1 - Resultados

As soluções de mioglobina desnaturada foram tituladas em condições de força iônica 0,10 M em KCl. Essas soluções foram tratadas com excesso de ácido clorídrico e tituladas com hidróxido de sódio. Na figura 17 é mostrada uma curva de titulação dessa proteína desnaturada (pH vs. volume de titulante adicionado). Nessa figura pode ser também observado o resultado da segmentação e linearização dessa curva, sendo que os segmentos de reta representam as regiões nas quais essa curva foi dividida e foram obtidos pelo gráfico das funções de Gran modificadas vs. volume de titulante.

Nas tabelas 51, 53 e 55 são apresentados os dados resultantes das titulações das soluções de mioglobina desnaturada em uréia 8,0 M, com hidróxido de sódio. Os resultados das linearizações dessas curvas de titulação são dados nas tabelas 52, 54 e 56. A estequiometria e os valores de pK_a dos grupos tituláveis são mostrados na tabela 57. Nos resultados da estequiometria foram levados em consideração as correções necessárias devido a presença de impurezas tituláveis nas soluções de uréia. Esses resultados correspondem a média aritmética de três titulações de soluções diferentes de mioglobina. Nessa tabela apresentamos também para fins de comparação o número de grupos dados pela sequência de aminoácidos⁽¹⁷⁹⁾.

TABELA 51 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,09118 g de mioglobina em uréia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1290 M. $I = 0,10$ M; $E_{Oa}^1 = 163,1$ mV; $j_H = -7.059,5$ mV/M; $j_{OH} = 521,8$ mV/M; $K_w = 10,15 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	199.2	3.928
0.200	196.9	3.967
0.300	194.2	4.012
0.400	191.3	4.061
0.500	188.2	4.113
0.600	184.7	4.172
0.700	180.9	4.236
0.760	178.4	4.278
0.800	176.7	4.307
0.845	174.7	4.340
0.900	171.9	4.388
0.930	170.0	4.420
0.960	168.4	4.447
1.000	166.0	4.487
1.030	164.2	4.517
1.060	162.2	4.551
1.080	160.7	4.576
1.102	159.2	4.601
1.150	155.8	4.659
1.200	152.1	4.721
1.260	146.9	4.808
1.300	143.4	4.867
1.330	140.4	4.918
1.360	137.2	4.971
1.400	132.4	5.052
1.430	129.0	5.110
1.460	125.1	5.175
1.500	119.5	5.269
1.530	114.6	5.352
1.560	109.2	5.443
1.600	101.6	5.571
1.630	95.5	5.674
1.660	88.9	5.785
1.690	82.3	5.896
1.710	77.8	5.972
1.730	73.2	6.050
1.760	66.7	6.159
1.780	62.2	6.235
1.800	57.7	6.311
1.820	53.3	6.385
1.840	48.9	6.459
1.850	46.6	6.498
1.860	44.7	6.530
1.870	42.6	6.565
1.890	38.0	6.642
1.910	33.6	6.717
1.940	26.8	6.831
1.980	16.5	7.005
2.001	10.6	7.104
2.030	2.0	7.249
2.060	-8.5	7.426
2.080	-16.7	7.565

Continuação da Tabela 51.

2.100	-26.3	7.727
2.120	-36.5	7.899
2.140	-48.5	8.101
2.160	-62.3	8.334
2.180	-76.1	8.567
2.190	-82.9	8.682
2.200	-90.3	8.807
2.210	-96.7	8.915
2.221	-102.4	9.011
2.230	-107.3	9.094
2.240	-112.6	9.184
2.250	-117.2	9.261
2.260	-121.0	9.325
2.270	-124.8	9.389
2.280	-128.3	9.448
2.290	-131.8	9.508
2.300	-134.8	9.558
2.320	-140.8	9.659
2.340	-145.9	9.745
2.360	-150.5	9.823
2.380	-154.4	9.888
2.400	-158.6	9.959
2.430	-163.9	10.049
2.460	-168.8	10.131
2.500	-175.0	10.235
2.531	-179.3	10.308
2.560	-183.0	10.370
2.600	-188.4	10.461
2.630	-191.9	10.520
2.660	-195.6	10.582
2.701	-200.3	10.661
2.730	-203.6	10.717
2.760	-206.8	10.771
2.800	-211.1	10.843
2.830	-214.5	10.901
2.871	-219.0	10.976
2.900	-221.5	11.019
2.930	-224.5	11.069
2.960	-227.5	11.120
2.990	-230.4	11.169
3.020	-233.3	11.218
3.050	-236.0	11.264
3.080	-238.5	11.306
3.120	-241.9	11.364
3.160	-244.9	11.415
3.200	-247.9	11.466
3.250	-251.2	11.523
3.300	-254.1	11.572
3.351	-257.0	11.622
3.402	-259.7	11.668
3.450	-261.9	11.706
3.500	-264.0	11.742
3.550	-265.8	11.773
3.600	-267.0	11.793
3.700	-271.3	11.868
3.800	-274.4	11.922
3.900	-277.0	11.967
4.000	-279.5	12.011

TABELA 52 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de mioglobina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 51.

FUNÇÕES DE GRAM MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.928		1.217E-01	1.315E-01
0.200	3.967		1.104E-01	1.186E-01
0.300	4.012		9.836E-02	1.057E-01
0.400	4.061		8.660E-02	9.277E-02
0.500	4.113		7.526E-02	7.987E-02
0.600	4.172		6.379E-02	6.697E-02
0.700	4.236		5.271E-02	5.407E-02
0.760	4.278		4.610E-02	4.633E-02
0.800	4.307		4.188E-02	4.117E-02
0.845	4.340		3.716E-02	3.536E-02
0.900	4.388		3.097E-02	2.827E-02
0.930	4.420		2.701E-02	2.440E-02
0.960	4.447		2.382E-02	2.053E-02
1.000	4.487		1.926E-02	1.537E-02
1.030	4.517		1.600E-02	1.150E-02
1.060	4.551		1.250E-02	7.628E-03
1.080	4.576		9.974E-03	5.048E-03
1.102	4.601		7.516E-03	2.210E-03
1.150	4.659		2.175E-03	-3.982E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.11913				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999945				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.500	5.269		1.918E-06	1.889E-06
1.530	5.352		1.682E-06	1.685E-06
1.560	5.443		1.424E-06	1.420E-06
1.600	5.571		1.089E-06	1.107E-06
1.630	5.674		8.437E-07	8.724E-07
1.660	5.785		5.983E-07	6.378E-07
1.690	5.896		3.738E-07	4.031E-07
1.710	5.972		2.286E-07	2.467E-07
1.730	6.050		8.431E-08	9.021E-08
1.760	6.159		-1.143E-07	-1.445E-07
1.780	6.235		-2.523E-07	-3.009E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999189				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 1.74153				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 7.8224E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.001	7.104		2.029E-08	1.969E-08
2.030	7.249		1.602E-08	1.585E-08
2.060	7.426		1.155E-08	1.188E-08
2.080	7.565		8.698E-09	9.234E-09
2.100	7.727		5.985E-09	6.586E-09
2.120	7.899		3.714E-09	3.937E-09
2.140	8.101		1.535E-09	1.287E-09
2.160	8.334		-6.740E-10	-1.359E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.997652				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.14973				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.32414E-07				

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.240	9.184		2.916E-11	2.870E-11
2.250	9.261		2.238E-11	2.288E-11
2.260	9.325		1.708E-11	1.706E-11
2.270	9.389		1.116E-11	1.125E-11
2.280	9.448		5.502E-12	5.429E-12
2.290	9.508		-6.555E-13	-3.884E-13
2.300	9.558		-5.912E-12	-6.205E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999662				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.28933				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 5.8171E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.760	10.771		6.273E-12	6.199E-12
2.800	10.843		5.418E-12	5.401E-12
2.830	10.901		4.711E-12	4.803E-12
2.871	10.976		3.838E-12	3.985E-12
2.900	11.019		3.412E-12	3.407E-12
2.930	11.069		2.115E-12	2.809E-12
2.960	11.120		2.205E-12	2.210E-12
2.990	11.169		1.610E-12	1.612E-12
3.020	11.218		9.968E-13	1.014E-12
3.050	11.264		4.194E-13	4.158E-13
3.080	11.306		-1.247E-13	-1.824E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.899662				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.07085				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 1.99404E-11				

TABELA 53 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,12624 g de mioglobina em uréia 8,0 M na presença de HCl com NaOH 0,1290 M. $I = 0,10$ M; $E'_{Oa} = 164,2$ mV; $j_H = -4.794,0$ mV/M; $j_{OH} = 510,2$ mV/M; $K_W = 10,14 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.200	189.6	4.115
0.260	187.7	4.147
0.300	186.3	4.170
0.360	184.5	4.200
0.400	183.1	4.224
0.460	181.0	4.259
0.500	179.3	4.287
0.561	176.8	4.329
0.600	175.3	4.354
0.620	174.4	4.369
0.640	173.6	4.383
0.660	172.7	4.398
0.700	170.8	4.429
0.740	168.9	4.461
0.760	167.9	4.478
0.802	165.7	4.515
0.845	163.6	4.550
0.900	160.3	4.605
1.010	153.4	4.721
1.056	150.2	4.774
1.100	146.8	4.831
1.115	145.8	4.848
1.160	142.3	4.907
1.175	141.0	4.929
1.190	139.8	4.949
1.200	138.9	4.964
1.245	134.9	5.031
1.300	129.7	5.118
1.346	124.8	5.201
1.400	118.6	5.305
1.445	112.7	5.404
1.502	104.7	5.539
1.515	102.7	5.572
1.530	100.6	5.608
1.545	98.3	5.646
1.560	95.9	5.687
1.575	93.5	5.727
1.590	91.2	5.766
1.600	89.5	5.794
1.615	87.0	5.836
1.630	84.6	5.877
1.645	81.9	5.922
1.660	79.5	5.963
1.693	73.9	6.057
1.715	70.1	6.121
1.745	65.0	6.207
1.761	62.5	6.249
1.775	60.2	6.287
1.800	56.1	6.356
1.845	48.7	6.481
1.900	39.5	6.636
1.945	32.2	6.758
2.000	22.1	6.928

Continuação da Tabela 53.

2.115	-2.8	7.348
2.130	-6.9	7.417
2.145	-11.0	7.486
2.160	-15.5	7.562
2.175	-20.2	7.641
2.190	-25.7	7.734
2.202	-30.2	7.810
2.215	-35.3	7.896
2.230	-41.9	8.007
2.245	-49.2	8.130
2.260	-56.2	8.249
2.275	-64.0	8.380
2.290	-71.5	8.507
2.301	-76.5	8.591
2.315	-83.1	8.703
2.335	-92.7	8.865
2.350	-99.4	8.978
2.365	-105.8	9.086
2.385	-112.9	9.205
2.400	-117.8	9.288
2.418	-123.1	9.377
2.435	-127.6	9.453
2.451	-131.6	9.521
2.465	-134.7	9.573
2.480	-138.1	9.630
2.490	-140.2	9.666
2.500	-142.2	9.699
2.510	-144.1	9.731
2.520	-145.7	9.758
2.530	-147.6	9.790
2.550	-151.2	9.851
2.570	-154.2	9.901
2.590	-157.1	9.950
2.600	-158.5	9.974
2.620	-161.3	10.021
2.641	-164.2	10.069
2.651	-165.4	10.090
2.670	-167.5	10.125
2.700	-171.3	10.189
2.730	-174.6	10.244
2.760	-177.8	10.298
2.790	-181.1	10.353
2.815	-183.6	10.395
2.850	-187.1	10.454
2.885	-190.3	10.508
2.945	-195.9	10.602
3.000	-200.7	10.683
3.045	-204.6	10.748
3.100	-209.5	10.831
3.145	-213.6	10.900
3.200	-218.1	10.976
3.240	-221.5	11.033
3.280	-224.9	11.090
3.300	-226.6	11.119
3.341	-229.7	11.171
3.380	-232.8	11.224
3.425	-236.3	11.283
3.476	-240.0	11.346
3.500	-241.7	11.375
3.600	-248.2	11.485
3.700	-253.9	11.582

TABELA 54 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de mioglobina em uréia com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 53.

FUNÇÕES DE GRAM MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.200	4.115		7.271E-02	8.325E-02
0.260	4.147		6.625E-02	7.551E-02
0.300	4.170		6.172E-02	7.035E-02
0.360	4.200		5.619E-02	6.261E-02
0.400	4.224		5.208E-02	5.745E-02
0.460	4.259		4.621E-02	4.971E-02
0.500	4.287		4.168E-02	4.455E-02
0.561	4.329		3.538E-02	3.668E-02
0.600	4.354		3.180E-02	3.165E-02
0.620	4.369		2.970E-02	2.907E-02
0.640	4.383		2.788E-02	2.649E-02
0.660	4.398		2.586E-02	2.391E-02
0.700	4.429		2.172E-02	1.875E-02
0.740	4.461		1.775E-02	1.359E-02
0.760	4.478		1.571E-02	1.101E-02
0.802	4.515		1.136E-02	5.596E-03
0.845	4.550		7.355E-03	4.874E-03
0.900	4.605		1.292E-03	-7.046E-03
1.010	4.721		-1.064E-02	-2.124E-02

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .845378

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999917

PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.530	5.608		1.480E-06	1.429E-06
1.545	5.646		1.356E-06	1.326E-06
1.560	5.687		1.231E-06	1.222E-06
1.575	5.727		1.112E-06	1.118E-06
1.590	5.766		1.004E-06	1.014E-06
1.600	5.794		9.249E-07	9.444E-07
1.615	5.836		8.132E-07	8.404E-07
1.630	5.877		7.109E-07	7.365E-07
1.645	5.922		5.977E-07	6.325E-07
1.660	5.963		5.024E-07	5.286E-07
1.693	6.057		2.875E-07	2.999E-07
1.715	6.121		1.471E-07	1.474E-07
1.745	6.207		-3.669E-08	-6.045E-08
1.761	6.249		-1.251E-07	-1.713E-07

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99849

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 1.73628

CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 6.92991E-06

PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.115	7.348		1.662E-08	1.609E-08
2.130	7.417		1.463E-08	1.445E-08
2.145	7.486		1.283E-08	1.281E-08
2.160	7.562		1.101E-08	1.117E-08
2.175	7.641		9.313E-09	9.526E-09
2.190	7.734		7.516E-09	7.886E-09
2.202	7.810		6.217E-09	6.574E-09
2.215	7.896		4.895E-09	5.152E-09
2.230	8.007		3.365E-09	3.512E-09
2.245	8.130		1.852E-09	1.871E-09
2.260	8.249		5.219E-10	2.312E-10
2.275	8.380		-9.230E-10	-1.409E-09

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998508

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.26211

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.09352E-07

PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.365	9.086		4.688E-11	4.617E-11
2.385	9.205		3.426E-11	3.419E-11
2.400	9.288		2.467E-11	2.521E-11
2.418	9.377		1.376E-11	1.443E-11
2.435	9.453		3.963E-12	4.248E-12
2.451	9.521		-5.427E-12	-5.334E-12
2.465	9.573		-1.291E-11	-1.372E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999644				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.44209				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 5.98923E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.945	10.602		1.112E-11	1.102E-11
3.000	10.683		9.987E-12	9.877E-12
3.045	10.748		9.033E-12	8.938E-12
3.100	10.831		7.783E-12	7.791E-12
3.145	10.900		6.722E-12	6.852E-12
3.200	10.976		5.625E-12	5.705E-12
3.240	11.033		4.774E-12	4.871E-12
3.280	11.090		3.921E-12	4.037E-12
3.300	11.119		3.492E-12	3.619E-12
3.341	11.171		2.735E-12	2.764E-12
3.380	11.224		1.948E-12	1.951E-12
3.425	11.283		1.042E-12	1.012E-12
3.476	11.346		6.257E-14	-5.136E-14
3.500	11.375		-4.026E-13	-5.519E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999633				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.47354				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 2.08569E-11				

TABELA 55 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,11760 g de mioglobina em uréia 8,0 M na presença de HCl com NaOH 0,1290 M; $I = 0,10$ M; $E'_{\text{Oa}} = 164,2$ mV; $j_{\text{H}} = -4.794,0$; $j_{\text{OH}} = 510,2$ mV/M; $K_{\text{W}} = 10,14 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.145	188.0	4.144
0.201	186.2	4.174
0.261	184.2	4.207
0.300	182.8	4.230
0.340	181.3	4.255
0.360	180.6	4.267
0.380	179.8	4.280
0.400	179.0	4.294
0.420	178.2	4.307
0.440	177.4	4.321
0.460	176.6	4.334
0.480	175.7	4.349
0.500	174.9	4.362
0.515	174.2	4.374
0.531	173.5	4.386
0.565	172.1	4.409
0.600	170.4	4.438
0.652	167.8	4.481
0.700	165.2	4.525
0.750	162.4	4.572
0.800	159.5	4.620
0.850	156.4	4.672
0.900	153.0	4.729
0.945	149.8	4.783
1.000	145.6	4.853
1.051	141.5	4.922
1.100	136.9	4.999
1.150	132.2	5.078
1.201	126.7	5.170
1.250	121.1	5.265
1.300	114.6	5.374
1.330	110.6	5.441
1.350	107.6	5.492
1.380	103.0	5.569
1.400	99.8	5.623
1.430	94.8	5.707
1.450	91.5	5.762
1.485	85.5	5.863
1.500	82.8	5.909
1.515	80.1	5.954
1.530	77.6	5.996
1.540	75.8	6.027
1.550	74.0	6.057
1.565	71.5	6.099
1.580	68.9	6.143
1.593	66.7	6.180
1.600	65.5	6.200
1.615	63.0	6.242
1.630	60.5	6.284
1.650	57.2	6.340
1.700	48.6	6.484
1.750	39.8	6.633
1.800	31.0	6.781

Continuação da Tabela 55.

1.850	25.3	6.877
1.865	18.2	6.996
1.905	9.5	7.143
1.930	3.6	7.242
1.950	-1.6	7.330
1.980	-9.8	7.468
2.000	-16.8	7.586
2.030	-27.8	7.771
2.050	-36.4	7.917
2.065	-43.3	8.033
2.080	-51.2	8.166
2.090	-56.5	8.256
2.100	-60.9	8.330
2.115	-68.5	8.458
2.130	-76.8	8.598
2.140	-81.4	8.676
2.151	-86.7	8.766
2.160	-91.0	8.838
2.180	-99.4	8.980
2.190	-103.4	9.047
2.200	-107.1	9.110
2.215	-111.8	9.189
2.230	-116.9	9.275
2.240	-120.0	9.327
2.250	-122.8	9.374
2.265	-126.6	9.439
2.280	-130.5	9.504
2.290	-132.9	9.545
2.300	-135.2	9.583
2.315	-138.3	9.636
2.330	-141.3	9.686
2.340	-143.3	9.720
2.350	-145.2	9.752
2.365	-147.7	9.794
2.380	-150.3	9.838
2.390	-151.9	9.865
2.400	-153.3	9.888
2.415	-155.7	9.929
2.450	-160.9	10.016
2.465	-162.9	10.050
2.480	-164.8	10.082
2.490	-166.1	10.104
2.500	-167.4	10.125
2.510	-168.6	10.146
2.560	-174.6	10.248
2.601	-179.3	10.325
2.650	-184.4	10.411
2.700	-189.6	10.499
2.750	-194.2	10.576
2.800	-199.1	10.658
2.845	-203.4	10.731
2.905	-208.9	10.823
2.950	-213.1	10.894
3.000	-217.6	10.970
3.100	-226.0	11.111
3.160	-231.3	11.201
3.200	-234.5	11.255
3.240	-237.7	11.309
3.281	-240.6	11.359
3.300	-242.2	11.386
3.400	-248.7	11.496
3.500	-254.4	11.594
3.600	-259.4	11.679

TABELA 56 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de mioglobina em uréia com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 55.

FUNÇÕES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.145	4.144		6.492E-02	7.266E-02
0.201	4.174		5.900E-02	6.544E-02
0.261	4.207		5.277E-02	5.770E-02
0.300	4.230		4.861E-02	5.266E-02
0.340	4.255		4.432E-02	4.750E-02
0.360	4.267		4.239E-02	4.492E-02
0.380	4.280		4.021E-02	4.234E-02
0.400	4.294		3.807E-02	3.976E-02
0.420	4.307		3.598E-02	3.718E-02
0.440	4.321		3.393E-02	3.460E-02
0.460	4.334		3.192E-02	3.202E-02
0.480	4.349		2.970E-02	2.944E-02
0.500	4.362		2.777E-02	2.686E-02
0.515	4.374		2.610E-02	2.493E-02
0.531	4.386		2.446E-02	2.287E-02
0.565	4.409		2.126E-02	1.848E-02
0.600	4.438		1.749E-02	1.396E-02
0.652	4.481		1.194E-02	7.256E-03
0.700	4.525		6.650E-03	1.064E-03
0.750	4.572		1.189E-03	-5.386E-03
0.800	4.620		-4.242E-03	-1.184E-02
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .708249				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999953				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.330	5.441		1.982E-06	1.939E-06
1.350	5.492		1.777E-06	1.757E-06
1.380	5.569		1.481E-06	1.485E-06
1.400	5.623		1.286E-06	1.303E-06
1.430	5.707		9.981E-07	1.031E-06
1.450	5.762		8.200E-07	8.499E-07
1.485	5.863		5.120E-07	5.323E-07
1.500	5.909		3.785E-07	3.962E-07
1.515	5.954		2.478E-07	2.601E-07
1.530	5.996		1.298E-07	1.240E-07
1.540	6.027		4.488E-08	3.331E-08
1.550	6.057		-3.960E-08	-5.742E-08
1.565	6.099		-1.555E-07	-1.935E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999408				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 1.54367				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 9.07279E-06				

PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
1.830	6.877		3.800E-08	3.707E-08
1.865	6.996		3.221E-08	3.181E-08
1.905	7.143		2.563E-08	2.580E-08
1.930	7.242		2.161E-08	2.205E-08
1.950	7.330		1.839E-08	1.904E-08
1.980	7.468		1.400E-08	1.453E-08
2.000	7.586		1.075E-08	1.153E-08
2.030	7.771		6.672E-09	7.023E-09
2.050	7.917		3.984E-09	4.018E-09
2.065	8.033		2.104E-09	1.764E-09
2.080	8.166		8.459E-11	-4.890E-10
2.090	8.256		-1.239E-09	-1.991E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.998991				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.07675				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.50234E-07				
PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.200	9.110		5.109E-11	5.110E-11
2.215	9.189		4.059E-11	3.931E-11
2.230	9.275		2.698E-11	2.752E-11
2.240	9.327		1.860E-11	1.965E-11
2.250	9.374		1.103E-11	1.179E-11
2.265	9.439		5.687E-13	3.886E-15
2.280	9.504		-1.128E-11	-1.179E-11
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99927				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 2.265				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 7.86043E-10				
PARA ACIDO HA4				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.750	10.576		1.144E-11	1.120E-11
2.800	10.658		1.017E-11	1.009E-11
2.845	10.731		9.051E-12	9.080E-12
2.905	10.823		7.650E-12	7.738E-12
2.950	10.894		6.565E-12	6.732E-12
3.000	10.970		5.428E-12	5.614E-12
3.100	11.111		3.350E-12	3.378E-12
3.160	11.201		1.980E-12	2.037E-12
3.200	11.255		1.153E-12	1.143E-12
3.240	11.309		2.980E-13	2.482E-13
3.281	11.359		-4.870E-13	-6.685E-13
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999504				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= 3.2511				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 2.23583E-11				

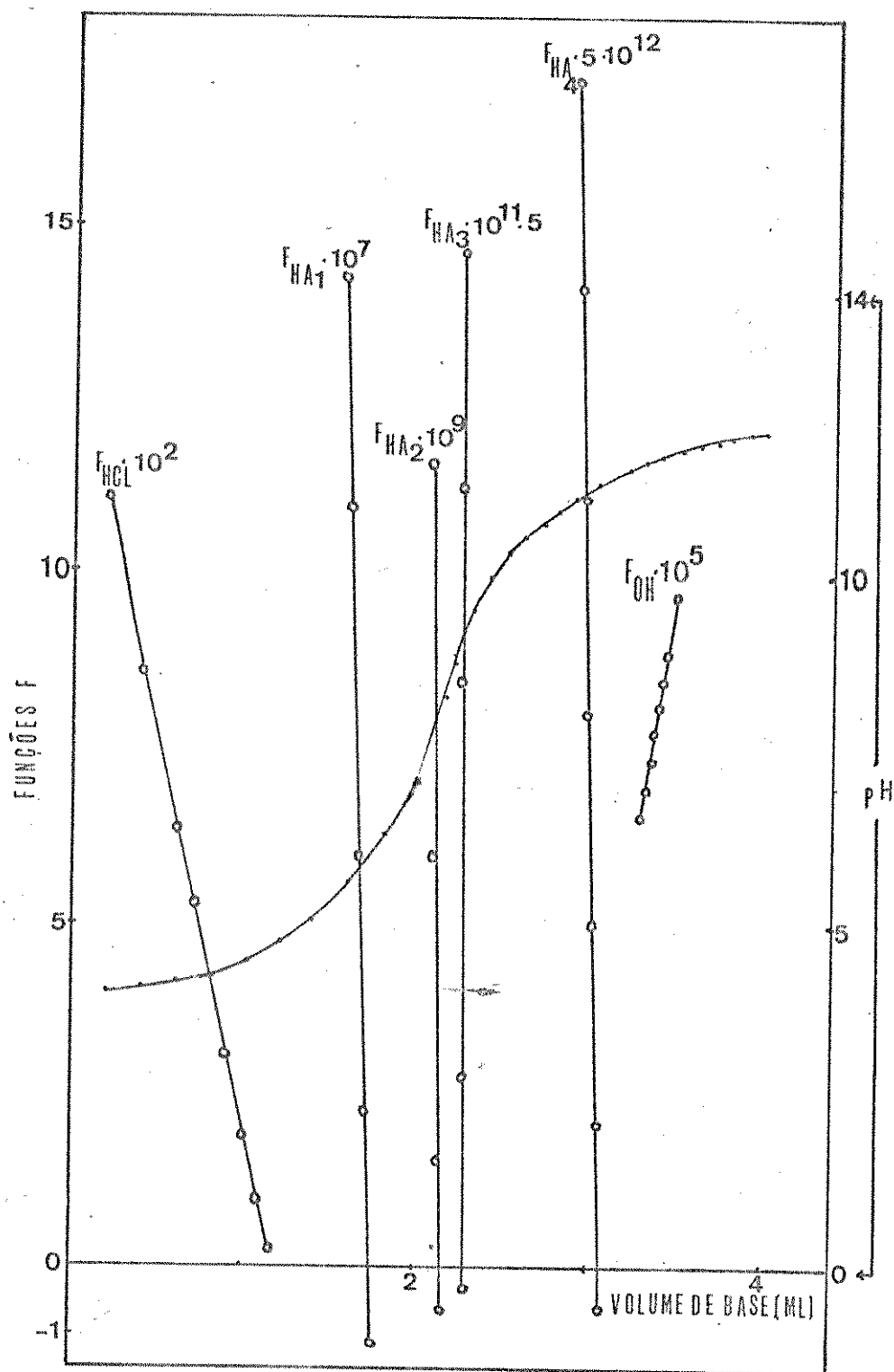


FIGURA 17 - Curva linearizada de titulação de 30,00 mL de solução contendo 0,09118 g de mioglobina em uréia e na presença de HCl, com NaOH 0,1290 M. $I = 0,10$ M.

TABELA 57 - Valores obtidos para a estequiometria e pK_a dos grupos tituláveis da mioglobina

	Número de moles de grupos titulados por mol de mioglobina	Sequência de aminoácidos (179)	Valores de pK_a
Carboxílicos			
HA ₁	15,35 ± 0,33	6 ASP	5,10 ± 0,06
HA ₂	9,39 ± 0,41	14 GLU	6,89 ± 0,07
Total	24,74 ± 0,50	20	-
Imidazóis			
HA ₃ ⁺	2,99 ± 0,20	12 HIS	9,19 ± 0,08
Aminos			
HA ₄ ⁺	18,38 ± 0,44	19 LYS	10,68 ± 0,03
Fenólicos	-	3 TYR	-
Total de Grupos	46,12 ± 0,86	54	-

6.4 - Discussão

Os resultados da estequiometria e dos valores de pK_a dos grupos tituláveis da mioglobina encontrados nas duas condições estudadas são mostrados na tabela 58.

Uma análise dessa tabela nos leva as seguintes conclusões:

1. O número total de grupos carboxílicos titulados, é maior para a proteína nativa que desnaturada. Esse número nos dois casos estudados, é maior que aquele correspondente a soma de resíduos de aspártico e glutâmico dados pela sequência de aminoácidos.

2. O número de resíduos de histidina encontrados tanto para a proteína nativa quanto desnaturada, é menor que o número desses resíduos dado pela sequência de aminoácidos. É fato conhecido que a mioglobina possui seis grupos imidazóis anormais. Breslow e Gurd estudando a curva de titulação da mioglobina de cachalote, observaram que na região de pH entre 5 e 6, os grupos carboxílicos e seis grupos imidazóis são titulados conjuntamente. Os outros seis grupos imidazóis restantes estão situados numa região inacessível ao solvente numa forma não ionizada. Um desses grupos deve ser certamente aquele ligado ao grupo heme (31). Puett encontrou que esses grupos imidazóis anormais, têm um pK_a aparente bastante baixo e igual a 3,0 para a proteína nativa e 5,9 para a proteína desnaturada. Fazendo correções do valor desse parâmetro, levando em conta fatores eletrostáticos, encontrou o valor de 6,6 para o pK_a intrínseco desses grupos na proteína desnaturada⁽¹³⁷⁾. Analisando a estrutura dessa proteína por raios X, Kendrew e colaboradores detectaram resíduos de histidina localizados no interior da molécula⁽¹⁹⁶⁾ e Acampora e Hermans estudando a desnaturação dessa proteína atribuíram as variações bruscas de temperatura que ocorrem a valores de pH baixos, à presença de 6 resíduos de histidina inacessíveis ao solvente⁽¹²⁷⁾.

Examinando os resultados encontrados nesse trabalho, observamos que alguns grupos imidazóis foram titulados na região de titulação dos grupos carboxílicos tanto para a proteína nativa quanto desnaturada, enquanto que um número muito pequeno desses grupos foi titulado na região apropriada de pH comumente

TABELA 58 - Valores para estequiometria e pK_a dos grupos tituláveis da mioglobina

	Número de moles de grupos titulados por mol de mioglobina		Seqüência de Aminoácidos	Valores de pK _a	
	Nativa	Desnaturada		Nativa	Desnaturada
Carboxílicos					
HA ₁	18,06 ± 0,62	15,35 ± 0,33	6 ASP	3,69 ± 0,06	5,10 ± 0,06
HA ₂	8,91 ± 0,64	9,39 ± 0,41	14 GLU	5,62 ± 0,17	6,89 ± 0,07
Total	26,97 ± 0,90	24,74 ± 0,50	20		
Imidazóis					
HA ₃ ⁺	4,84 ± 0,79	2,99 ± 0,20	12 HIS	7,30 ± 0,19	9,19 ± 0,08
Imidazóis +					
Carboxílicos	31,81 ± 0,58	27,73 ± 0,69	32		
Aminos					
HA ₄ ⁺	9,42 ± 1,34	18,38 ± 0,44	19 LYS	10,04 ± 0,12	10,68 ± 0,03
Fenólicos	-	-	3 TYR		
Total de Grupos	41,24 ± 1,82	46,12 ± 0,86	54		

atribuída à sua titulação. A soma do número total de grupos carboxílicos e grupos imidazóis para a proteína nativa, $(31,81 \pm 0,58)$ é bastante concordante com a soma desses grupos dada pela sequência de aminoácidos (32), o que possivelmente confirme a conclusão acima exposta.

Breslow e Gurd observaram que com a desnaturação ácida, 6 resíduos de histidina tornam-se acessíveis ao solvente e são portanto titulados na região apropriada de pH. No nosso caso particular, onde a desnaturação ocorreu em uréia, observamos que alguns desses grupos foram também titulados juntamente com grupos aminos, razão pela qual a soma do número total de grupos carboxílicos e imidazóis encontrados, $(27,73 \pm 0,69)$, é menor que aquela dada pela sequência de aminoácidos.

3. De acordo com a sequência de aminoácidos, a proteína possui 19 resíduos de lisina. Observando os resultados obtidos para o ácido HA_4^+ tanto para a proteína nativa quanto desnaturada, concluímos que alguns desses grupos não foram titulados, provavelmente por encontrarem-se em regiões hidrofóbicas da proteína. Ao contrário das outras proteínas estudadas nesse trabalho, os grupos fenólicos da tirosina parecem não ter sido titulados. Hermans estudou a ionização desses grupos, tendo encontrado que apenas um deles tem um pK_a normal e igual a 10,3. Os outros dois resíduos de tirosina têm valores anormais de pK_a sendo que um desses grupos abaixo de pH 11,6 só está parcialmente ionizado tendo um pK_a igual a 11,5. O terceiro resíduo não se ioniza abaixo de pH 12,8 e é altamente anormal⁽⁸⁾. Esses fatos justificam, porque através do método de linearização não foi possível caracterizar-se os grupos fenólicos da mioglobina.

4. Quanto ao número total de moles de grupos titulados tanto para a proteína nativa quanto desnaturada, encontramos um valor menor que aquele esperado, baseando-se na sequência de aminoácidos. Para os sistemas contendo uréia, esses resultados podem ser atribuídos à incompleta desnaturação da proteína. As soluções analisadas foram tituladas após duas horas de contato com as soluções do agente desnaturante e talvez esse intervalo de tempo não tenha sido suficiente para um completo desenrolamento da cadeia polipeptídica da proteína estudada. Os resultados encontrados por Puett indicam que o equilíbrio do completo desenrolamento dessa proteína só é atingido após diversas horas⁽¹³⁷⁾.

7. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS EM SOLUÇÕES DE URÉIA

7.1 - Considerações Gerais

Com o intuito de entender-se o comportamento e propriedades de proteínas, bem como elucidar-se suas estruturas, é comum analisar-se espécies estruturalmente menores e menos complexas como é o caso de aminoácidos.

Os métodos antigos de análise dessas espécies componentes das proteínas eram baseados em princípios gravimétricos e o isolamento de um determinado constituinte era feito num tempo relativamente grande. Com o advento de novos métodos como eletrodialise, métodos enzimáticos e cromatografia, essa análise passou a ser um procedimento de rotina fornecendo importantes informações sobre a estrutura e composição das proteínas.

Recentemente, Mackenzie apresentou uma revisão bibliográfica a respeito dos modernos desenvolvimentos de análise de aminoácidos através do método de cromatografia gás-líquido⁽²⁰¹⁾. Segundo o autor, esse método é equivalente em precisão e exatidão à cromatografia de troca iônica, sendo no entanto mais sensível e mais rápido, além de se constituir na melhor técnica para a resolução de isômeros óticos de aminoácidos. Uma combinação do cromatógrafo a um espectrômetro de massa confere uma flexibilidade muito maior a essa técnica.

Nesse trabalho, estudamos potenciometricamente a histidina e o ácido glutâmico que são respectivamente um aminoácido essencial e não essencial. Estudamos ainda uma mistura desses dois aminoácidos.

O grupo imidazol da histidina apresenta uma capacidade tamponante muito grande em pH neutro e portanto tem uma importância fisiológica como grupo tampão de proteínas e tecidos. De uma maneira geral, os aminoácidos têm poder tamponante máximo nas regiões de pH próximos aos seus valores de pK_a . Como eletrólitos polivalentes podem exercer suas capacidades tamponantes pelo menos em duas regiões de pH. No caso específico da his

tidina e ácido glutâmico há três grupos ionizáveis com os seguintes valores de pK_a :

TABELA 59 - Valores de pK_a de Ácido Glutâmico e Histidina.

	pK_1 (COOH)		pK_2		pK_3 (NH ₃ ⁺)	
	Ref. 151	Ref. 184	Ref. 151	Ref. 184	Ref. 151	Ref. 184
Ácido Glutâmico	2,18 ± 0,1	2,16	4,20 ± 0,0	4,25 (COOH)	9,59 ± 0,09	9,67
Histidina	1,7 ± 0,1	1,82	6,02 ± 0,14	6,00(imidazol)	9,08 ± 0,04	9,17

Estudamos esses aminoácidos em soluções de uréia com a finalidade de buscar esclarecimentos acerca de alguns resultados encontrados em certas regiões de pH das curvas de titulação das proteínas analisadas. Lilley e Scott, com o objetivo de obter informações a respeito do mecanismo de desnaturação de proteínas, analisaram o comportamento de alguns aminoácidos em soluções de uréia. Nos três sistemas de aminoácidos estudados, as interações soluto-soluto foram as mesmas não tendo sido observado nenhum efeito sobre as cadeias laterais. Devido a constância dos resultados os autores sugerem que há uma interação predominante da uréia com o grupo principal do aminoácido⁽¹³⁸⁾.

Verificamos que em soluções de uréia, o número de alguns grupos titulados das proteínas analisadas, ultrapassou aquele esperado pela composição de aminoácidos, como foi, por exemplo, o caso dos grupos carboxílicos da mioglobina e os grupos imidazóis da ovalbumina. Desse modo, achamos que seria de interesse analisarmos sistemas de composição bem conhecida como é o caso de aminoácidos, nas mesmas condições de força iônica e meio desnaturante que as proteínas, com o propósito de examinarmos a exatidão dos nossos cálculos.

7.2 - Resultados

As soluções dos aminoácidos em uréia 8,0 M foram tratadas com excesso de HCl e tituladas nas condições de força iônica 0,10 M em KCl. Usamos como titulante soluções de NaOH e as titulações foram efetuadas duas horas após a adição de uréia às soluções dos aminoácidos. É óbvio que para essas espécies que têm estruturas relativamente simples, não faz sentido falar-se em desnaturação. Mas como as soluções de proteínas foram tituladas somente após duas horas de contato com o agente desnaturante, estabelecemos também esse mesmo intervalo de tempo para iniciarmos as titulações dos aminoácidos. Desse modo, procuramos manter nessas titulações as mesmas condições usadas nos outros sistemas estudados.

Nas figuras 18, 19 e 20 são mostrados as curvas de titulação e os segmentos de reta obtidos pela linearização dessas curvas para histidina, ácido glutâmico e a mistura desses aminoácidos, respectivamente. Nas tabelas 60 e 62 são apresentados os dados obtidos em 2 titulações de histidina e nas tabelas 61 e 63 são mostrados os resultados encontrados pela linearização das curvas de titulação desse aminoácido. Para o ácido glutâmico, os dados das titulações são mostrados nas tabelas 64 e 66 enquanto que os dados resultantes da linearização das curvas de titulação são apresentados nas tabelas 65 e 67. Os dados das titulações de misturas de soluções de ácido glutâmico e histidina são apresentados nas tabelas 68 e 70 e os resultados encontrados pela linearização das curvas de titulação são mostrados nas tabelas 69 e 71.

As determinações dos volumes de equivalência e constantes de dissociação foram efetuadas através do programa PROTE MODIFICADO conforme procedimento já mencionado. As estequiometrias dos grupos ionizáveis nos três sistemas estudados, são mostradas na tabela 72. Na determinação do número de moles de grupos tituláveis foram feitas as correções de volumes de NaOH gastos na titulação das impurezas presentes na uréia.

Os valores de pK_a dos grupos ionizáveis dos três sistemas analisados são apresentados na tabela 73. Os resultados dessas tabelas acima referidas representam a média aritmética de 2 titulações diferentes.

TABELA 60 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,03543 g de histidina em uréia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1482 M; $I = 0,10$ M; $E_{0a}^1 = 168,4$ mV; $j_H = -8.847,8$ mV/M; $j_{OH} = 436,8$ mV/M; $K_W = 10,55 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	225.1	3.552
0.200	223.8	3.575
0.300	222.5	3.597
0.400	221.2	3.620
0.500	219.7	3.646
0.600	218.1	3.674
0.700	216.4	3.703
0.800	214.6	3.734
0.900	212.7	3.767
1.000	210.5	3.805
1.101	208.1	3.846
1.200	205.5	3.891
1.300	202.6	3.941
1.400	199.2	3.999
1.500	195.2	4.067
1.600	190.6	4.146
1.700	184.9	4.243
1.800	177.6	4.367
1.900	167.4	4.540
2.000	152.2	4.798
2.100	129.7	5.178
2.150	118.7	5.364
2.200	109.2	5.524
2.300	94.7	5.768
2.400	83.5	5.956
2.500	73.8	6.119
2.600	65.0	6.266
2.700	56.5	6.409
2.800	47.8	6.555
2.902	37.7	6.724
3.000	26.1	6.919
3.100	10.4	7.183
3.150	-0.7	7.370
3.200	-16.6	7.638
3.250	-36.4	7.972
3.275	-45.8	8.131
3.300	-54.2	8.272
3.325	-61.0	8.387
3.350	-66.7	8.483
3.400	-76.2	8.643
3.500	-90.1	8.877
3.600	-100.8	9.056
3.700	-110.0	9.211
3.750	-114.3	9.283
3.800	-118.5	9.353
3.850	-122.6	9.422
3.900	-126.7	9.490
3.950	-130.9	9.561
4.000	-135.3	9.635
4.050	-139.7	9.708
4.100	-144.5	9.789
4.150	-149.2	9.876

Continuação da Tabela 60.

4.200	-155.4	9.972
4.250	-161.8	10.080
4.300	-169.4	10.208
4.350	-178.2	10.356
4.375	-183.3	10.442
4.400	-189.1	10.540
4.425	-195.1	10.641
4.450	-201.4	10.748
4.475	-207.6	10.853
4.500	-213.5	10.952
4.525	-218.8	11.042
4.550	-223.5	11.122
4.600	-231.2	11.253
4.650	-237.4	11.358
4.700	-242.4	11.443
4.750	-246.6	11.515
4.800	-250.1	11.575
4.850	-253.2	11.628
4.900	-256.0	11.676
5.000	-260.7	11.756
5.100	-264.6	11.824
5.200	-267.9	11.881
5.300	-270.8	11.931

TABELA 61 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de histidina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 60.

FUNÇÕES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.552		3.010E-01	2.993E-01
0.200	3.575		2.857E-01	2.845E-01
0.300	3.597		2.712E-01	2.696E-01
0.400	3.620		2.575E-01	2.548E-01
0.500	3.646		2.425E-01	2.400E-01
0.600	3.674		2.275E-01	2.252E-01
0.700	3.703		2.125E-01	2.104E-01
0.800	3.734		1.978E-01	1.955E-01
0.900	3.767		1.834E-01	1.807E-01
1.000	3.805		1.680E-01	1.659E-01
1.101	3.846		1.527E-01	1.509E-01
1.200	3.891		1.377E-01	1.363E-01
1.300	3.941		1.226E-01	1.214E-01
1.400	3.999		1.071E-01	1.066E-01
1.500	4.067		9.127E-02	9.180E-02
1.600	4.146		7.588E-02	7.698E-02
1.700	4.243		6.025E-02	6.216E-02
1.800	4.367		4.457E-02	4.734E-02
1.900	4.540		2.862E-02	3.252E-02
2.000	4.798		1.289E-02	1.770E-02
2.100	5.178		-2.689E-03	2.881E-03
2.150	5.364		-9.950E-03	-4.529E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.11944				
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999897				
PARA ÁCIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.600	6.266		2.594E-07	2.670E-07
2.700	6.409		2.256E-07	2.255E-07
2.800	6.555		1.887E-07	1.839E-07
2.902	6.724		1.463E-07	1.416E-07
3.000	6.919		1.041E-07	1.009E-07
3.100	7.183		6.099E-08	5.931E-08
3.150	7.370		3.906E-08	3.854E-08
3.200	7.638		1.622E-08	1.777E-08
3.250	7.972		-5.738E-09	-3.004E-09
3.275	8.131		-1.651E-08	-1.339E-08
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999231				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 3.24277				
CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO P/HA1= 4.15429E-07				
PARA ÁCIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
4.100	9.789		1.368E-10	1.364E-10
4.150	9.876		1.177E-10	1.175E-10
4.200	9.972		9.859E-11	9.854E-11
4.250	10.080		7.955E-11	7.961E-11
4.300	10.208		6.003E-11	6.067E-11
4.350	10.356		4.132E-11	4.174E-11
4.375	10.442		3.197E-11	3.227E-11
4.400	10.540		2.235E-11	2.280E-11
4.425	10.641		1.326E-11	1.334E-11
4.450	10.748		4.200E-12	3.871E-12
4.475	10.853		-4.646E-12	-5.596E-12
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999952				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 4.46022				
CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO PARA HA2= 3.78675E-10				

TABELA 62 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,03178 g de histidina em uréia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1482 M. $I = 0,10$ M; $E_{0a}^1 = 168,4$ mV; $j_H = -8.843,8$ mV/M; $j_{OH} = 436,8$ mV/M; $K_w = 10,55 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	225.4	3.546
0.200	224.1	3.569
0.300	222.8	3.592
0.400	221.4	3.616
0.500	219.9	3.642
0.600	218.3	3.670
0.700	216.6	3.699
0.800	214.8	3.730
0.900	212.8	3.765
1.000	210.6	3.803
1.100	208.2	3.844
1.200	205.5	3.891
1.300	202.5	3.942
1.400	199.0	4.002
1.500	195.0	4.071
1.600	190.2	4.153
1.700	184.4	4.252
1.800	176.7	4.383
1.900	165.9	4.566
2.000	149.3	4.847
2.100	125.7	5.246
2.200	104.9	5.597
2.300	90.3	5.842
2.400	78.6	6.036
2.500	68.7	6.205
2.600	59.2	6.364
2.700	49.6	6.525
2.800	39.1	6.702
2.900	26.4	6.915
3.000	8.4	7.218
3.050	-4.8	7.441
3.075	-13.3	7.584
3.100	-23.8	7.761
3.125	-35.1	7.952
3.150	-45.5	8.127
3.175	-54.1	8.272
3.200	-61.7	8.400
3.225	-67.9	8.505
3.250	-73.2	8.594
3.300	-81.9	8.741
3.350	-89.1	8.862
3.400	-95.4	8.968
3.500	-106.0	9.145
3.600	-115.4	9.303
3.700	-124.4	9.454
3.800	-133.5	9.607
3.900	-143.2	9.769
4.000	-154.6	9.961
4.050	-161.3	10.074
4.100	-169.2	10.207
4.125	-173.8	10.284
4.150	-178.7	10.347

Continuação da Tabela 62.

4.175	-184.1	10.458
4.200	-190.2	10.561
4.225	-196.3	10.664
4.250	-203.1	10.779
4.276	-209.5	10.987
4.300	-215.2	10.984
4.350	-225.1	11.152
4.400	-232.7	11.281
4.500	-243.6	11.466
4.600	-251.3	11.598
4.700	-257.2	11.699
4.800	-261.8	11.778
4.900	-265.7	11.845

TABELA 63 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de histidina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 62.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.546		3.050E-01	2.999E-01
0.200	3.569		2.894E-01	2.851E-01
0.300	3.592		2.747E-01	2.702E-01
0.400	3.616		2.597E-01	2.554E-01
0.500	3.642		2.446E-01	2.406E-01
0.600	3.670		2.294E-01	2.258E-01
0.700	3.699		2.144E-01	2.110E-01
0.800	3.730		1.995E-01	1.961E-01
0.900	3.765		1.842E-01	1.813E-01
1.000	3.803		1.688E-01	1.665E-01
1.100	3.844		1.534E-01	1.517E-01
1.200	3.891		1.377E-01	1.369E-01
1.300	3.942		1.222E-01	1.220E-01
1.400	4.002		1.063E-01	1.072E-01
1.500	4.071		9.064E-02	9.241E-02
1.600	4.153		7.479E-02	7.759E-02
1.700	4.252		5.918E-02	6.277E-02
1.800	4.383		4.313E-02	4.795E-02
1.900	4.566		2.705E-02	3.313E-02
2.000	4.847		1.121E-02	1.831E-02
2.100	5.246		-3.706E-03	3.489E-03
2.200	5.597		-1.761E-02	-1.133E-02
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.12354				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999945				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.600	6.364		2.051E-07	2.100E-07
2.700	6.525		1.710E-07	1.697E-07
2.800	6.702		1.332E-07	1.295E-07
2.900	6.915		9.265E-08	8.919E-08
3.000	7.218		4.991E-08	4.893E-08
3.050	7.441		2.865E-08	2.880E-08
3.075	7.584		1.810E-08	1.873E-08
3.100	7.761		7.125E-09	8.667E-09
3.125	7.952		-3.625E-09	-1.399E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999351				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 3.12153				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 4.02635E-07				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
4.000	9.961		9.280E-11	9.220E-11
4.050	10.074		7.429E-11	7.393E-11
4.100	10.207		5.551E-11	5.566E-11
4.125	10.284		4.598E-11	4.653E-11
4.150	10.367		3.688E-11	3.740E-11
4.175	10.458		2.784E-11	2.826E-11
4.200	10.561		1.860E-11	1.913E-11
4.225	10.664		1.011E-11	9.993E-12
4.250	10.779		9.814E-13	8.593E-13
4.276	10.887		-7.678E-12	-8.640E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999868				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 4.25235				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 3.65359E-10				

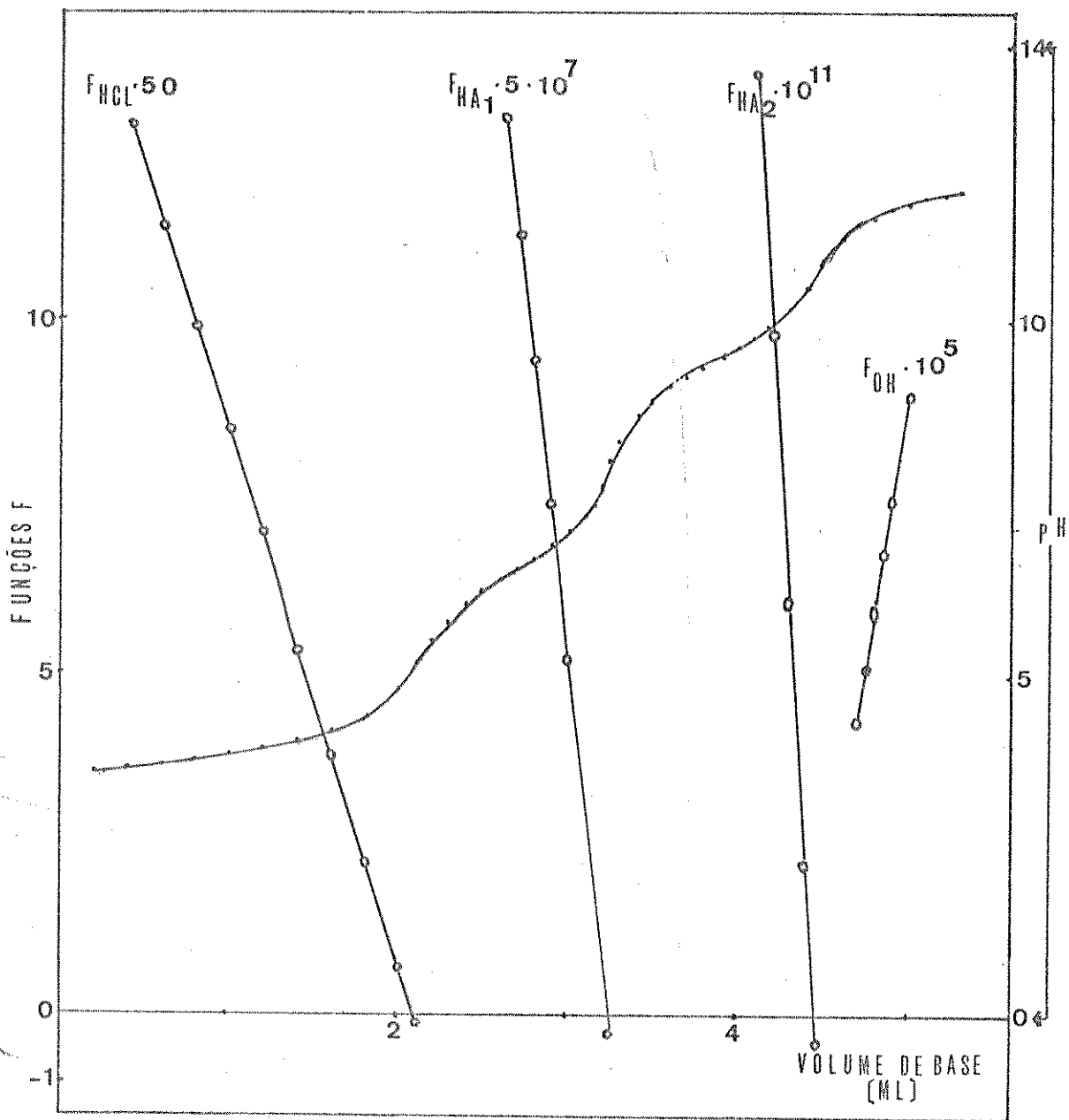


FIGURA 18 - Curva linearizada de titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,03543 g de histidina em uréia 8,0 M e na presença de HCl, com NaOH 0,1482 M. $I = 0,10$ M.

TABELA 64 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,01181 g de ácido glutâmico em uréia 8,0M na presença de HCl, com NaOH 0,1251 M. $I = 0,10M$; $E_{Oa}^{\circ} = 175,8$ mV; $j_H = -9.356,2$ mV/M; $j_{OH} = 448,2$ mV/M; $K_W = 10,70 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.000	229.1	3.614
0.200	226.8	3.654
0.400	224.2	3.698
0.600	221.3	3.748
0.800	218.0	3.804
1.000	214.3	3.868
1.100	212.1	3.905
1.200	209.8	3.944
1.300	207.3	3.987
1.400	204.5	4.035
1.501	201.5	4.086
1.600	198.1	4.143
1.700	194.3	4.208
1.800	190.0	4.281
1.900	185.2	4.362
2.000	179.8	4.453
2.101	173.6	4.558
2.201	166.5	4.678
2.245	163.1	4.735
2.275	160.6	4.777
2.300	158.4	4.814
2.330	155.7	4.860
2.375	151.3	4.934
2.400	148.8	4.976
2.445	143.7	5.062
2.501	136.5	5.183
2.530	132.1	5.257
2.560	126.9	5.345
2.590	121.0	5.444
2.615	115.2	5.542
2.645	106.3	5.693
2.675	94.2	5.897
2.700	78.4	6.164
2.730	36.4	6.873
2.745	-18.5	7.801
2.760	-47.3	8.288
2.775	-61.9	8.534
2.800	-76.8	8.782
2.860	-97.3	9.132
2.901	-106.7	9.290
2.945	-115.1	9.431
3.000	-124.0	9.581
3.045	-130.5	9.691
3.100	-138.1	9.818
3.145	-144.2	9.921
3.200	-151.7	10.047
3.230	-155.9	10.118
3.260	-160.3	10.192
3.290	-164.7	10.266
3.315	168.6	4.627
3.345	-173.4	10.412
3.375	-178.6	10.500

Continuação da Tabela 64.

3.401	-183.6	10.584
3.430	-189.0	10.676
3.460	-194.8	10.774
3.490	-200.9	10.877
3.500	-202.9	10.910
3.515	-205.6	10.956
3.530	-208.2	11.000
3.545	-210.8	11.044
3.560	-213.3	11.087
3.575	-215.6	11.126
3.590	-218.0	11.166
3.600	-219.4	11.190
3.630	-223.3	11.256
3.660	-226.9	11.317
3.700	-231.1	11.389
3.745	-235.1	11.457
3.800	-239.4	11.530
3.845	-242.4	11.582
3.900	-245.7	11.638
3.960	-248.8	11.691
4.000	-250.6	11.722
4.050	-252.8	11.760
4.100	-254.8	11.794
4.150	-256.7	11.827
4.200	-258.3	11.855
4.250	-259.9	11.882
4.300	-261.4	11.908
4.350	-262.8	11.933

TABELA 65 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de ácido glutâmico em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 64.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.000	3.614		2.580E-01	2.671E-01
0.200	3.654		2.351E-01	2.421E-01
0.400	3.698		2.116E-01	2.171E-01
0.600	3.748		1.880E-01	1.921E-01
0.800	3.804		1.641E-01	1.671E-01
1.000	3.868		1.406E-01	1.420E-01
1.100	3.905		1.281E-01	1.295E-01
1.200	3.944		1.161E-01	1.170E-01
1.300	3.987		1.041E-01	1.045E-01
1.400	4.035		9.194E-02	9.200E-02
1.501	4.086		8.015E-02	7.937E-02
1.600	4.143		6.815E-02	6.698E-02
1.700	4.208		5.623E-02	5.447E-02
1.800	4.281		4.435E-02	4.196E-02
1.900	4.362		3.273E-02	2.945E-02
2.000	4.453		2.132E-02	1.694E-02
2.101	4.558		9.875E-03	4.305E-03
2.201	4.678		-1.609E-03	-8.205E-03
2.245	4.735		-6.632E-03	-1.371E-02
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.13541				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999974				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.445	5.062		2.685E-06	2.931E-06
2.501	5.183		2.398E-06	2.385E-06
2.530	5.257		2.182E-06	2.102E-06
2.560	5.345		1.918E-06	1.809E-06
2.590	5.444		1.633E-06	1.516E-06
2.615	5.542		1.375E-06	1.273E-06
2.645	5.693		1.034E-06	9.800E-07
2.675	5.897		6.835E-07	6.874E-07
2.700	6.164		3.859E-07	4.436E-07
2.730	6.873		7.244E-08	1.509E-07
2.745	7.801		-4.993E-08	4.635E-09
2.760	8.288		-1.762E-07	-1.417E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.994549				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.74548				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 9.75376E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.375	10.500		1.538E-11	1.527E-11
3.401	10.584		1.175E-11	1.189E-11
3.430	10.676		8.089E-12	8.113E-12
3.460	10.774		4.278E-12	4.209E-12
3.490	10.877		2.736E-13	3.050E-13
3.500	10.910		-1.058E-12	-9.962E-13
3.515	10.956		-2.875E-12	-2.948E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999919				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 3.49235				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.30124E-10				

TABELA 66 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 ml de solução contendo 0,01181 g de ácido glutâmico em uréia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1251M. $I = 0,10$ M; $E_{Oa}^1 = 175,8$ mV; $j_H = -9.356,2$ mV/M; $j_{OH} = 448,2$ mV/M; $K_w = 10,70 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/mV	pH
0.000	223.1	3.724
0.200	220.1	3.776
0.400	216.7	3.834
0.600	212.7	3.902
0.800	208.1	3.980
1.000	202.5	4.075
1.100	199.3	4.130
1.200	195.7	4.191
1.300	191.7	4.258
1.360	189.1	4.302
1.400	187.1	4.336
1.460	184.2	4.385
1.500	182.0	4.422
1.560	178.6	4.480
1.600	176.2	4.520
1.660	172.4	4.584
1.700	169.6	4.632
1.760	165.3	4.704
1.800	162.1	4.758
1.845	158.3	4.822
1.900	153.3	4.906
1.945	148.7	4.984
2.000	142.7	5.085
2.045	136.9	5.182
2.100	128.5	5.324
2.145	119.8	5.471
2.200	105.2	5.717
2.230	93.1	5.921
2.260	74.1	6.242
2.290	24.7	7.077
2.316	-43.4	8.228
2.345	-68.6	8.653
2.400	-91.0	9.031
2.445	-102.4	9.223
2.500	-113.1	9.403
2.545	-120.4	9.526
2.600	-128.4	9.661
2.645	-134.6	9.765
2.700	-141.8	9.886
2.745	-147.6	9.984
2.800	-154.9	10.106
2.845	-161.1	10.211
2.900	-169.2	10.347
2.930	-174.0	10.428
2.960	-179.1	10.514
3.000	-186.4	10.637
3.030	-192.1	10.733
3.060	-197.9	10.831
3.090	-203.7	10.929
3.115	-208.3	11.007
3.145	-213.5	11.095

Continuação da Tabela 66.

3.200	-221.7	11.234
3.245	-227.2	11.328
3.300	-232.9	11.425
3.350	-237.2	11.498
3.400	-241.0	11.563
3.445	-243.9	11.612
3.500	-247.1	11.667
3.600	-252.0	11.751
3.700	-256.1	11.822
3.800	-259.6	11.883
3.900	-262.6	11.935
4.000	-265.2	11.980
4.200	-269.7	12.058
4.500	-274.9	12.150

TABELA 67 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de ácido glutâmico em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 66.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.000	3.724		1.988E-01	2.094E-01
0.200	3.776		1.758E-01	1.844E-01
0.400	3.834		1.528E-01	1.594E-01
0.600	3.902		1.292E-01	1.344E-01
0.800	3.980		1.060E-01	1.093E-01
1.000	4.075		8.244E-02	8.432E-02
1.100	4.130		7.089E-02	7.181E-02
1.200	4.191		5.927E-02	5.930E-02
1.300	4.258		4.783E-02	4.679E-02
1.360	4.302		4.109E-02	3.928E-02
1.400	4.336		3.623E-02	3.428E-02
1.460	4.385		2.965E-02	2.677E-02
1.500	4.422		2.497E-02	2.177E-02
1.560	4.480		1.821E-02	1.426E-02
1.600	4.520		1.375E-02	9.257E-03
1.660	4.584		7.115E-03	1.751E-03
1.700	4.632		2.523E-03	-3.253E-03
1.760	4.704		-4.111E-03	-1.076E-02
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.674				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999977				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.000	5.085		2.682E-06	2.845E-06
2.045	5.182		2.438E-06	2.420E-06
2.100	5.324		2.020E-06	1.901E-06
2.145	5.471		1.593E-06	1.476E-06
2.200	5.717		1.009E-06	9.561E-07
2.230	5.921		6.658E-07	6.727E-07
2.260	6.242		3.338E-07	3.893E-07
2.290	7.077		3.998E-08	1.059E-07
2.316	8.228		-1.563E-07	-1.397E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.996273				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.30121				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 9.44592E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.700	9.886		5.014E-11	4.999E-11
2.745	9.984		4.416E-11	4.406E-11
2.800	10.106		3.676E-11	3.680E-11
2.845	10.211		3.079E-11	3.087E-11
2.900	10.347		2.355E-11	2.362E-11
2.930	10.428		1.957E-11	1.966E-11
2.960	10.514		1.560E-11	1.571E-11
3.000	10.637		1.031E-11	1.043E-11
3.030	10.733		6.422E-12	6.479E-12
3.060	10.831		2.563E-12	2.524E-12
3.090	10.929		-1.333E-12	-1.432E-12
3.115	11.007		-4.543E-12	-4.728E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999983				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 3.07914				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.31849E-10				

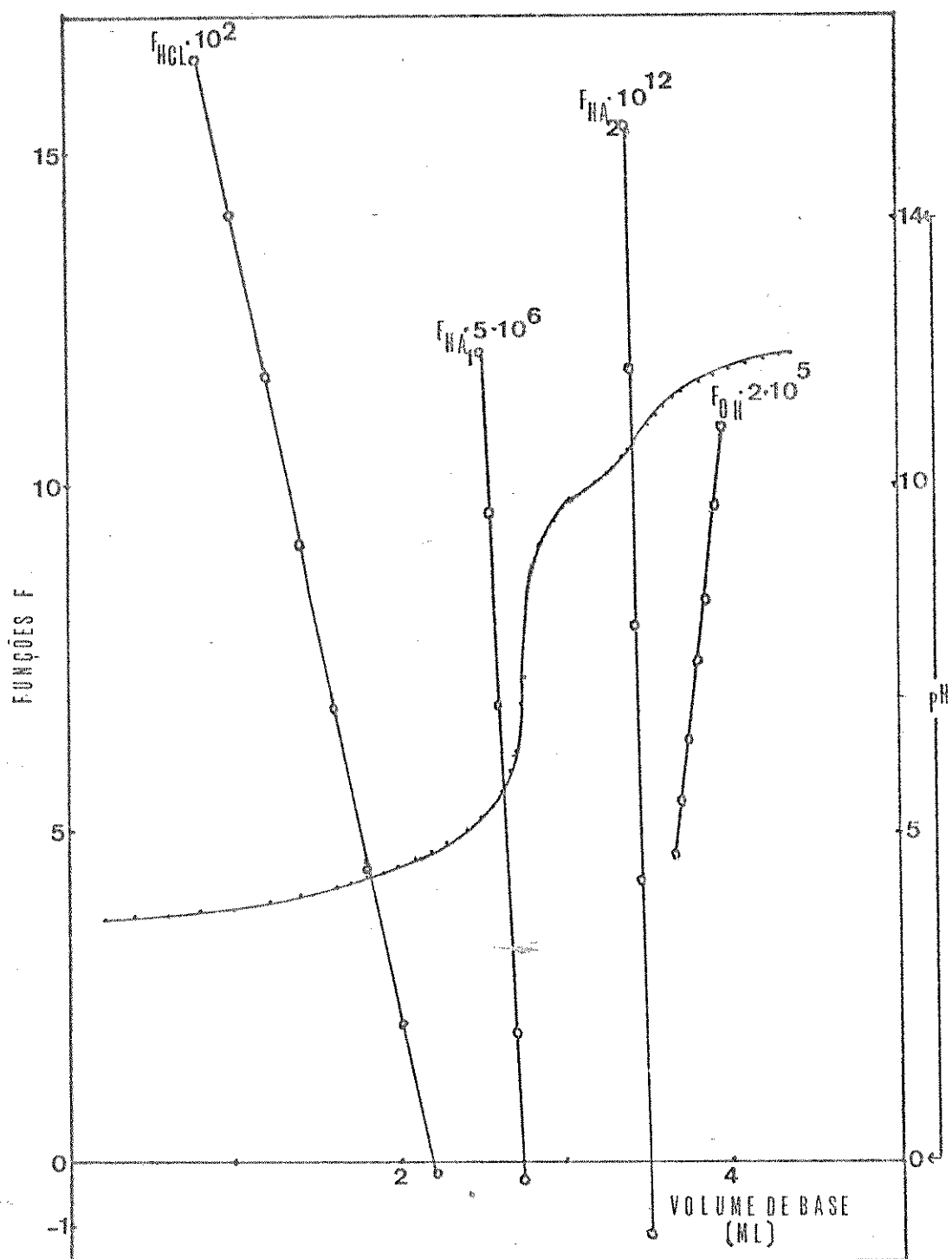


FIGURA 19 - Curva linearizada de titulação de 30,00 mL de solução contendo 0,01181 g de ácido glutâmico em uréia 8,0 M e na presença de HCl, com NaOH 0,1251 M. $I = 0,10$ M.

TABELA 68 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,01181 g de ácido glutâmico e 0,00416 g de histidina em uréia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1251 M. $I = 0,10M$; $E_{0a}^I = 175,8 \text{ mV}$; $j_H = -8.847,8 \text{ mV/M}$; $j_{OH} = 463,0 \text{ mV/M}$; $K_w = 10,80 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	228.3	3.630
0.250	226.5	3.660
0.500	223.1	3.718
0.750	219.3	3.783
1.000	214.7	3.862
1.200	210.3	3.937
1.400	205.1	4.025
1.600	198.7	4.134
1.700	194.9	4.198
1.800	190.8	4.267
1.900	186.0	4.349
2.000	180.7	4.438
2.100	174.6	4.541
2.160	170.6	4.609
2.201	167.7	4.657
2.260	163.1	4.735
2.300	159.8	4.791
2.360	154.5	4.880
2.400	150.6	4.945
2.460	144.1	5.055
2.500	139.3	5.136
2.540	133.9	5.227
2.600	124.3	5.389
2.640	116.4	5.522
2.700	101.6	5.771
2.760	82.5	6.094
2.781	75.1	6.218
2.800	67.5	6.347
2.821	58.7	6.495
2.840	49.5	6.650
2.860	37.8	6.848
2.880	23.5	7.089
2.900	1.8	7.456
2.920	-26.5	7.934
2.940	-47.1	8.282
2.960	-60.1	8.502
2.980	-69.3	8.657
3.000	-76.4	8.777
3.020	-82.2	8.874
3.040	-87.4	8.962
3.062	-92.2	9.043
3.080	-95.7	9.102
3.100	-99.3	9.162
3.120	-102.8	9.221
3.140	-105.8	9.272
3.180	-111.8	9.373
3.220	-117.2	9.463
3.260	-122.3	9.549
3.300	-127.1	9.630
3.340	-131.8	9.709
3.380	-136.4	9.786
3.420	-141.0	9.863

Continuação da Tabela 68.

3.461	-145.7	9.942
3.501	-150.4	10.021
3.540	-155.2	10.102
3.580	-160.3	10.188
3.620	-165.8	10.280
3.660	-171.7	10.380
3.701	-178.1	10.488
3.740	-185.0	10.604
3.781	-192.4	10.729
3.820	-199.7	10.852
3.860	-206.9	10.974
3.900	-213.4	11.084
3.940	-219.1	11.181
3.981	-224.1	11.266
4.020	-228.3	11.337
4.060	-232.1	11.402
4.100	-235.4	11.458
4.125	-237.3	11.490
4.150	-239.0	11.519
4.200	-242.2	11.574

TABELA 69 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de ácido glutâmico e histidina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 68.

PARA ACIDO HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.630		2.491E-01	2.578E-01
0.250	3.660		2.318E-01	2.391E-01
0.500	3.718		2.020E-01	2.078E-01
0.750	3.783		1.731E-01	1.765E-01
1.000	3.862		1.432E-01	1.452E-01
1.200	3.937		1.190E-01	1.202E-01
1.400	4.025		9.496E-02	9.520E-02
1.600	4.134		7.085E-02	7.018E-02
1.700	4.198		5.880E-02	5.767E-02
1.800	4.267		4.734E-02	4.516E-02
1.900	4.349		3.558E-02	3.265E-02
2.000	4.438		2.426E-02	2.014E-02
2.100	4.541		1.288E-02	7.635E-03
2.160	4.609		6.157E-03	1.286E-04
2.201	4.657		1.578E-03	-5.000E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 2.16103				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999973				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.500	5.136		2.438E-06	2.505E-06
2.540	5.227		2.201E-06	2.171E-06
2.600	5.389		1.736E-06	1.671E-06
2.640	5.522		1.369E-06	1.337E-06
2.700	5.771		8.045E-07	8.366E-07
2.760	6.094		2.951E-07	3.361E-07
2.781	6.218		1.436E-07	1.609E-07
2.800	6.347		3.558E-09	2.461E-09
2.821	6.495		-1.433E-07	-1.727E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99906				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.8003				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 8.34126E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.880	7.089		6.209E-09	6.154E-09
2.900	7.456		2.687E-09	2.704E-09
2.920	7.934		-8.760E-10	-7.454E-10
2.980	8.282		-4.103E-09	-4.195E-09
2.980	8.282		-9.99756E-09	
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999756				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.91568				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.72495E-07				
PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.580	10.188		3.999E-11	3.963E-11
3.620	10.280		3.327E-11	3.324E-11
3.660	10.380		2.667E-11	2.686E-11
3.701	10.488		2.018E-11	2.032E-11
3.740	10.604		1.376E-11	1.410E-11
3.781	10.729		7.424E-12	7.553E-12
3.820	10.852		1.383E-12	1.330E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999871				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.82834				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.59565E-10				

TABELA 70 - Dados da titulação potenciométrica de 30,00 mL de solução contendo 0,01181 g de ácido glutâmico e 0,00416 g de histidina em urêia 8,0 M na presença de HCl, com NaOH 0,1251 M; $I = 0,10M$; $E_{Oa}^I = 175,8 \text{ mV}$; $j_H = -8.847,8 \text{ mV/M}$; $j_{OH} = 463,0 \text{ mV/M}$; $K_W = 10,80 \times 10^{-14}$.

VOLUME	E/MV	pH
0.100	221.6	3.752
0.200	220.1	3.777
0.300	218.4	3.806
0.400	216.7	3.835
0.500	214.8	3.867
0.600	212.8	3.901
0.700	210.5	3.940
0.801	208.1	3.981
0.901	205.4	4.027
1.000	202.5	4.076
1.100	199.3	4.130
1.200	195.7	4.191
1.300	191.7	4.259
1.400	187.2	4.335
1.500	182.0	4.423
1.600	176.2	4.520
1.700	169.6	4.632
1.760	165.2	4.706
1.800	162.1	4.758
1.840	158.7	4.815
1.900	153.3	4.906
1.960	147.3	5.007
2.000	142.9	5.081
2.060	135.3	5.209
2.100	129.4	5.309
2.140	122.5	5.425
2.200	109.9	5.637
2.260	93.3	5.917
2.281	86.5	6.032
2.300	80.0	6.142
2.320	72.5	6.268
2.340	64.6	6.402
2.360	55.8	6.550
2.390	40.5	6.808
2.400	34.2	6.915
2.420	18.3	7.183
2.440	-5.6	7.587
2.460	-32.9	8.048
2.480	-50.5	8.345
2.500	-61.6	8.533
2.520	-70.2	8.678
2.540	-77.1	8.794
2.560	-82.7	8.889
2.580	-87.6	8.971
2.600	-91.7	9.040
2.620	-95.6	9.106
2.640	-99.3	9.168
2.660	-102.7	9.225
2.682	-106.1	9.283
2.700	-108.6	9.325
2.760	-116.7	9.461
2.800	-121.6	9.543

Continuação da Tabela 70.

2.860	-128.7	9.662
2.900	-133.2	9.738
2.960	-139.9	9.851
3.000	-144.4	9.926
3.060	-151.5	10.045
3.100	-156.2	10.124
3.140	-161.2	10.209
3.200	-169.5	10.348
3.240	-175.7	10.453
3.300	-185.8	10.623
3.340	-193.2	10.748
3.360	-197.0	10.812
3.380	-200.8	10.876
3.400	-204.4	10.937
3.420	-208.0	10.998
3.440	-211.3	11.054
3.460	-214.6	11.110
3.480	-217.6	11.161
3.500	-220.4	11.208
3.540	-225.3	11.291
3.600	-231.6	11.398
3.650	-236.0	11.473
3.700	-239.8	11.538
3.750	-243.0	11.592
3.800	-246.0	11.644
3.850	-248.6	11.688
3.900	-250.9	11.727
3.950	-253.1	11.765
4.000	-255.0	11.798
4.050	-256.8	11.829
4.100	-258.5	11.858
4.200	-261.6	11.911

TABELA 71 - Resultados da linearização da curva de titulação potenciométrica de ácido glutâmico e histidina em uréia, com NaOH. Valores relacionados aos dados da Tabela 70.

FUNÇÕES DE GRAD MODIFICADAS				
PARA HCL				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
0.100	3.752		1.857E-01	1.934E-01
0.200	3.777		1.748E-01	1.809E-01
0.300	3.806		1.630E-01	1.684E-01
0.400	3.835		1.519E-01	1.559E-01
0.500	3.867		1.402E-01	1.434E-01
0.600	3.901		1.289E-01	1.309E-01
0.700	3.940		1.167E-01	1.184E-01
0.801	3.981		1.051E-01	1.057E-01
0.901	4.027		9.314E-02	9.321E-02
1.000	4.076		8.149E-02	8.082E-02
1.100	4.130		6.988E-02	6.831E-02
1.200	4.191		5.818E-02	5.580E-02
1.300	4.259		4.661E-02	4.329E-02
1.400	4.335		3.510E-02	3.078E-02
1.500	4.423		2.339E-02	1.827E-02
1.600	4.520		1.189E-02	5.761E-03
1.700	4.632		3.063E-04	-6.749E-03
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= 1.64605				
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999989				
PARA ACIDO HA1				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.060	5.209		2.497E-06	2.519E-06
2.100	5.309		2.162E-06	2.134E-06
2.140	5.425		1.776E-06	1.749E-06
2.200	5.637		1.163E-06	1.172E-06
2.260	5.917		5.575E-07	5.942E-07
2.281	6.032		3.638E-07	3.921E-07
2.300	6.142		1.996E-07	2.092E-07
2.326	6.268		2.618E-08	1.674E-08
2.340	6.402		-1.368E-07	-1.757E-07
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999613				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= 2.32174				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 9.62389E-06				
PARA ACIDO HA2				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
2.390	6.808		1.074E-08	1.111E-08
2.400	6.915		9.469E-09	9.275E-09
2.420	7.183		6.015E-09	5.615E-09
2.440	7.587		1.897E-09	1.954E-09
2.460	8.048		-1.922E-09	-1.706E-09
2.480	8.345		-5.323E-09	-5.367E-09
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999062				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= 2.45068				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.83027E-07				
PARA ACIDO HA3				
VOLUME	pH	FG	REFINADA	FG AJUSTADA
3.140	10.209		3.948E-11	3.919E-11
3.200	10.348		2.956E-11	2.957E-11
3.240	10.453		2.292E-11	2.316E-11
3.300	10.623		1.336E-11	1.354E-11
3.340	10.748		7.001E-12	7.129E-12
3.360	10.812		3.839E-12	3.922E-12
3.380	10.876		6.838E-13	7.158E-13
3.400	10.937		-2.339E-12	-2.491E-12
3.420	10.998		-5.462E-12	-5.697E-12
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999925				
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= 3.38447				
CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.60323E-10				

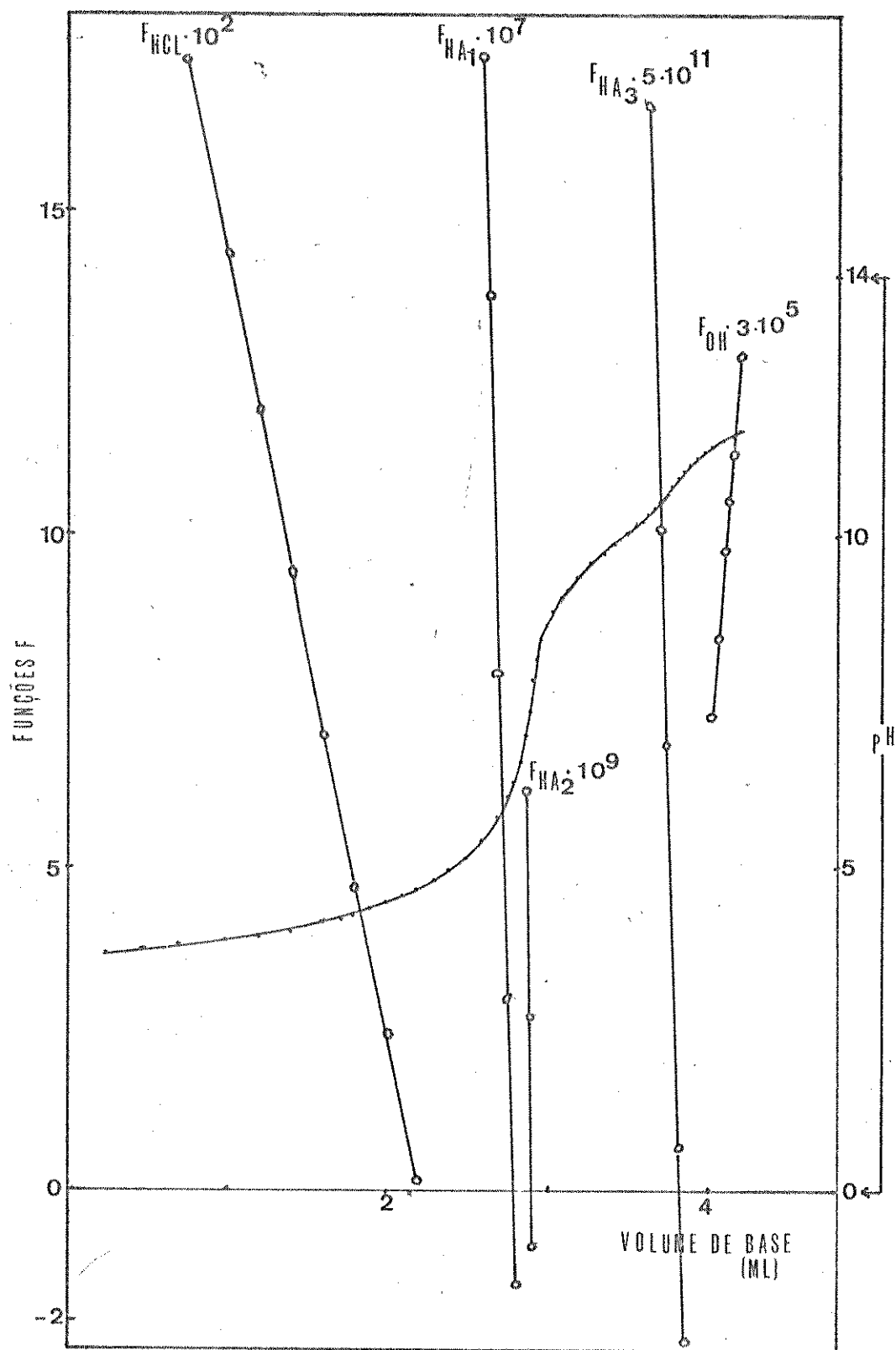


FIGURA 20 - Curva linearizada de titulação de 30,00 ml de solução contendo 0,00416 g de histidina e 0,01181 g de ácido glutâmico em uréia 8,0 M e na presença de HCl, com NaOH 0,1251 M.
 $I = 0,10$ M.

TABELA 72 - Valores obtidos para a estequiometria dos grupos tituláveis dos aminoácidos analisados/em uréia 8,0 M. I = 0,10 M.

	HISTIDINA	ÁCIDO GLUTÂMICO	HISTIDINA + ÁCIDO GLUTÂMICO
Carboxílicos			
HA ₁	-	-	-
HA ₂	-	0,96 ± 0,02	1,03 ± 0,04
Imidazol			
HA ₃ ⁺	0,98 ± 0,01	-	0,75 ± 0,06
Amino			
HA ₃ ⁺	1,07 ± 0,03	1,19 ± 0,04	2,31 ± 0,04

TABELA 73 - Valores obtidos de pK_a dos grupos tituláveis dos aminoácidos analisados em uréia 8,0 M . I = 0,10 M.

	HISTIDINA	ÁCIDO GLUTÂMICO	HISTIDINA + ÁCIDO GLUTÂMICO
Carboxílicos			
HA ₁	-	-	-
HA ₂	-	5,02 ± 0,01	5,05 ± 0,04
Imidazol			
HA ₃ ⁺	6,39 ± 0,01	-	6,75 ± 0,01
Amino			
HA ₄ ⁺	9,43 ± 0,01	9,89 ± 0,01	9,80 ± 0,00

7.3 - Discussão

Analisando os resultados das tabelas 72 e 73 observamos que:

1. Para a histidina foram encontrados cerca de dois grupos, um com pK_a $6,39 \pm 0,01$ e outro com pK_a $9,43 \pm 0,01$. Esse aminoácido possui um grupo carboxílico que só é titulado a valores de pH muito baixos, um grupo imidazol e um grupo amino. Portanto, esses resultados indicam a titulação do grupo imidazol e amino. Um exame comparativo entre os valores de pK_a encontrados e aqueles dados na tabela 59, conduz à observação de que em uréia o grupo imidazol e o grupo amino apresentam respectivamente valores de pK_a cerca de 0,4 e 0,3 unidades maiores.

2. Foram encontrados para o ácido glutâmico cerca de dois grupos, um com pK_a $5,02 \pm 0,01$ e outro com pK_a $9,89 \pm 0,01$. Esse aminoácido contém três grupos ionizáveis, 2 carboxílicos e um amino, sendo que um dos grupos carboxílicos só é titulado em regiões de pH muito baixos. Nesse caso, foram titulados um grupo carboxílico e um grupo amino. Comparando-se os valores de pK_a encontrados com aqueles dados na tabela 59, concluímos que o grupo carboxílico em uréia apresenta aproximadamente um pK_a 0,8 unidades maior, enquanto que o grupo amino apresenta uma diferença de cerca de 0,3 unidades.

3. Comparando-se os valores de pK_a dados na tabela 59 para os grupos amino do ácido glutâmico e da histidina, observamos que há uma diferença de aproximadamente 0,5 unidades, enquanto que os valores de pK_a desses grupos encontrados nesse trabalho apresentam uma diferença de 0,46 unidades. Essas diferenças são razoavelmente concordantes.

4. Os resultados obtidos na titulação da mistura dos dois aminoácidos indicam a titulação de cerca de 4 grupos. Esses grupos correspondem a um carboxílico e a um amino de ácido glutâmico e um imidazol e outro amino da histidina. O valor de pK_a encontrado para o grupo carboxílico do ácido glutâmico nessa mistura foi $5,05 \pm 0,04$, um resultado bastante concordante com aquele obtido na análise desse aminoácido isoladamente ($5,02 \pm 0,01$), enquanto que o valor de pK_a para os dois grupos aminos apresentou um valor intermediário entre os resultados encontrados nas titulações das soluções de histidina e ácido glu-

tâmico separadamente. Porém, o valor de pK_a para o grupo imidazol nesse caso foi 0,36 unidades maior que aquele encontrado na titulação da solução de histidina.

O fato dos valores de pK_a dos aminoácidos obtidos em uréia serem ligeiramente maiores que aqueles valores encontrados em água, é concordante com as conclusões de Levy⁽¹⁵²⁾. Este autor encontrou em uréia 7,0 M, um valor de pK_a do ácido acético 0,5 unidades maior que aquele obtido em água.

8. CONCLUSÃO

No primeiro trabalho desenvolvido no nosso laboratório referente ao método de linearização de curvas de titulação potenciométrica, foi sugerido que esse método poderia ser bastante promissor se aplicado ao estudo de titulações de proteínas, tanto sob o ponto de vista analítico quanto sob o ponto de vista de estudos de interações e estruturas dessas macromoléculas (38). Godinho e Hora Alves num estudo posterior, propuseram como perspectiva nova, o emprego desse método na titulação de proteínas em soluções concentradas de uréia⁽⁵⁶⁾.

Nesse trabalho de tese prosseguimos os estudos feitos pelos referidos autores, aplicando o método de linearização à titulação de proteínas nativas e desnaturadas com o intuito de observar possíveis mudanças estruturais das proteínas em soluções concentradas de uréia.

Os resultados encontrados mostram que o método se constitui num excelente meio de pesquisa a respeito das variações interativas e estruturais sofridas por proteínas quando submetidas a diferentes condições.

As determinações da estequiometria dos grupos tituláveis apresentaram-se mais concordantes com o número de moles dos grupos dados pela sequência de aminoácidos no caso das proteínas analisadas em soluções de uréia, indicando que o método é útil na investigação da influência de desnaturantes sobre alguns grupos localizados em regiões hidrofóbicas das proteínas.

Uma grande vantagem é a possibilidade de caracterização de dois tipos de grupos carboxílicos que possuem diferentes valores de pK_a , o que não é possível por outros métodos potenciométricos que identificam apenas um mesmo tipo de grupo carboxílico com um mesmo valor de pK_a . Para todas as proteínas analisadas, identificamos dois tipos de grupos carboxílicos com diferentes valores de pK_a . Contudo, a separação desses grupos não correspondeu em nenhum caso analisado aos resíduos de aspártico, glutâmico ou α -COOH, indicados pela sequência de aminoácidos das proteínas. Para as três proteínas estudadas, o valor

do número de moles do ácido HA_1 por mol de proteína encontrado foi maior que o esperado, baseando-se na estequiometria de resíduos de ácido aspártico ou α -carboxílicos, enquanto que o número de moles do ácido HA_2 por mol de proteína foi sempre menor que aquele esperado tomando-se como base o número de resíduos de ácido glutâmico. Isso poderia ser atribuído a erros do método, uma vez que uma determinação incorreta do volume de equivalência do ácido forte teria uma influência direta e mais acentuada sobre o ácido HA_1 . No entanto, os resultados obtidos no estudo dos aminoácidos é perfeitamente concordante com os valores esperados, descartando essa possibilidade. No caso das proteínas, é possível que os resultados sejam resultantes da titulação de grupos carboxílicos com pK_a menores que aqueles normalmente esperados, devido a interações locais. Apenas para a mioglobina é que o número total de moles de grupos carboxílicos titulados por mol de proteína não correspondeu ao número total desses grupos indicados pela sequência de aminoácidos. Porém, no caso particular dessa proteína, isso pode ser explicado pela presença de grupos imidazóis anormais, fato amplamente conhecido e comentado na literatura.

Apesar de não ter sido possível a caracterização individual de grupos fenólicos, observamos que com a desnaturação e o conseqüente desenrolamento das proteínas, esses grupos normalmente situados em regiões hidrofóbicas tornaram-se acessíveis ao solvente sendo então titulados juntamente com grupos aminos. Desse modo, o método é capaz de predizer se um determinado tipo de grupo encontra-se localizado ou não na superfície da molécula de proteína.

Resultados bastante significativos foram aqueles obtidos para o ovalbumina em solução de uréia. Essa proteína contém uma grande variedade de grupos hidrofóbicos e comparando-se os resultados com aqueles encontrados para a proteína nativa ⁽³⁸⁾, observamos que a uréia tem influência sobre esses grupos, tornando-os passíveis à titulação. No trabalho de Godinho e Aleixo foram titulados uma grande parte dos grupos carboxílicos e apenas cerca da metade de resíduos de histidina e uma quantidade mínima de grupos aminos ⁽³⁸⁾. Nesse nosso trabalho é possível que tenham sido titulados todos os grupos carboxílicos, os grupos imidazóis juntamente com alguns aminos e grupos fenólicos

com grupos aminos. O que é surpreendente, é a comprovação do desenrolamento da proteína possibilitando a titulação de grupos fenólicos reconhecidamente hidrofóbicos. Os elevados valores para o número de moles de imidazóis e aminos encontrados na titulação dessa proteína são provavelmente devido a variações estruturais e não a erros do método, pois o estudo dos aminoácidos apresentou resultados concordantes com aqueles esperados para a titulação desses grupos.

Para a insulina, não verificamos grandes diferenças nos números totais de moles dos grupos titulados por mol de proteína encontrados no estado nativo e desnaturado, talvez por ter uma estrutura relativamente simples não ocorrendo grandes variações estruturais em uréia.

No entanto, para a mioglobina parece não ter havido uma completa desnaturação, o que não invalida as conclusões a respeito da influência da uréia sobre grupos hidrofóbicos dessa proteína, sobretudo alguns aminos. Apesar desses grupos terem sido titulados apenas parcialmente tanto para a proteína nativa quanto desnaturada, nesse último caso um número maior desses grupos tornou-se acessível ao solvente.

Como perspectiva para trabalhos futuros, acreditamos que a aplicação do método de linearização de curvas de titulação potenciométrica ao estudo de outras proteínas mais complexas contendo muitos grupos hidrofóbicos possa fornecer importantes informações sobre seus comportamentos no estado nativo e desnaturado. Sugerimos que nesses trabalhos um estudo mais detalhado seja dirigido ao fato da existência de impurezas tituláveis em soluções de uréia. Talvez a maior fonte de erros nesse estudo possa ser atribuída a presença dessas impurezas, apesar de terem sido feitas as correções de volumes de titulante gastos em suas titulações.

Analisando e comparando os resultados encontrados nesse trabalho e naqueles que também aplicam o método de linearização desenvolvido no nosso laboratório^(38,56), concluímos que esse método após aprimoramentos advindos de mais resultados experimentais, poderá se constituir num meio bastante prático e simples para a caracterização e determinação de grupos tituláveis de aminoácidos, peptídeos e proteínas.

9. APÊNDICE

Listagem do Programa PROTE MODIFICADO

```

1 PRINT TIMES
5 REM CALCULOS DE KA E VEQ SIMULTANEOS-FUNCOES DE GRAN
6 REM MODIFICADAS-LINEARIZACAO DE CURVAS DE TITULACAO
7 REM POTENCIOMETRICA
10 DIM V1(120),P(120),H(120),H1(120),V2(120),F(120),V3(120),A1(120)
11 DIM A2(120),A3(120),Z(120),Z1(120),Z2(120),Z3(120),Z4(120)
12 DIM F3(120),F4(120),F5(120),F6(120),F7(120),H2(120),F8(120),A4(120)
13 DIM Z5(120),A5(120),T(120),T1(120),T2(120),T3(120),F1(120)
14 DIM F2(120),T4(120),Z6(120),F9(120)
15 DIM D4(120),E1(120)
25 READ V,B,U,N,K2,K4,K6,K8,D2,M1
27 READ L1,L2
30 IF M1<=0.1 GOTO 90
33 READ E2,E3,W1,E4,E5,E6
35 FOR I=1 TO N
38 READ V1(I),E1(I)
39 LET H0=(LOG(1+((U*V)/((V+V1(I))*0.23)))/LOG(10))
40 LET H3=((E1(I)-E2)/59.16)-(H0)
42 IF H3>=-4 GOTO 50
45 LET H3=((E1(I)-E3)/59.16)-(H0)
47 LET E2=E3
48 LET W=W1/(1+((U*V)/((V+V1(I))*0.23)))
50 LET H4=(W*10L6)/10EH3
52 H5=((E1(I)-E2-E4*10EH3-E5*H4)/59.16)-(H0)
54 IF ABS(H5-H3)<=0.0001 GOTO 60
56 LET H3=H5
58 GOTO 50
60 LET H2(I)=(10EH5)*0.001
62 LET H1(I)=(H2(I)-W/H2(I))
64 LET P(I)=-LOG(H2(I))/LOG(10)
66 LET V2(I)=(V+V1(I))
68 NEXT I
70 IF E4=0 GOTO 140
72 PRINT
74 PRINT"      VOLUME      E/KV      pH"
78 AS="  ##.###      ###.##      ##.###"
80 PRINT
82 FOR I=1 TO N
84 PRINT USING AS;V1(I),E1(I),F(I)
86 NEXT I
88 GOTO 140
90 FOR I=1 TO N
95 READ V1(I),P(I)
100 LET H(I)=10L(-P(I))
110 LET H2(I) = H(I)/0.83
115 LET H1(I)=(H(I)/0.83-1E-14/(H(I)*0.755))
120 LET V2(I)=(V+V1(I))
125 NEXT I
140 FOR I=1 TO (L2+1)
150 LET F(I)=H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23)
155 LET F2(I)=F(I)
160 NEXT I
170 LET L=1
180 GOSUB 2000
190 LET K=X1/Y1
200 LET K1=Y+B*X
205 LET K1=K1/B
210 PRINT"VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL="K1
215 IF K2=0 GOTO 395
220 LET C=K1
230 GOSUB 2350
240 LET K9=K1
250 FOR I=L TO (L+L2)
260 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K2+H2(I))/B
270 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K1)*H2(I)
280 NEXT I

```

```

290 GOSUB 2000
300 LET K2=X1/Y1
310 LET K3=Y-K2*X
315 LET K3=K3/(-K2)
320 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1="K3
325 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA1=";-K2
330 IF K4=0 GOTO 395
335 LET C=K3
340 GOSUB 2350
345 FOR I=L TO (L+L2)
350 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K4+H2(I))/B
355 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K3)*H2(I)
360 NEXT I
365 GOSUB 2000
370 LET K4=X1/Y1
375 LET K5=Y-K4*X
380 LET K5=K5/(-K4)
385 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2="K5
390 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2=";-K4
395 IF K6=0 GOTO 470
400 LET C=K5
405 GOSUB 2350
415 FOR I=L TO (L+L2)
420 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K6+H2(I))/B
425 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K5)*H2(I)
435 NEXT I
440 GOSUB 2000
445 LET K6=X1/Y1
450 LET K7=Y-K6*X
455 LET K7=K7/(-K6)
460 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3="K7
465 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3=";-K6
470 IF K8=0 GOTO 450
475 LET C=K7
480 GOSUB 2350
490 FOR I=L TO (L+L2)
500 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K8+H2(I))/B
510 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K7)*H2(I)
520 NEXT I
530 GOSUB 2000
540 LET K8=X1/Y1
550 LET D1=Y-K8*X
560 LET D1=D1/(-K8)
565 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4="D1
570 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4=";-K8
575 IF D2=0 GOTO 650
580 LET C=D1
585 GOSUB 2350
590 FOR I=L TO (L+L2)
595 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(D2+H2(I))/B
600 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-D1)*H2(I)
605 NEXT I
610 GOSUB 2000
615 LET D2=X1/Y1
620 LET D3=Y-D2*X
625 LET D3=D3/(-D2)
630 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5="D3
635 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA5=";-D2
650 PRINT "N1,N2,N3,N4,N5,N6,N7,N8,N9,N10,N11,N12"
660 INPUT N1,N2,N3,N4,N5,N6,N7,N8,N9,G6,G7,G9
670 LET E=0
680 LET S=Z7
690 FOR I=1 TO N
700 LET A1(I)=-K2/(-K2+H2(I))
710 LET A2(I)=-K4/(-K4+H2(I))
720 LET A3(I)=-K6/(-K6+H2(I))
730 LET A4(I)=-K8/(-K8+H2(I))
740 LET A5(I)=-D2/(-D2+H2(I))
745 NEXT I
750 REM CALCULO DA F.GRAN MOD.REFINADA PARA HCL
760 FOR I=N1 TO (N1+N2)
770 LET F(I)=H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23)
775 IF K2<>0 GOTO 795
780 LET Z(I)=0

```

```

785 LET Z1(I)=0
790 GOTO 820
795 LET Z(I)=B*(K3-K9)*A1(I)
800 IF K4<>0 GOTO 815
805 LET Z1(I)=0
810 GOTO 820
815 LET Z1(I)=B*(K5-K3)*A2(I)
820 IF K6<>0 GOTO 840
825 LET Z2(I)=0
830 LET Z3(I)=0
835 GOTO 854
840 LET Z2(I)=B*(K7-K5)*A3(I)
848 IF K8<>0 GOTO 854
850 LET Z3(I)=0
852 GOTO 854
854 LET Z3(I)=B*(D1-K7)*A4(I)
856 IF D2<>0 GOTO 861
858 LET Z4(I)=0
860 GOTO 862
861 LET Z6(I)=B*(D3-D1)*A5(I)
862 Z4(I)=F(I)-Z(I)-Z1(I)-Z2(I)-Z3(I)-Z6(I)
863 LET F8(I)=Z4(I)
865 LET Z5(I)=(Z4(I)+V1(I)*E)/B
870 NEXT I
874 LET J=N1
875 LET J1=N2
876 GOSUB 2200
878 LET B1=B
879 LET B1=X1/Y1
900 LET Z7=Y+B*X
905 LET Z7=Z7/B
920 LET K1=Z7
926 LET K9=Z7
930 REM CALCULO DA F GRAN MOD. REFINADA P/HA1
940 IF K2=0 GOTO 1140
955 FOR I=N3 TO (N3+N4)
960 F3=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K2+H2(I))/B
965 LET F4(I)=(V1(I)-Z7)*H2(I)
966 IF K4<>0 GOTO 970
967 LET F5(I)=0
968 GOTO 971
970 LET F5(I)=(K5-K3)*A2(I)*(-K2+H2(I))
971 IF K6<>0 GOTO 975
972 LET F6(I)=0
973 LET F7(I)=0
974 GOTO 985
975 LET F6(I)=(K7-K5)*A3(I)*(-K2+H2(I))
977 IF K8<>0 GOTO 980
978 LET F7(I)=0
979 GOTO 985
980 LET F7(I)=(D1-K7)*A4(I)*(-K2+H2(I))
985 IF D2<>0 GOTO 988
986 LET F9(I)=0
987 GOTO 989
988 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K2+H2(I))
989 F8(I)=F3(I)+F4(I)-F5(I)-F6(I)-F7(I)-F9(I)
990 LET T(I)=F8(I)
995 NEXT I
999 LET J=N3
1000 LET J1=N4
1003 GOSUB 2200
1005 LET K2=X1/Y1
1010 LET K3=Y-K2*X
1015 LET K3=K3/(-K2)
1016 LET R2=R
1045 REM CALCULO DA F GRAN REFINADA PARA HAZ
1050 IF K4=0 GOTO 1140
1065 FOR I=N5 TO (N5+N6)
1070 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K4+H2(I))/B
1075 LET F4(I)=(V1(I)-K3)*H2(I)
1076 IF K6<>0 GOTO 1080
1077 LET F6(I)=0
1078 LET F7(I)=0
1079 GOTO 1090
1080 LET F6(I)=(K7-K5)*A3(I)*(-K4+H2(I))

```

```

1081 IF K8<>0 GOTO 1085
1082 LET F7(I)=0
1083 GOTO 1090
1085 LET F7(I)=(D1-K7)*A4(I)*(-K4+H2(I))
1090 IF D2 <>0 GOTO 1093
1091 LET F9(I)=0
1092 GOTO 1094
1093 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K4+H2(I))
1094 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)-F6(I)-F7(I)-F9(I)
1100 LET T1(I)=F8(I)
1103 NEXT I
1107 LET J=N5
1108 LET J1=N6
1110 GOSUB 2200
1115 LET K4=X1/Y1
1120 LET K5=Y-K4*X
1125 LET K5=K5/(-K4)
1133 LET R3=R
1140 REM CALCULO DA F GRAN MOD.REFINADA P /E1H
1145 IF K6=0 GOTO 1141
1180 FOR I=N7 TO (N7+N8)
1185 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K6+H2(I))/B
1190 LET F4(I)=(V1(I)-K5)*H2(I)
1191 IF K8<>0 GOTO 1195
1192 LET F5(I)=0
1193 GOTO 1200
1195 LET F5(I)=(D1-K7)*A4(I)*(-K6+H2(I))
1200 IF D2<>0 GOTO 1203
1201 LET F9(I)=0
1202 GOTO 1204
1203 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K6+H2(I))
1204 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)-F5(I)-F9(I)
1210 LET T2(I)=F8(I)
1212 NEXT I
1216 LET J=N7
1217 LET J1=N8
1220 GOSUB 2200
1225 LET K6=X1/Y1
1230 LET K7=Y-K6*X
1235 LET K7=K7/(-K6)
1239 LET R4=R
1386 REM CALCULO DA F. DE GRAN MOD. REFINADA PARA B2H
1387 IF K8 =0 GOTO 1441
1388 FOR I=N9 TO (N9+G6)
1390 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K8+H2(I))/B
1392 LET F4(I)=(V1(I)-K7)*H2(I)
1393 IF D2<>0 GOTO 1396
1394 LET F9(I)=0
1395 GOTO 1397
1396 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K8+H2(I))
1397 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)-F9(I)
1398 LET T3(I)=F8(I)
1399 NEXT I
1400 LET J=N9
1401 LET J1=G6
1402 GOSUB 2200
1403 LET K8=X1/Y1
1404 LET D1=Y-K8*X
1405 LET D1=D1/(-K8)
1410 LET R5=R
1412 REM CALCULO DA F GRAN MOD.REFINADA P/HA5
1414 IF D2=0 GOTO 1441
1416 FOR I=G7 TO (G7+G8)
1418 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-D2+H2(I))/B
1420 LET F4(I)=(V1(I)-D1)*H2(I)
1422 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)
1424 LET T4(I)=F8(I)
1426 NEXT I
1428 LET J=G7
1430 LET J1=G8
1432 GOSUB 2200
1434 LET D2=X1/Y1
1436 LET D3=Y-D2*X
1438 LET D3=D3/(-D2)

```

```

1440 LET R6=R
1441 GOTO 1442
1442 LET E=E+1
1443 IF Z7-S>0.00001 GOTO 680
1445 IF S-Z7<=ABS(0.00001) GOTO 1452
1447 PRINT S,Z7
1450 GOTO 680
1451 GOTO 1525
1452 PRINT TAB(9);"FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS"
1453 PRINT
1454 PRINT TAB(18);" PARA HCL " FG REFINADA FG AJUSTADA"
1455 PRINT "VOLUME      pH      "
1457 A$="  ##.###      ##.###      ##.###     ##.###"
1458 PRINT
1459 FOR I=N1 TO (N1+N2)
1460 LET F8(I)=Z7*B-V1(I)*B
1461 PRINT USING A$;V1(I),P(I),Z4(I),F8(I)
1462 NEXT I
1463 PRINT
1464 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL="Z7
1465 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACAO="R1
1466 IF K2=0 GOTO 1542
1467 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA1"
1468 PRINT"VOLUME      pH      FG REFINADA FG AJUSTADA"
1469 A$="  ##.###      ##.###      ##.###     ##.###"
1470 PRINT
1471 FOR I=N3 TO (N3+N4)
1472 LET F8(I)=K3*(-K2)-V1(I)*(-K2)
1473 PRINT USING A$;V1(I),P(I),T1(I),F8(I)
1474 NEXT I
1475 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACAO="R2
1476 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1="K3
1478 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1=";-K2
1479 IF K4=0 GOTO 1493
1480 PRINT
1481 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA2"
1482 PRINT
1483 PRINT"VOLUME      pH      FG REFINADA FG AJUSTADA"
1484 A$="  ##.###      ##.###      ##.###     ##.###"
1485 PRINT
1486 FOR I=N5 TO (N5+N6)
1487 LET F8(I)=K5*(-K4)-V1(I)*(-K4)
1488 PRINT USING A$;V1(I),P(I),T1(I),F8(I)
1489 NEXT I
1490 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACAO="R3
1491 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2="K5
1492 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2=";-K4
1493 IF K6=0 GOTO 1542
1494 PRINT
1495 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA3"
1496 PRINT
1497 PRINT"VOLUME      pH      FG REFINADA FG AJUSTADA"
1498 A$="  ##.###      ##.###      ##.###     ##.###"
1499 PRINT
1500 FOR I=N7 TO (N7+N8)
1501 LET F8(I)=K7*(-K6)-V1(I)*(-K6)
1502 PRINT USING A$;V1(I),P(I),T2(I),F8(I)
1503 NEXT I
1504 PRINT"COEFICIENTE DE CORRELACAO="R4
1505 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3="K7
1506 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3=";-K6
1507 IF K8=0 GOTO 1542
1508 PRINT
1509 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA4"
1510 PRINT
1511 PRINT"VOLUME      pH      FG REFINADA FG AJUSTADA"
1512 A$="  ##.###      ##.###      ##.###     ##.###"
1513 PRINT
1514 FOR I=N9 TO (N9+N6)
1515 LET F8(I)=D1*(-K8)-V1(I)*(-K8)
1516 PRINT USING A$;V1(I),P(I),T3(I),F8(I)
1517 NEXT I
1518 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACAO="R5
1519 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4="D1

```



```

1520 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4=";-KB
1521 PRINT
1522 IF D2=0 GOTO 1542
1523 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA5"
1524 PRINT
1525 PRINT"VOLUME      pH      FG REFINADA      FC AJUSTADA"
1526 A4="  HH.HHH      HH.HHH      HH.HHHCCCC      FH.HHHCCCC"
1527 PRINT
1528 FOR I=G7 TO (G7+G8)
1529 LET F8(I)=D3*(-D2)-V1(I)*(-D2)
1530 PRINT USING A$;V1(I),P(I),T4(I),F8(I)
1531 NEXT I
1532 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACAO ="R6
1534 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5="D3
1536 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA5=";-D2
1538 PRINT
1539 PRINT"CONCENTRACAO DA BASE=";-B1
1540 PRINT
1542 PRINT "NO. DE INTERACOES="E
1544 FOR I=N7 TO (N7+N8)
1545 PRINT TIME$
1546 STOP
1548 NEXT I
1636 NEXT I
2000 LET Y=0
2060 LET X=0
2070 FOR I=L TO (L+L2)
2080 LET Y=Y+F2(I)
2090 LET X=X+V1(I)
2100 NEXT I
2110 LET X=X/(L2+1)
2120 LET Y=Y/(L2+1)
2130 LET X1=0
2140 LET Y1=0
2150 FOR I=L TO (L+L2)
2160 LET X1=X1+(V1(I)-X)*F2(I)
2170 LET Y1=Y1+(V1(I)-X)E2
2180 NEXT I
2190 RETURN
2200 LET Y=0
2210 LET X=0
2220 FOR I=J TO (J+J1)
2230 LET Y=Y+F8(I)
2240 LET X=X+V1(I)
2250 NEXT I
2260 LET X=X/(J1+1)
2270 LET Y=Y/(J1+1)
2280 LET X1=0
2290 LET Y1=0
2292 LET X2=0
2293 LET Y2=0
2294 LET Y3=0
2300 FOR I=J TO (J+J1)
2310 LET X1=X1+(V1(I)-X)*(F8(I)-Y)
2320 LET Y1=Y1+(V1(I)-X)E2
2321 LET X2=X2+(V1(I)-X)E2
2322 LET Y2=Y2+(F8(I)-Y)E2
2323 LET Y3=(V1(I)-X)*(F8(I)-Y)+Y3
2330 NEXT I
2331 LET X4=X2*Y2
2332 LET R=Y3/SQR(X4)
2340 RETURN
2345 REM SUBROUTINE QUE FAZ A SEGMENTACAO DA CURVA
2350 FOR I=1 TO N
2355 LET L=I+L1
2360 IF V1(I)>C GOTO 2370
2365 NEXT I
2366 PRINT"VOLUME DE EQUIVALENCIA MAIOR QUE VOL. DE TITULACAO"
2370 RETURN
2380 DATA 40,0.1159,8,100,1E-4,1E-6,1E-8,1E-10,0,1
2385 DATA 2,4
2390 DATA 166.1,166.1,9.07E-14,-8.4601,0.4155,0
2400 DATA 0.2,212.6,0.4,209.5,0.5,207.8,0.6,206.0,0.7,204.0,0.8,201.9
2401 DATA 0.901,199.6,1,197.3,1.1,194.8,1.2,192.1,1.3,189.1,1.4,185.8

```

2402 DATA 1.5,182.3,1.602,178.5,1.65,176.6,1.7,174.5,1.751,172.3
2403 DATA 1.8,170.1,1.85,167.9,1.9,165.1,1.95,162.8,2.160,2.05,157.1
2404 DATA 2.1,153.9,2.16,149.8,2.2,147.2,2.25,143.2,2.3,139.2,2.4,129.8
2405 DATA 2.45,124.7,2.5,119.3,2.55,113.2,2.6,106.5,2.645,100
2406 DATA 2.66,97.6,2.675,95.2,2.69,92.7,2.705,90.1,2.72,87.4
2407 DATA 2.76,79.7,2.815,67.4,2.86,56.5,2.946,31.6,2.975,21.9
2408 DATA 2.985,18.1,3.12,3.015,5.5,3.025,0.8,3.035,-4.3,3.045,-9.9
2409 DATA 3.055,-15.7,3.065,-22.3,3.075,-28.7,3.09,-38.5,3.101,-44.9
2410 DATA 3.115,-53.1,3.14,-65.3,3.155,-71.3,3.175,-78.3,3.185,-81.3
2411 DATA 3.2,-85.6,3.215,-89.7,3.225,-92.2,3.255,-99.1,3.3,-108.6
2412 DATA 3.33,-114.2,3.36,-119.4,3.4,-126.1,3.445,-133.3,3.48,-138.1
2413 DATA 3.52,-143.7,3.56,-149.1,3.6,-154.2,3.64,-159.3,3.68,-163.6
2414 DATA 3.7,-165.9,3.725,-168.7,3.75,-171.4 3.775,-174.3,3.8,-176.5
2415 DATA 3.825,-179.3,3.85,-181.5,3.875,-183.8 3.9,-186.2,3.925,-188.5
2416 DATA 3.95,-190.8,3.98,-193.5,4.001,-195.1,4.025,-197.4
2417 DATA 4.05,-199.6,4.101,-203.9,4.15,-207.3,4.175,-209.7
2418 DATA 4.202,-211.7,4.25,-215.4,4.3,-218.9,4.35,-222.4,4.4,-225.6
2419 DATA 4.45,-228.6,4.5,-231.5,4.55,-234.1 4.58,-235.6,4.6,-236.2
2420 DATA 4.65,-238.6,4.7,-240.8,4.75,-243.4,4.8,-245.4,4.85,-246.9
2421 DATA 4.9,-248.6,5,-251.9,5.1,-254.8,5.15,-256.2,5.2,-257.5
2422 DATA 5.25,-258.7,5.3,-259.8
2423 DATA 0.1,213.6,0.2,212.0,0.3,210.2,0.4,208.3,0.5,206.3,0.6,204.2,0.7,201.8
2424 DATA 0.75,200.6,0.8,199.2,0.855,197.8,0.9,196.7,0.95,195.2,1.005,193.5
3100 END

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STEINHARDT, J. BEICHOK, S., The Proteins, H.Neurath, ed., 1964, cap. 8, p. 139.
2. STEINHARDT, J. & ZAISER, E.M., Adv. Protein Chem., 10, 151 (1955).
3. CANNAN, K.R., Chem. Rev., 30, 395 (1942).
4. TANFORD, C., Adv. Protein Chem., 17, 69 (1962).
5. KEKWICK, R.A. & CANNAN, R.K., Biochem.J., 30, 235 (1936).
6. CANNAN, R.K. et al., Ann. New York Acad.Sci., XLI, 241 (1941).
7. CRAMMER, J.L. & NEUBERGER, A., Biochem.J., 37, 302 (1943).
8. HERMANS, J.Jr., Biochemistry, 1(2), 193 (1952).
9. ELLENBOGEN, E., J. Am. Chem. Soc., 74, 5198 (1952).
10. LINDERSTRØM-LANG, K., Compt.rend.trav.lab.Carlsberg Sér.chim., 15, 7 (1924).
11. TANFORD, C. & KIRKWOOD, J.G., J. Am. Chem. Soc., 79(20), 5333 (1957).
12. TANFORD, C. & ROXBY, R., Biochemistry, 11(11), 2192 (1972).
13. MARSHALL, R.C. & HANANIA, G.I.H., Anal.Chem., 47(9), 1609 (1975).
14. MARINI, M. & MARTIN, C.J., Anal.Letters, 13, (B2), 93 (1980).
15. TANFORD, C., J. Phys. Chem., 59, 788 (1955).
16. TANFORD, C., J. Am. Chem. Soc., 79, 5340 (1957).
17. TANFORD, C., J. Am. Chem. Soc., 83, 1628 (1961).
18. CANNAN, K.R. et al., J. Biol. Chem., 142, 803 (1942).
19. KENCHINGTON, A.W., Analytical Methods of Proteins Chemistry, P.Alexander & R.J. Bock, eds., Pergamon Press, N. York, 1968, cap.10, p.353.
20. KEKWICK, R.A. & CANNAN, R.K., J. Biochem., 30, 227 (1936).
21. RASPER, J. & KAUZMANN, W., J. Am. Chem. Soc., 84(10) 1771 (1962).
22. JESPERSEN, N.D. & JORDAN, J., Anal. Lett., 3(6) 323 (1970).
23. KATZ, S. & MILLER, J.E., Biochemistry, 10(19), 3569 (1971).

24. GODINHO, O.E.S. & ALEIXO, L.M., Anal. Biochem., 112, 323 (1981).
25. TANFORD, C. & EPSTEIN, J., J. Am. Chem. Soc., 76, 2163 (1954).
26. TANFORD, C. & EPSTEIN, J., J. Am. Chem. Soc., 76, 2170 (1954).
27. FREDERICQ, E., J. Polym. Sci., XII, 287 (1954).
28. GRUEN, L. et al., J. Am. Chem. Soc., 81, 3891 (1959).
29. GRUEN, L. et al., J. Biol. Chem., 234(8), 2050 (1959).
30. THEORELL, H. & EHRENBERG, A., Acta Chem. Scand., 5, 823 (1951).
31. BRESLOW, E. & GURD, F.R.N., J. Biol. Chem., 237(2), 371 (1962).
32. HARTZELL, C.R. et al., J. Biol. Chem., 243(4), 690 (1968).
33. HARTZELL, C.R. et al., J. Biol. Chem., 243(4), 697 (1968).
34. KATZ, S., et al. J. Biol. Chem., 248(13), 4840 (1973).
35. GODINHO, O.E.S., et al., Anal. Biochem., 123, 244 (1982).
36. KING, E.J., J. Am. Chem. Soc., 79, 6151 (1957).
37. RIGHETTI, P.G. et al., J. Chromat., 177, 219 (1979).
38. ALEIXO, L.M., Estudo Potenciométrico de Equilíbrio Ácido-base e de Formação de Complexos, Tese de doutoramento, UNICAMP, Campinas, 1980.
39. SEYMOUR, M.D. et al., Anal. Chem., 49(9), 1429 (1977).
40. GRAN, G., Acta Chem. Scand., 4, 559 (1950).
41. GRAN, G., Analyst (London), 77, 661 (1952).
42. SØRENSEN, P., Kem. Maanedsskr., 32, 73 (1951).
43. INGMAN, F. & STILL, E., Talanta, 13, 1431 (1966).
44. ROSSOTTI, F.J.C. & ROSSOTTI, H., J. Chem. Educ., 42(7), 375 (1965).
45. IVASKA, A. & WÄNNINEN, E., Anal. Lett., 6(11), 961 (1973).
46. HANSSON, I. & JAGNER, D., Anal. Chim. Acta., 65, 353 (1973).
47. MIDGLEY, D. & MCCALLUM, C., Talanta, 21, 723 (1974).
48. ROSSOTTI, F.J.C. & ROSSOTTI, H., J. Phys. Chem., 68(12) 3773 (1964).
49. IVASKA, A. & NAGYPAL, I., Talanta, 27, 721 (1980).
50. ANFALT, T. & JAGNER, D., Anal. Chim. Acta., 57, 165 (1971).
51. BARRY, D.M. & MEITES, L., Anal. Chim. Acta, 68, 435 (1974).
52. BARRY, D.M. et al., Anal. Chim. Acta, 69, 143 (1974).

53. JOHANSSON, A. & JOHANSSON, S., Analyst, 104,601 (1979).
54. ARENA, G. et al., Talanta, 26,1, (1979).
55. PIER, G.D. et al., Talanta, 30(2),81 (1983).
56. HORA-ALVES, J.P., Linearização da Curva de Titulação Potenciométrica de Proteínas. Aplicação à Lisozima, β -Lactoglobulina e Imuno-Globulina Humana, Tese de doutoramento, UNICAMP, Campinas, 1982.
57. BIEDERMAN, G. & SILLEN, L.G., Arkiv.Kemi, 5(40),425(1953).
58. ROSSOTTI, F.J.C. & ROSSOTTI, H., Acta Chem.Scand.,10, 957 (1956).
59. INGRI, N. et al., Acta Chem.Scand.,11,1035 (1957).
60. DUNSMORE, H.S. & SILLEN, L.G.,Acta Chem.Scand.,17,2657(1963).
61. FROHLIGER, J.O. et al., Anal.Chem.,40(10),1408 (1968).
62. JOHANSSON, A., Analyst, 95,535 (1970).
63. INGMAN, F. et al. Anal.Chim.Acta, 64,113(1973).
64. BRIGGS ; T.N. & STUEHR, J.E., Anal.Chem.,46(11),1517 (1974).
65. JOHANSSON, A., Talanta, 22,945 (1975).
66. IVASKA, A., Talanta, 22,995(1975).
67. McCALLUM, C. & MIDGLEY, D., Anal.Chim.Acta,78,171 (1975).
68. McCALLUM, C. & MIDGLEY, D., Anal. Chem.,48(8),1232 (1976).
69. PEHRSSON, L. et al., Talanta, 23,769 (1976).
70. PEHRSSON, L. et al., Talanta, 23,781 (1976).
71. TENCHEVA, J. et al., J. Electroanal.Chem., 68,65 (1976).
72. JOHANSSON, A. & JOHANSSON, S., Analyst,103(1225),305 (1978).
73. NOWOGROCKI, G. et al., Anal.Chim.Acta.,112, 185 (1979).
74. BOS, M., Anal.Chim.Acta,112,65 (1979).
75. CIAVATA, L., Arkiv. Kemi, 20,417 (1963).
76. MAY, P.M. et al., Talanta, 29,249 (1982).
77. KAUZMANN, W., Adv. Protein Chem.,XIV,1 (1959).
78. PAULING, L. & MIRSKY, A.E., Proc. Natl.Sci,U.S.,22,439(1936).
79. LASKOWSKI, M. & SCHERAGA, H.A.,J.Am.Chem.Soc.,83,266 (1961).

80. KLOTZ, I.M., & FRANZEN, J.S., J.Am.Chem.Soc., 84, 3461 (1962).
81. KLOTZ, I.M. & STRYKER, V.H., J.Am.Chem.Soc., 82, 5169 (1960).
82. WESTHEIMER, F.H. & BENFEY, O.T., J.Am.Chem.Soc., 78, 5309 (1956).
83. LEVY, M. & MAGOULAS, J.P., J.Am.Chem.Soc. 84, 1345 (1962).
84. FRANZEN, J.S. & FRANZEN, B.C., J.Phys.Chem., 68(12), 3898 (1964).
85. KRESHECK, G.C., J.Phys.Chem., 73(7), 2441 (1969).
86. TANFORD, C., J.Am.Chem.Soc., 84, 4240 (1962).
87. WETLAUFER, D.B. et al., J.Am.Chem.Soc., 86, 508 (1964).
88. NOZAKI, V. & TANFORD, C., J.Biol. Chem., 238(12), 4074 (1963).
89. DUBIN, P. & STRAUSS, U.P., J.Phys.Chem., 77(11), 1427 (1973).
90. SCHICK, M.J., J.Phys.Chem., 68(12), 3585 (1964).
91. BRUNING, W. & HOLTZER, A., J.Am.Chem.Soc., 83, 4865 (1961).
92. MUKERJEE, P. & RAY A., J.Phys.Chem., 67, 190 (1963).
93. MUKERJEE, P. & GHOSH, A.K., J.Phys.Chem., 67, 193 (1963).
94. ROBINSON, D.R. & JENCKS, W.P., J.Biol.Chem., 238, 1558 (1963).
95. ROBINSON, D.R. & JENCKS, W.P., J.Am.Chem.Soc., 87(11), 2462 (1965).
96. SIMPSON, R.B. & KAUFMANN, W., J.Am.Chem.Soc., 75(21), 5139 (1953).
97. WARREN, J.R. & GORDON, J.A., Biochim.Biophys.Acta, 229, 216 (1971).
98. PHILIP, P.R. et al., Can.J.Chem., 52, 1709 (1974).
99. SUBRAMANIAN, S. et al., J.Phys.Chem., 73(1), 266 (1969).
100. SUBRAMANIAN, S., et al., J.Phys.Chem., 75(6), 815 (1971).
101. ABU-HAMDIYYAH, M., J.Phys.Chem., 69(8), 2720 (1965).
102. HOLTZER, A. & EMERSON, M.F., J.Phys.Chem., 73(1), 26 (1969).
103. BARONE, G. et al., Gazz.Chim.Ital., 106, 567 (1976).
104. WARREN, J.R. & GORDON, J.A., J.Biol.Chem., 245(16), 4097 (1970).
105. TANFORD, C., J.Am.Chem.Soc., 86, 2050 (1964).
106. KRESHECK, G.C. & SCHERAGA, H.A., J.Phys.Chem., 69(5), 1704 (1965).

107. JAMES, D.W. et al., J. Phys. Chem., 80(12), 1346 (1976).
108. GORDON, J.A. & WARREN, J.R., J. Biol. Chem., 243(21), 5663 (1968).
109. FRANKS, F. & EAGLAND, D., Critical Rev. Biochem., 165(1975).
110. WHITNEY, P.L. & TANFORD, C., J. Biol. Chem., 237, PC, 1735 (1962).
111. ROSEMAN, M. & JENCKS, W.P., J. Am. Chem. Soc., 97(3), 469 (1975).
112. FINER, E.G. et al., J. Am. Chem. Soc., 94(13), 4424 (1972).
113. BARONE, G. et al., Can. J. Chem., 59, 1257 (1981).
114. CÉSARO, A. et al., Int. J. Peptide Protein Res., 20, 8 (1982).
115. SCOTT, R.A. & SCHERAGA, H.A., J. Am. Chem. Soc., 85, 3866 (1963).
116. SCHELLMANN, J. et al., J. Am. Chem. Soc., 75(21), 5152 (1953).
117. FRENSDORFF, H.K. et al., J. Am. Chem. Soc., 75(21), 5157 (1953).
118. BULL, H.B. & BREESE, K., Arch. Biochem. Biophys., 139, 93 (1970).
119. KUNTZ, D.I. & BRASSFIELD, T.S., Arch. Biochem. Biophys., 142, 660 (1971).
120. GORDON, J.A. & JENCKS, W.P., Biochemistry, 2(1), 47 (1963).
121. HOPKINS, G.F., Nature, 126, 328 (1930).
122. KRESHECK, G.C. & BENJAMIN, L., J. Phys. Chem., 68, 2476 (1964).
123. ALTMAN, R.L. & BENSON, S.W., J. Am. Chem. Soc., 82, 3852 (1960).
124. STEVEN, F.S. & TRISTAM, G.R., Biochem. J., 70, 179 (1958).
125. AHMAD, F. & SALABRUDDIN, A., Biochim. Biophys. Acta., 576, 333 (1979).
126. TANFORD, C. et al., J. Am. Chem. Soc., 89(4), 729 (1967).
127. ACAMPORA, G. & HERMANS, J. Jr., J. Am. Chem. Soc., 89(7), 1543 (1967).
128. SCHECHTER, A.N. & EPSTEIN, C.J., J. Mol. Biol., 35, 567 (1968).
129. HERSKOVITS, T.T. et al., J. Biol. Chem., 245(10), 2588 (1970).
130. HERSKOVITS, T.T. et al., J. Biol. Chem., 245(17), 4544 (1970).
131. BRUNORI, M. et al., J. Mol. Biol., 34, 497 (1968).
132. BRUNORI, M. et al., J. Mol. Biol., 63, 139 (1972).
133. SHEN, L.L. & HERMANS, J. Jr., Biochemistry, 11(10), 1836 (1972).

134. SHEN, L.L. & HERMANS, J.Jr., Biochemistry, 11(10), 1842(1972).
135. BEYCHOK, S. & STEINHARD, J., J. Am. Chem. Soc., 81, 5679(1959).
136. ANSON, M.L. & MIRSKY, A.E., J. Gen. Physiol., 17, 399(1933-1934).
137. PUETT, D., J. Biol. Chem., 248(13), 4623(1973).
138. LILLEY, T.H. & SCOTT, R.P., J. Chem. Soc. Faraday, 172, 184(1976).
139. SCHRIER, E.E. & SCHRIER, E.B., J. Phys. Chem., 71(6), 1851(1967).
140. NANDI, K.P. & ROBINSON, D.R., J. Am. Chem. Soc., 94(4), 1299 (1972).
141. ROBINSON, D.R. & JENCKS, W.P., J. Am. Chem. Soc., 87(11), 2470 (1965).
142. FRANK, H.S. & WEN, W.Y., Disc. Faraday Soc., 24, 133 (1957).
143. DRAEGERT, D.A. & WILLIAM, D., J. Chem. Phys., 48(1), 401 (1968).
144. KOLTHOFF, I.M. & SANDELL, E.B. - Textbook of Quantitative Inorganic Analysis, McMillan, N.York, 1967, p. 562.
145. WALKER, J. & HAMBLY, F.J., J. Chem. Soc., 67, 746(1895).
146. LEWIS, G.N. & BURROWS, G.J., J. Am. Chem. Soc., 34, 1515(1912).
147. BURROWS, G.J. & FAWSITT, C.E., J. Chem. Soc., 105, 609(1914).
148. WERNER, E.A., J. Chem. Soc., 113, 84 (1918).
149. WERNER, E.A., J. Chem. Soc., 117, 1078 (1920).
150. AZEVEDO, F.G., Aplicações Ebuliométricas, tese de doutoramento, UNICAMP, 1981.
151. SMITH, R.M. & MARTELL, A.E., Critical Stability Constants, Plenum Press, N. York, 1976, p. 1.
152. LEVY, M., Compt-rendu, Lab. Carlsberg, Sér. chim., 30(15), 291 (1958).
153. NISBET, A.D. et al., Eur. J. Biochem., 115, 335(1981).
154. McREYNOLDS et al., Nature, 273, 723 (1978).
155. TABORSKY, G., Adv. Protein Chem., 28, 34 (1974).
156. CECIL, R. & MCPHEE, J.R., Adv. Protein Chem., XIV, 343(1959).
157. FOTHERGILL, L.A. & FOTHERGIL, J.E., Eur. J. Biochem., 17, 532 (1970).
158. GOTTSCHALK, A. & GRAHAM, R.B., The Proteins, H. Neurath, ed., 1966, v. IV, p. 113.

159. PERLMANN, G.E., Adv. Protein Chem., X, 11 (1955).
160. ANSARI, A.A. et al., Biochem. J., 126, 447 (1972).
161. WISEMAN, R.L. et al., Biochem. J., 127, 775 (1972).
162. FOTHERGIL, L.A. & FOTHERGIL, J.E., Biochem. J., 116, 555 (1970).
163. ATASSI, M.Z. & ROSENTHAL, A.F., Biochem. J., 111, 593 (1969).
164. NIU, C.I. & FRAENKEL-CONRAT, H., J. Am. Chem. Soc., 77, 5882 (1955).
165. BULL, H.B. & BREESE, K., Arch. Biochem. Biophys., 137, 299 (1970).
166. GERKEN, T.A. et al., J. Biol. Chem., 257(6), 2894 (1982).
167. SELKURT, E.E. et al., Fisiologia, Guanabara Koogan, 1976, cap. 32, p. 641.
168. GURD, F.R.N. & WILCOX, P.E., Adv. Protein Chem. XI, 380 (1956).
169. MARCKER, K., Acta Chem. Scand., 14, 194 (1960).
170. FREDERICQ, E., Arch. Biochem. Biophys., 65, 218 (1956).
171. MARCKER, K., Acta Chem. Scand., 14, 2071 (1960).
172. CECIL, R. & MCPHEE, J.R., Adv. Protein Chem., XIV, 350 (1959).
173. MARCKER, K. & GRAAE, J., Acta Chem. Scand., 15, 565 (1961).
174. BEZRUKOV, M.G. et al., Russian Chem. Rev., 51(4), 397 (1982).
175. GURD, F.R.N. & WILCOX, P.E., Adv. Protein Chem., 11, 311 (1954).
176. TANFORD, C., J. Am. Chem. Soc., 74, 211 (1952).
177. GURD, F.R.N. & GOODMAN, D.S., J. Am. Chem. Soc., 74, 670 (1952).
178. SANGER, F., Biochem. J., 44, 126 (1949).
179. DAYHOFF, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure, 1969, v.4, p. 35.
180. BLUNDELL, T. et al., Adv. Protein Chem., 26, 279 (1972).
181. TRISTAM, G.R. & SMITH R.H., Adv. Protein Chem., 18, 247 (1963).
182. JIRGENSONS, B., Tetraedron, 13, 166 (1961).
183. SHRAKE, A. & RUPLEY, J.A., J. Mol. Biol., 79, 351 (1973).
184. WHITE, A. et al., Princípios de Bioquímica, Guanabara Koogan, 59 ed., 1976.
185. FANELLI, A.R. et al., Adv. Protein Chem., 19, 73 (1964).
186. GURD, F.R.N. & ROTHGEB, T.M., Adv. Protein Chem., 33, 142 (1979).

187. CORYELL, C.D. & PAULING, L., J.Biol.Chem., 132, 769 (1940).
188. GEORGE, P. & HANANIA, G.I.H., Disc.Faraday Soc., 20, 216 (1955).
189. EDMUNDSON, A.B. & Hirs, C.H.W., Nature, 190, 663 (1961).
190. EDMUNDSON, A.B., Nature, 205, 883 (1965).
191. HARRISON, S.C. & BLOUT, E.R., J.Biol.Chem., 240, 299 (1965).
192. RUMEN, N.M., Acta Chem.Scand., 14(5), 1217 (1960).
193. HAPNER, K.D., et al., J.Biol.Chem., 243(4), 683 (1968).
194. KENDREW, J.C. et al., Nature, 161, 662 (1958).
195. ATASSI, M.Z. & SINGHAL, R.P., J.Biol.Chem., 245(19), 5122 (1970).
196. KENDREW, J.C. et al., Nature, 190, 666 (1961).
197. URNES, P., J.Gen.Physiol., 49, 75 (1965).
198. GEORGE, P. & HANANIA, G., Biochem.J., 52, 517 (1952).
199. HANANIA, G.I.H. & IRVINE, D.H., J.Chem.Soc., A, 2389 (1970).
200. DAVIES, D.R., Ann.Rev.Biochem., 36, 328 (1967).
201. MACKENZIE, S.L., Methods, Biochem. Anal., 27, 1 (1981).

ERRATA

página(s)	Linha(s)	Onde se lê:	Leia-se:
3	24	... a curva	... à curva
4	4	... processos interati <u>ti</u> vos	... processos iterativos
5	12	... a carga	... à carga
8	32,33	... interação macromolecular existente <u>en</u> tre o solvente e o soluto ⁽⁸¹⁾ .	... interação existente entre o solvente e o soluto macromolecular ⁽⁸¹⁾ .
23	15	$[U] = \frac{U_o V_o}{V_o + V} = C_{UT}$	$[U] = \frac{U_o V_o}{V_o + V} \approx C_{UT}$
31	30	$[OH^-] = \frac{(V - V_e) C_B}{V_o + V}$	$[OH^-] = \frac{(V - V_e) C_B}{V_o + V}$
45	3	$V_{HA}, V_{HA_1}, \dots, V_{HA_5}^+, \dots$	$V_{HA_1}, \dots, V_{HA_5}^+, \dots$
45	14	$C_{HA_2} = [HA_2] + [A_2^-] = \frac{(V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B}{V_o + V}$	$C_{HA_2} = [HA_2] + [A_2^-] = \frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B}{V_o + V}$
49	6	$(K_{HA_1} + [H^+])(V + V_o) / C_B$	$(K_{HA_1} + [H^+]) / C_B$
54	5,10,17	... lado direito	... lado esquerdo
54	6,13,19	... eixo X	... eixo V
55	4	... eixo X	... eixo V
58	10	... um poliforfismo	... um polimorfismo
59	22	... intactas, as pontas dissulfeto	... intacta, a ponte dissulfeto
78	12	... Cannan e Neuberger	... Crammer e Neuberger
80	3	... pelos pâncreas	... pelo pâncreas
124	13	$Zn(H_2O)^{2+}$	$Zn(H_2O)_2^{2+}$
127	11	$Zn(H_2O)^{2+}$	$Zn(H_2O)_2^{2+}$
129	28	$Heme Fe^{2+} + O_2 \rightleftharpoons Heme Fe^{2+} \cdot O_2^-$	$Heme Fe^{2+} + O_2 \rightleftharpoons Heme Fe^{2+} \cdot O_2$
131	35	...ácídico...	...acídico...
167	31	... regiões de pH.	... regiões de pH ⁽¹⁸⁴⁾ .
211	14	172	173
211	15	173	172