

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Jorge Cesar Masini e aprovada pela Comissão Julgadora

Campinas, 16 de fevereiro de 1990

Oswaldo E. S. Godinho

APERFEIÇOAMENTOS NA METODOLOGIA DE
TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS DE
POLIELETRÓLITOS COM ÊNFASE A
PROTEÍNAS NATIVAS E DESNATURADAS

JORGE CESAR MASINI
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. OSWALDO E.S. GODINHO

CAMPINAS - 1990

*A meus pais e irmãos pelo apoio
e incentivo sempre depositados
em minha educação .*

*À Marilda, à Mariana e à Gabriela
pelo apoio e carinho em nosso lar.*

*Ao Professor Godinho pela amizade
e orientação segura ao longo da
realização deste trabalho.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Aécio Pereira Chagas por nos ter iniciado em Química e por seu constante apoio e sugestões.

Ao Prof. Dr. Luiz Manoel Aleixo e ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto pela prontidão com que sempre nos atenderam.

A todos os colegas de laboratório que conosco conviveram ao longo destes anos e que, das mais diversas formas, colaboraram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. William Ferreira da Costa da Universidade Estadual de Maringá pela amizade e pelos ensinamentos em computação.

À FAPESP pelas Bolsas de Estudo concedidas.

À UNICAMP pela oportunidade e Bolsas de Estudos concedidas.

À Valda pela datilografia e ao Everaldo pelos desenhos.

Ao Laurindo pela presteza na reprodução e encadernação da tese.

RESUMO

Aperfeiçoamentos na Metodologia de Titulações Potenciométricas de Polieletrólitos com Ênfase a Proteínas Nativas e Desnaturadas

Autor: Jorge Cesar Masini

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

Um método linear baseado em rigorosos balanços de massa e carga para sistemas ácido-base tem sido aplicado a dados de titulações potenciométricas de proteínas para determinar e caracterizar grupos tituláveis presentes nestes materiais. Neste trabalho de tese estudou-se tal metodologia visando-se otimizá-la ou aperfeiçoá-la nos seguintes pontos:

1. Avaliou-se criticamente os efeitos quali e quantitativos nos resultados obtidos em função de se tratar os grupos tituláveis da proteína como uma mistura de ácidos fracos monopróticos, ignorando-se o termo de variação de energia livre eletrostática que acompanha a dissociação de grupos presentes em polieletrólitos.

2. Avaliou-se o método quando aplicado a proteínas desnaturadas em soluções de cloridrato de guanidina, $GuHCl$, 6 M, condições nas quais todos os segmentos da cadeia são expostos ao solvente e em que os efeitos eletrostáticos sobre a dissociação dos grupos são minimizados.

3. Estudou-se a possibilidade de determinação do ponto isoelétrico, pI , das proteínas a partir dos resultados obtidos por titulação, bem como seu uso no auxílio da atribuição da natureza química dos grupos determinados.

4. Investigou-se a quantidade mínima de proteína que pode ser estudada pelo método.

ABSTRACT

Improvements on Potentiometric Titrations Methodology of Polyelectrolytes with Emphasis to Native and Denaturated Proteins

Author: Jorge Cesar Masini

Supervisor: Prof.Dr. Oswaldo E.S. Godinho

A linear method based on a rigorous charge and mass balance for acid-base equilibrium have been applied to potentiometric titration data for determination and characterization of titratable groups of protein molecules. In the present thesis the method was studied in the following points:

1. The titratable groups of polyelectrolytes or proteins are treated as a mixture of weak monoprotic acids, neglecting the free electrostatic energy which accompanies the dissociation of these groups. In this work, the qualitative and quantitative consequences on the results caused by this treatment were critically studied.
2. The method was evaluated when applied to proteins denaturated in solutions of guanidine hydrochloride, *GuHCl*, 6.0 M. In this media, all segments of polypeptide chain are exposed to the solvent and the electrostatic effects on the dissociation are minimized.
3. The possibility of determination of isoelectric point from results of stoichiometry and pK_a 's obtained from titration was studied. The pI determined by this method can be useful in the attribution of chemical identity of titrated groups.
4. The minima amount of protein which can be used for application of the methodology was investigated.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Modelos para Interpretação das Curvas de Titulação de Proteínas	6
1.2	Desnaturação de Proteínas	14
2	Parte Experimental	20
2.1	Reagentes e Soluções	20
2.2	Instrumental	23
2.3	Calibração dos Eletrodos - Medida da Concentração Hidrogeniônica	24
2.4	Titulações de Proteínas	29
3	Métodos de Cálculo	31
3.1	Obtenção de Curvas de Titulação Teóricas de Misturas de Ácidos Fracos na Presença de um Ácido Forte com <i>NaOH</i>	31
3.2	Método de Linearização de Curvas de Titulação	33
3.3	Obtenção de Curvas de Titulação Teóricas Segundo o Modelo de Linderstrom-Lang	37
3.4	Cálculo do Ponto Isoelétrico a Partir da Estequiometria e <i>pKa</i> 's dos Grupos Ionizáveis das Proteínas	39
4	Avaliação dos Efeitos de Interações Eletrostáticas na Caracterização e Determinação dos Grupos Tituláveis de Proteínas pelo Método de Linearização	41
4.1	Considerações Gerais	41
4.2	Resultados e Discussão	43
5	Titulações de Ovalbumina e Lisoizima Desnaturadas em Soluções de Cloridrato de Guanidino 6 M	96
5.1	Considerações Gerais	96
5.2	Medida da Concentração Hidrogeniônica em <i>GuHCl</i> 6,0 M	97

5.3	Resultados e Discussão	99
5.3.1	Titulações de Lisozima	102
5.3.2	Titulações de Ovalbumina	112
6	Determinação do Ponto Isoelétrico de Proteínas e seu Emprego na Atribuição da Natureza Química dos Grupos Caracterizados por Titulação	121
6.1	Considerações Gerais	121
6.2	Resultados e Discussão	123
7	Investigação sobre a Quantidade Mínima de Proteína que Pode ser Estudada por Titulação Potenciométrica	128
7.1	Considerações Gerais	128
7.2	Etapas Seguidas	129
7.3	Resultados e Discussão	131
8	Conclusões	144

1 Introdução

Em titulações potenciométricas de neutralização de sistemas simples o volume de equivalência é determinado pelos métodos da primeira e segunda derivadas. Segundo Meites et. al. [1], a aplicação destes métodos clássicos a dados teóricos de titulação permite a obtenção de resultados com grande precisão e exatidão para ácidos bastante diluídos ($3 \times 10^{-5} M$) ou bastante fracos ($pK_a \sim 6$) quando titulados com base forte $0,1 M$ [2]. Entretanto, observa-se que em titulações experimentais o aumento da diluição ou do pK_a do ácido titulado diminui a inflexão da curva de titulação na região do volume de equivalência, com uma perda paralela de exatidão e precisão em sua determinação pelos métodos derivados. O mesmo se observa quando se trata de titulações de misturas de ácidos fracos cujo ΔpK_a não é superior a 4 [8]. Neste caso, as inflexões das curvas de titulação tendem a se sobrepor, impossibilitando a aplicação dos métodos clássicos ou derivados [5,6,7,8].

Diferentes métodos de cálculo foram desenvolvidos no sentido de aumentar a exatidão e a precisão da determinação do volume de equivalência de ácidos mais fracos ou diluídos, ou ainda, quando presentes em misturas. Tais métodos são geralmente agrupados em dois tipos, os que utilizam ajuste de curvas por regressão não linear [1,2,3,4] e os que utilizam linearização da curva de titulação, onde as retas são ajustadas por regressão linear [7,9]. Apesar dos métodos não lineares serem considerados mais exatos e precisos, os métodos lineares são mais simples do ponto de vista matemático, permitindo uma visualização gráfica sobre o sistema em estudo e conseqüentemente uma maior facilidade na caracterização das espécies presentes [7]. Além

disso, não necessitam de estimativas iniciais dos parâmetros a serem ajustados tão próximos do valor real quanto nos métodos não lineares [9].

Dentro dos métodos de linearização destacam-se inicialmente os trabalhos de Gran [9,10,11]. Na realidade, Gran propôs o uso de duas funções, uma antes e outra depois do volume de equivalência. No gráfico, estas funções tomadas contra o volume de titulante interceptam-se sobre este eixo no volume de equivalência. Essas funções dão excelentes resultados em titulações de ácidos moderadamente fracos com base forte. Porém, deixam de ser lineares quando usadas em titulações de ácidos com constantes de dissociação inferiores a 10^{-7} , ou então, mesmo para ácidos moderadamente fracos em concentrações inferiores a $10^{-4} M$, aumentando a imprecisão na determinação do volume de equivalência [6]. Estudos recentes têm procurado otimizar as condições de aplicação do método de Gran, aumentando seu campo de aplicação [12,13].

O método de Gran aplicado a dados de titulações de misturas de ácidos fortes e fracos permite a diferenciação entre a chamada acidez livre, ou o volume de equivalência para o ácido forte, e a acidez total [14]. Porém, não permite a caracterização dos ácidos fracos que são titulados. Este método tem sido aplicado na determinação da acidez livre e acidez total em estudos ambientais sobre chuva ácida [15,16].

Hofstee [17] e posteriormente Ingman e Still [18], baseados em equações rigorosas de balanço de massa e carga para titulação de um ácido fraco com base forte, desenvolveram programas capazes de determinar o volume de equivalência de titulações de ácidos muito fracos como a β -alanina (pK_a 10,21) ou NH_4NO_3 (pK_a 9,32) com $NaOH$ 0,1 M com erros de $-2,4$

e $-0,9\%$, respectivamente [18]. Com o mesmo método foi possível a determinação de ácido cloroacético (pK_a 2,8) na presença de ácido acético (pK_a 4,7), ou seja, ΔpK_a 1,9 com erro de apenas $0,6\%$ [18].

Posteriormente, Ivaska e Wanninem [19], baseados na equação de Ingman e Still, propuseram um rearranjo nesta equação de modo que além das vantagens obtidas na determinação do volume de equivalência, foi possível a caracterização da espécie titulada pela determinação simultânea de sua constante de dissociação.

Métodos gráficos lineares, baseados em balanços de massa e carga para o sistema ácido-base estudado foram desenvolvidos por Ivaska [20,21] permitindo a determinação individual de ácidos monobásicos presentes em misturas binárias. Como exemplo pode-se citar a determinação dos componentes de uma mistura de ácido acético e ácido ascórbico, ou, ácido hidroxilacético e ácido monocloroacético (ΔpK_a entre 0,5 e 1,9) com erros variando entre 0,5 e 2,5%. Um trabalho posterior se refere à determinação do volume de equivalência para as duas espécies presentes na titulação de um ácido diprótico com base forte. Trabalhando-se com ácido tartárico ($pK_{a1} = 2,88$ e $pK_{a2} = 4,01$) e ácido succínico ($pK_{a1} = 4,08$ e $pK_{a2} = 5,34$) obteve-se resultado com erros entre 0,5 e 1,6% [20,21]. Baseados nestes métodos, Ivaska e Nagypal [8] desenvolveram um programa computacional usando álgebra-linear e ajuste de curvas para determinação de misturas de ácidos polipróticos na presença, ou não, de ácido forte. Este programa tem sido aplicado com sucesso na análise de ácidos presentes em antiácido [22], suco de uva [23] e vinho [24]. Com estes métodos, porém, não é possível a determinação simultânea dos volumes

de equivalência e constantes de dissociação das espécies envolvidas.

Baseados no uso de funções de Gran modificadas, funções lineares em relação ao volume de titulante, deduzidas a partir de um rigoroso balanço de carga e massa para titulações de misturas de um ácido forte e vários ácidos fracos monopróticos, Seymour et. all. [25] desenvolveram uma metodologia capaz de determinar e caracterizar as espécies presentes na mistura. Estes autores aplicaram o método a condensados atmosféricos, onde foi determinada a presença de HSO_4^- , H_2CO_3 e NH_4^+ [25]. Godinho e Aleixo [26] desenvolveram esta metodologia aplicando-a na determinação e caracterização de espécies envolvidas em titulações de ácidos polipróticos como o ácido cítrico [7]. Porém, o principal desenvolvimento introduzido por estes autores foi a aplicação destas funções de Gran modificadas na determinação simultânea da estequiometria e dos pK_a 's de grupos ionizáveis presentes em proteínas [26,32,33].

A grande disponibilidade de computadores ou microcomputadores nos dias atuais tem facilitado grandemente o desenvolvimento de programas voltados para estudos de equilíbrio envolvendo ácidos fracos, mono ou polipróticos, presentes em misturas complexas. Tais programas podem ser aplicados tanto em dados de titulações potenciométricas [27,28] como a métodos espectrofotométricos ou de ressonância magnética nuclear [29]. Todavia, a titulação potenciométrica é uma técnica que requer equipamentos de mais baixo custo e facilmente encontráveis na maioria dos laboratórios, sendo portanto sempre interessante buscar novos campos ou metodologias para sua aplicação e desenvolvimento.

Neste trabalho de tese objetivou-se um aperfeiçoamento, ou otimização, nas condições

de aplicação do método linear desenvolvido por Godinho e Aleixo nas titulações de proteínas [26]. As proteínas são um material muito interessante para ser estudado por titulação potenciométrica, uma vez que possuem em suas moléculas grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico de cadeia lateral, além dos grupos carboxílicos terminais. Possuem também grupos imidazóis da histidina, grupos fenólicos da tirosina, grupos sulfidrílicos da cisteína, grupos ϵ -amino da lisina ou grupos guanidinos da arginina, todos de cadeia lateral, além dos grupos α -amino terminais [30,31]. Todos estes grupos são tratados como uma complexa mistura de ácidos fracos monoproticos, principal consideração adotada pelo método de linearização de Godinho e Aleixo [26].

Deve-se salientar que o comportamento ácido-base de proteínas é diretamente relacionado com uma série de propriedades físicas, químicas ou biológicas de suas soluções. Assim, a solubilidade, a pressão osmótica, a viscosidade, a estabilidade da forma nativa, a atividade enzimática, as ligações de íons metálicos são propriedades diretamente influenciadas pelo pH do meio em que se encontram as proteínas [30].

Além disso, os processos de separação das proteínas de meios biológicos são grandemente facilitadas pelo conhecimento das propriedades ácido-base da proteína estudada. As proteínas apresentam um mínimo de solubilidade na região próxima ao ponto isoelétrico, ou seja, do pH em que sua carga líquida é zero, sendo uma propriedade muito usada em processos de separação ou purificação [30]. O ponto isoelétrico é relacionado com o número de grupos ionizáveis presentes na molécula que são expostos ao solvente, contribuindo com carga, cuja estequiometria

e pK_a 's podem ser determinados a partir da curva de titulação da proteína nativa [30].

A determinação do número de grupos ionizáveis localizados em regiões hidrofóbicas da molécula é conseguida por comparação das curvas de titulação da proteína nativa e da proteína desnaturada ou dados da composição de aminoácidos. Estes resultados podem trazer importantes informações sobre propriedades estruturais ou conformacionais da proteína nativa [30]. Podem ser usadas também em estudos cinéticos ou termodinâmicos dos processos de desnaturação [60].

Por outro lado, a interpretação da curva de titulação de proteínas é complicada devido ao grande número de equilíbrios envolvidos, assim como pela presença de grupos de diferentes naturezas químicas ligadas a uma cadeia polimérica. Neste sentido, vários modelos foram desenvolvidos para interpretação destas curvas de titulação [30,31].

1.1 Modelos para Interpretação das Curvas de Titulação de Proteínas

Um ácido fraco HA dissocia-se em solução aquosa segundo a equação :



A constante de dissociação termodinâmica, K_a , é expressa por:

$$K_a = \frac{aA^- \cdot aH^+}{aHA} \quad (2)$$

onde a é a atividade da espécie em questão. Frequentemente, entretanto, define-se uma constante de dissociação estequiométrica para tal sistema, uma vez que não se conhecem as atividades das espécies HA e A^- , mas somente suas concentrações em equilíbrio. Deste modo, a constante de

dissociação estequiométrica pode ser escrita como:

$$K_o = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (3)$$

a equação 3 pode ser reescrita como:

$$pH = pK_o - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (4)$$

onde α é o grau de dissociação do ácido HA . Trabalhando-se em condições apropriadas (soluções diluídas, meio iônico e temperatura constantes), ou seja, condições em que os coeficientes de atividade das espécies aproximam-se da unidade e permanecem constantes, é possível ignorar-se as diferenças entre as equações 2 e 3. Nestas condições, pK_o pode ser relacionado com a variação de energia livre padrão do processo de dissociação, ΔG° [34,35]:

$$pK_o = -\log K_o = 0,434 \frac{\Delta G^\circ}{RT} \quad (5)$$

Por outro lado, se HA é um grupo que se repete ao longo da cadeia de um polieletrólito, a variação de energia livre que acompanha cada dissociação em uma titulação ácido-base envolve dois termos. O primeiro descreve o trabalho intrínseco de ionização do grupo HA e depende exclusivamente da sua natureza química, sendo descrito apropriadamente pela equação 5. O segundo termo refere-se ao trabalho adicional necessário para remover o próton de seu sítio ionizado contra as forças eletrostáticas exercidas pelas cargas presentes na macromolécula. Com isso, a equação 4 é reescrita para o caso da titulação de um polieletrólito [36]:

$$pH = pK_{int.HA} - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \frac{0,434\partial F}{kT\partial\alpha} \quad (6)$$

Na equação 6, $pK_{int.HA}$ refere-se à constante de dissociação intrínseca do grupo HA

que se repete ao longo da cadeia, k é a constante de Boltzmann, que aparece na equação devido às considerações estatísticas devido ao fato de vários grupos idênticos serem titulados. O termo $\frac{\partial F}{\partial \alpha}$ representa a variação de energia livre eletrostática com o grau de dissociação do grupo HA .

A equação 6 pode ainda ser reescrita como:

$$pH = pK_{int.HA} - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \frac{0,434}{kT} \epsilon \psi_a \quad (7)$$

onde ϵ é a energia elétrica do próton e ψ_a é o potencial elétrico na superfície da macromolécula [30,31,36].

Assim, a equação 7 nada mais é que a equação clássica de Handerson-Hasselbalch acrescida de um termo de correção devido às interações eletrostáticas entre as cargas da macromolécula [36,37,38,39].

Em titulações de proteínas as dissociações sucessivas estão sujeitas, de maneira análoga, às forças eletrostáticas exercidas pelas cargas presentes na molécula.

Originalmente, Linderstrom-Lang [40], aplicando a teoria de Debye-Huckel a proteínas, assumiu que o macroíon contendo numerosas cargas poderia ser tratado como os íons menores com baixa carga. Sabe-se que a carga do macroíon varia continuamente ao longo da titulação como consequência da retirada ou da adição de prótons. Com isso, o coeficiente de atividade do macroíon e a energia livre eletrostática variam continuamente ao longo da titulação, de modo que o coeficiente de atividade do macroíon para uma dada dissociação é determinado pela dissociação anterior [30,31].

Em sua teoria, Linderstrom-Lang assumiu a molécula de proteína como uma esfera rígida e impenetrável ao solvente, com as cargas distribuídas uniformemente sobre a sua superfície. Em função dessas considerações, a influência das interações eletrostáticas sobre a constante de dissociação do grupo HA pode ser escrita como [30,31]:

$$K_{HA} = K_{int.HA} \cdot e^{2WZ} \quad (8)$$

onde $K_{int.HA}$ é a constante de dissociação intrínseca do grupo em questão, ou seja, a constante de dissociação na ausência das interações eletrostáticas, Z é a carga líquida da molécula da proteína e o parâmetro W é o chamado coeficiente de interação eletrostática, podendo ser calculado teoricamente segundo a equação:

$$W = \frac{e^2}{DRkT} \left(1 - \frac{\kappa R}{1 + \kappa Ra} \right) \quad (9)$$

onde e é a carga do elétron, D a constante dielétrica para o solvente, k a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, κ é o parâmetro de Debye-Huckel proporcional à raiz quadrada da força iônica, R o raio da esfera que representa a molécula da proteína e a é a distância radial de maior aproximação entre o centro da esfera e o centro do íon do sal usado para manter o meio iônico constante. Combinando as equações 8 e 9 com a equação de Handerson-Hasselbalch obtém-se [31]:

$$\log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = pH - pK_{int.HA} + 0,868WZ \quad (10)$$

Deste modo, o trabalho necessário para retirar o próton ionizado da superfície da molécula contra as forças eletrostáticas exercidas pelas cargas presentes na proteína é representada por $0,868 WZ$. Cannan et. all. [41,42] propuseram um rearranjo da equação 10 que tornou

possível a determinação de W e $pK_{int.HA}$ do grupo titulável a partir dos dados experimentais:

$$pH - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} = pK_{int.HA} + 0,868WZ \quad (11)$$

Assim, um gráfico de $pH - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$ contra Z fornece uma reta cujo coeficiente linear (carga zero) é o $pK_{int.HA}$ e o coeficiente angular é proporcional ao parâmetro de interação eletrostática, W [30,31,41,42].

Para aplicação deste modelo na determinação e caracterização dos grupos tituláveis de uma proteína deve-se assumir inicialmente que os grupos quimicamente idênticos são titulados em uma mesma região da curva de titulação com o mesmo pK intrínseco, além de um pK aparente que depende da carga da proteína segundo a equação :

$$pK_{aparenteHA} = pK_{int.HA} + 0,868W_{HA}Z \quad (12)$$

Deste modo a região da curva de titulação entre pH 2 e 6 pode ser atribuída aos grupos carboxílicos. Na região de pH 6 a 8 pode-se atribuir aos grupos imidazóis e α -aminos. Finalmente, de pH 8 a 12 são titulados os grupos fenólicos, sulfidrílicos e ϵ -aminos [30,31]. Nesta região, os grupos fenólicos podem ser determinados separadamente por titulação espectrofotométrica [48].

Os resultados obtidos pela aplicação do modelo de Linderstrom-Lang estão sujeitos a erros, pois, muitas vezes a proteína estudada não atende às considerações básicas do modelo. Assim, muitas vezes as proteínas não são globulares para serem tratadas como esféricas e compactas, ou ainda, as interações entre os grupos podem não ser de natureza puramente

eletrostática [30,31].

Segundo Tanford [31], a principal deficiência do modelo de Linderstrom-Lang está na simplificação que admite os grupos tituláveis como uniformemente distribuídos na superfície da molécula. Tal simplificação leva a erros no cálculo da energia livre de interação eletrostática entre os grupos carregados. Na realidade, a constante de dissociação de um grupo é mais fortemente influenciada por cargas mais próximas do que por cargas situadas em posições mais distantes na molécula [43]. Tanford e Kirkwood [43] desenvolveram um modelo assumindo que, como no modelo de Linderstrom-Lang, muitos grupos têm o mesmo pK intrínseco. Porém, consideram que tais grupos não são titulados simultaneamente, permitindo variações que dependem de interações eletrostáticas específicas para cada grupo. Assim, o valor da constante de dissociação de um dado grupo será o produto do termo intrínseco, independente da configuração e um termo eletrostático que depende da configuração e é determinado por um cálculo estatístico apropriado sobre todas as configurações possíveis [30,31,43,44,45,46,47].

A base para o cálculo do termo eletrostático, em uma dada configuração, depende do conhecimento exato da posição de todas as cargas sobre a molécula da proteína e também do conhecimento da distância de maior aproximação entre o solvente e cada uma das cargas. A posição das cargas e suas distâncias relativas podem ser obtidas da estrutura tridimensional da molécula através de dados de difração de raio X no estado cristalino [44]. A distância de maior aproximação entre o solvente e o grupo é assumida, em princípio, como $1,0\text{\AA}$ que é o valor obtido para compostos modelo com as mesmas propriedades intrínsecas [43,44,45,46,47].

Com essas considerações calcula-se um efeito eletrostático da mesma ordem de grandeza que o calculado pelo modelo de Linderstrom-Lang, mas, por outro lado, prediz-se as variações que ocorrem sempre que a distribuição dos grupos carregados não é regular [44].

A aplicação deste modelo tem sido limitada por alguns fatores [45,46,47]. A estrutura tridimensional determinada para os cristais pode não ser a mesma em solução. Além disso, alguns grupos podem não ter os valores de pK intrínseco esperados e podem ser identificados se a estrutura é perfeitamente conhecida (caso de parte dos grupos imidazóis da mioglobina [46,47] ou hemoglobina). A distância de maior aproximação entre os grupos tituláveis e o solvente costuma ser ajustado a valores menores que $1,0 \text{ \AA}$ não obedecendo um dos princípios do modelo [44].

De modo geral, o modelo de Tanford e Kirkwood tem pouco uso para finalidades analíticas, uma vez que é necessário um número muito grande de informações sobre a molécula, tornando-o inviável. Além disso, os próprios autores admitem não existir vantagens claras sobre os tratamentos mais simples [44]. Com isso a interpretação das curvas de titulação por estes métodos restringe-se em ajustar uma série de parâmetros, muitas vezes discrepantes dos valores esperados, visando sobrepor uma curva teórica aos dados experimentais [45,47].

Marini e Martin [51], por sua vez, demonstraram que o parâmetro de interação eletrostática obtido de curvas de titulação de proteínas pode ser incorreto se o número de grupos que dissociam-se com a mesma constante de dissociação não forem perfeitamente conhecidos, bem como se a curva de titulação não for obtida com grande precisão e exatidão [51,53]. Marini e Martin sugerem que as curvas de titulação podem ser representadas por modelos mais simples,

como proposto originalmente por Levy [49], que considerou que os grupos tituláveis poderiam ser agrupados em séries de subgrupos com propriedades semelhantes. Deste modo, os grupos de mesma natureza química não são titulados necessariamente com o mesmo pK intrínseco, mas sim divididos em subgrupos com pK 's distintos, que são resultado das diversas forças a que estão sujeitas as propriedades iônicas, refletindo o ambiente em que tais grupos se encontram na molécula [52]. Assim, os grupos com constantes de dissociação similares podem ser englobados em uma série de modo independente de sua natureza química.

Pelo modelo proposto por Levy e usado por Marini et. all. [50,51,53], a equação de Handerson-Hasselbach clássica pode ser apropriada para representar a curva de titulação, bastando para isso, a escolha apropriada do número de subgrupos bem como de seus pK 's. O modelo matemático usado para ajustar a curva de titulação é [49,50,51,52,53]:

$$F = C - \sum_i \frac{N_i K_{HA_i}}{10^{-pH} + K_{HA_i}} \quad (13)$$

onde F é o número médio de prótons ligados à molécula de proteína, N_i é o número de grupos caracterizados como uma série HA_i e K_{HA_i} é a constante de dissociação para cada grupo da série HA_i e, finalmente, C representa o número máximo de prótons dissociáveis que podem estar ligados à proteína na região de pH estudada. A determinação do número de grupos e suas constantes de dissociação são feitas usando-se um algoritmo não linear que ajusta os parâmetros da equação 12 de modo a minimizar a soma dos quadrados dos desvios entre os pontos experimentais e os calculados. As atribuições iniciais do número de grupos são feitas com base na composição de aminoácidos da proteína [50].

O método de linearização desenvolvido por Godinho e Aleixo [26,32,33] pode ser enquadrado nestes modelos, uma vez que o termo de variação de energia eletrostática não é considerado e os grupos são tratados como uma mistura de ácidos fracos monoproticos. O método faz emprego de equações lineares que segmentam a curva de titulação, permitindo uma maior exatidão e precisão na determinação do volume de equivalência dos grupos tituláveis, bem como dos respectivos pK_a 's. Por outro lado, a aplicação deste método não requer o conhecimento da carga da proteína. Com isso, além da simplicidade do modelo matemático, o procedimento experimental é mais rápido, não requerendo a titulação do branco paralela a da solução contendo proteína [54].

1.2 Desnaturação de Proteínas

A estrutura tridimensional de uma proteína resulta do arranjo da cadeia polipeptídica e sua estabilização em uma conformação compacta, única e perfeitamente definida [57].

As informações necessárias ao conhecimento da conformação estão inteiramente contidas na sequência de aminoácidos. Os processos de autoorganização são espontâneos e iniciados na biossíntese pelo estabelecimento não aleatório de ligações não covalentes entre os diversos segmentos da cadeia e, eventualmente pela formação de pontes dissulfeto entre cisteínas. As modificações pós-traducionais (glicosilações, clivagens proteolíticas, ...) podem em seguida se produzir para que seja atingida a estabilidade conformacional da forma nativa. As condições físicas externas (temperatura e pressão) e as interações entre a cadeia e o ambiente formam

um conjunto de condições determinantes para manutenção da estrutura tridimensional. A conformação nativa, termodinamicamente mais estável, é aquela para a qual a energia livre (ΔG) do sistema proteína-solvente é mínima.

$$\Delta G = \Delta H - T(\Delta S_{solv.} + \Delta S_{conf.}) + P\Delta V \quad (14)$$

Nessa expressão, ΔH representa a variação de entalpia resultante das diversas interações intramoleculares; $\Delta S_{solv.}$ e $\Delta S_{conf.}$ representam respectivamente as variações de entropia de solvatação e conformacional. Finalmente, ΔV é a variação de volume associada à compactação da cadeia polipeptídica [57,58,59].

A variação da entropia conformacional, fortemente positiva, que predomina na transição do estado nativo para o desnaturado é compensado pelo ΔH e pelo $\Delta S_{solv.}$, sendo o último minimizado pela redução das zonas hidrófobas em contato com o solvente [57,58,59].

Deste modo, a desnaturação é a passagem do estado nativo ordenado, de energia livre mínima, a um estado desordenado de energia superior, no qual a quase totalidade dos segmentos da cadeia são solvatados [57,58,59].

A desnaturação pode ser induzida, tanto pelas condições físicas do meio (T , P , campo elétrico) como pelas mudanças de pH , força iônica ou constante dielétrica, provocada pela introdução de agentes desnaturantes. Estes agentes são suscetíveis de entrar em competição com diferentes categorias de ligações intramoleculares, ou perturbar as interações entre a proteína

nativa e o solvente [57,58,59].

Uma série de estudos detalhados sobre a termodinâmica e a cinética do processo estado nativo $\rightleftharpoons$ estado desnaturado foi apresentada na década de 60. Tanford et. al. [60] por sua vez dedicaram-se a estudar o produto da reação de desnaturação no sentido de responder perguntas como: Toda estrutura nativa da proteína é quebrada ou apenas parte dela? As partes que são quebradas podem se arranjar em outras conformações de estrutura rígida ou não? Dados experimentais sugerem que as respostas a estas perguntas não são únicas, uma vez que se observou que diferentes estados de desnaturação são atingidos por diferentes agentes desnaturantes [60].

Por outro lado, uma interpretação dos dados termodinâmicos e cinéticos para a desnaturação somente é possível se o estado desnaturado é precisamente definido [60]. O mais simples estado conformacional de uma proteína desnaturada é caracterizado pelo chamado "enrolamento aleatório", no qual todos os elementos da estrutura nativa são perdidos, não permanecendo nenhuma interação não covalente de importância [60]. Neste sentido foram estudados solventes que levassem a desnaturação da proteína até este estado, uma vez que o enrolamento aleatório é característico para dissoluções de polímeros em um solvente bom e indiferente, no qual as interações entre as cadeias do polímero e o solvente são mais fortes, ou pelo menos iguais, às interações entre as cadeias do polímero. Porém, quando se trata com proteínas, a escolha deste solvente torna-se complicada devido a presença de grupos com diferentes naturezas químicas na molécula. Assim, um bom solvente para um grupo peptídico ou amida é um

solvente ruim para grupos hidrófobos e vice-versa. Um solvente com baixa constante dielétrica, por exemplo, é um solvente fraco para grupos iônicos [62].

Entre os meios comumente empregados para desnaturação de proteínas, soluções concentradas de cloridrato de guanidina, *GuHCl*, geralmente são mais efetivas que outros meios desnaturantes (soluções concentradas de uréia podem ser igualmente efetivas para muitas proteínas). Neste meio as únicas ligações intramoleculares que permanecem intactas são as pontes dissulfeto [58,59,60,61,62,63]

Estudos de Tanford et. al. [60] sobre as propriedades hidrodinâmicas (viscosidade intrínseca e coeficiente de sedimentação) de várias proteínas em soluções concentradas de *GuHCl* indicaram que neste meio as proteínas comportam-se como tendo a estrutura molecular caracterizada pelo enrolamento aleatório. Se as conclusões destes autores são válidas, mesmo para condições nas quais as pontes dissulfeto (ligações cruzadas) permanecem intactas, as curvas de titulação das proteínas seriam facilmente interpretadas em soluções concentradas de *GuHCl*. Efeitos de ligações hidrogênio e ligações hidrofóbicas desapareceriam. Além do mais, sendo o *GuHCl* um eletrólito forte, as interações eletrostáticas também seriam grandemente diminuídas. As interações entre cargas próximas, separadas por distâncias comparáveis às dimensões dos íons GuH^+ e Cl^- não seriam inteiramente eliminadas, mas as interações residuais seriam bem pequenas [61,62].

Para expressar esta predição matematicamente, todos os grupos quimicamente idênticos teriam a mesma constante de dissociação intrínseca ($pK_{\text{int.HA}}$) e o grau de dissociação, α ,

para cada grupo seria dado pela clássica equação de Handerson-Hasselbalch:

$$\log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = pH - pK_{int.HA} \quad (15)$$

Por outro lado, estudos de Cha e Scheraga [64] com ribonuclease em *GuHCl* 5 M e uréia 1,2 M indicaram que a curva de titulação poderia ser representada pelo modelo de Linderstrom-Lang, com valores surpreendentemente altos para o coeficiente de interação eletrostática. Este resultado poderia ser uma forte indicação que a proteína não teria atingido o enrolamento aleatório após a desnaturação neste meio. Nozaki e Tanford [62] repetiram a titulação de ribonuclease e verificaram que realmente pode-se representar a curva de titulação pela equação de Linderstrom-Lang, mas com valores do coeficiente de interação eletrostática bem menores que os obtidos por Cha e Scheraga. O aparecimento deste coeficiente de interação eletrostática foi atribuído à não idealidade da conformação em enrolamento aleatório [62]. Por outro lado, Nozaki e Tanford encontraram um ótimo ajuste entre os dados teóricos e experimentais usando a equação de Handerson-Hasselbalch clássica e admitindo a divisão dos grupos carboxílicos em duas subclasses com pK_a 's distintos. A estequiometria e os pK_a 's destas subclasses apresentaram boa concordância com a composição de aminoácidos do ácido aspártico e ácido glutâmico da ribonuclease. Observou-se também a divisão dos grupos fenólicos em duas subclasses, o que foi atribuído a interações locais ou interações eletrostáticas residuais devido a não idealidade do enrolamento aleatório [62].

Deste modo a conformação de proteínas em soluções de *GuHCl* 6 M parece ter sido bem caracterizada como assumindo o enrolamento aleatório, ou muito próximo a isso.

Nestas condições de alta força iônica têm sido adotados modelos que não levam em consideração a influência da carga da macromolécula sobre as constantes de dissociação dos grupos ácidos [61,62,63].

2 Parte Experimental

2.1 Reagentes e Soluções

- Solução Concentrada de $NaOH$

Foram dissolvidos 50 g de $NaOH$ (Reagente PA - Grupo Química) em 50 ml de água destilada e a solução foi armazenada em frasco de polietileno, deixando-se em repouso por 24 horas antes do uso [66].

- Soluções Titulantes de $NaOH$

A solução concentrada (50%) foi filtrada em funil de placa porosa sob pressão reduzida. Transferiu-se um volume de 70,0; 7,0; 3,5; 1,8; ou 0,7 ml do filtrado para um balão volumétrico de 1,00 l para preparo das soluções 1,0; 0,1; 0,05; 0,025 ou 0,01 M, respectivamente. Elevou-se o volume com água destilada previamente fervida, resfriada em balão sem contato com a atmosfera. As soluções foram preparadas em KCl (Reagente PA - Merck) 0,1 ou 1,0 M com exceção da solução de $NaOH$ 1,0 M, a qual não se adicionou sal. As soluções foram armazenadas em frascos de polietileno em cuja tampa adaptou-se dois tubos, também de polietileno, sendo um usado para transferência da solução diretamente para o interior da microbureta sem contato com a atmosfera. No outro, adaptou-se um tubo de vidro contendo cal sodada ou ascarite, para impedir a entrada de CO_2 no frasco [54,55,56].

A padronização das soluções foi feita com biftalato de potássio padrão acidimétrico da Fisher, seco em estufa por 1 hora a 115°C . As soluções 0,1 ou 1,0 *M* foram padronizadas por titulação usando-se fenolftaleína como indicador [65]. As soluções 0,01, 0,025 e 0,05 *M* foram padronizadas por titulação potenciométrica usando-se o método da segunda derivada para determinação do volume de equivalência.

• Soluções de Ácido Clorídrico

Foram preparadas em concentrações 0,1 *M* por diluição de 8,3 *ml* do reagente concentrado grau analítico Merck até 1,00 *l*. O meio iônico nestas soluções foi *KCl* 0,10 ou 1,0 *M* ou *GuHCl* 6,0 *M*. Quando necessário foi realizada a padronização com carbonato de sódio padrão acidimétrico da Fisher seco em estufa a $270 < T < 300^{\circ}\text{C}$ [65].

• Soluções de Lisozima

As soluções de lisozima foram preparadas a partir do reagente da Aldrich Chemical Co. lote 12567 por pesagem e diluições apropriadas.

• Soluções de Ovalbumina

As soluções de ovalbumina foram preparadas a partir do reagente grau V da Sigma Chemical Co., livre de sal, lote 108C-8135. Devido a problemas de solubilidade da ovalbumina, usou-se o procedimento proposto por Silva [56], preparando-se uma solução mais concentrada que

a necessária, filtrando-se em cadinho de vidro sinterizado e usando-se o filtrado como solução estoque. A concentração dessa solução foi determinada a partir do peso seco de uma alíquota, obtido por secagem em estufa a 105-110°C até massa constante [56].

• Purificação do Cloridrato de Guanidina

O sal cloridrato de guanidina, $GuHCl$, grau ultrapuro Schuartz/Mann Inc. lote JB 10541, foi purificado por recristalização utilizando-se o sistema etanol/benzeno seguida por outra recristalização a partir de água [61]. Para isso, inicialmente saturou-se cerca de 250-300 ml de etanol absoluto grau analítico Merck em ebulição, por aquecimento em banho-maria com o $GuHCl$. Para isso foi utilizado um erlenmeyer de 500 ml. Adicionou-se benzeno a quente, gota a gota, até o aparecimento de uma leve turvação na solução. Retirou-se o aquecimento e deixou-se em repouso até atingir a temperatura ambiente, colocando-se em seguida em banho de gelo.

Filtrou-se a solução recolhendo os cristais em um funil de placa porosa. Lavou-se os cristais com uma solução 50% (volume/volume) de etanol/benzeno e secou-se em estufa a 100°C até eliminação dos solventes orgânicos.

Os cristais foram dissolvidos em uma pequena quantidade de água destilada aquecida em banho-maria até saturação da solução. Filtrou-se a quente para um erlenmeyer de 250 ml e deixou-se a solução esfriar até a temperatura ambiente. Levou-se o erlenmeyer a um banho de gelo por aproximadamente 1 hora e em seguida filtrou-se os cristais sob pressão reduzida recolhendo-os em um funil de placa porosa. Os cristais foram lavados com pequenas quantidades

de água gelada, secos em um dessecador a vácuo (com H_2SO_4) por uma noite e em estufa a $100^\circ C$ por 2 horas.

A pureza do material recristalizado foi verificada por titulação potenciométrica de 30,00 ml de uma solução $7,803 \times 10^{-3} M$ de HCl e 6,00 M de $GuHCl$ com $NaOH$ 1,085 M usando-se o método de Gran para determinar o volume de equivalência para o ácido forte e a concentração de impurezas remanescentes, conforme proposto por Rossotti e Rossotti [14].

2.2 Instrumental

• pH-metro e Eletrodos

Utilizou-se um pH-metro Micronal B-375 com precisão de 0,1 mV ou 0,001 unidades de pH. Os eletrodos empregados foram o indicador de pH de Ross Orion 810100 e o de referência $Ag/AgCl$ de dupla junção Orion 90-02. Nas titulações de pequenas quantidades de solução de proteína (4,0 ml) empregou-se o microeletrodo combinado de vidro Metrohm EA-125.

• Microbureta

Utilizou-se a microbureta Metrohm E-457 com capacidade de 5,0 ml e precisão de 2 μl , ou, capacidade de 0,5 ml e precisão de 0,2 μl .

• Celas de Titulação

Foram utilizadas as celas Metrohm EA 880-T-50 com capacidade de 50,0 ml ou EA 876-5 com capacidade de 5,0 ml. Ambas podem ser acopladas a uma tampa contendo aberturas apropriadas para adaptação de eletrodos, microbureta e tubo para circulação de N_2 livre de CO_2 no interior da cela. Estas celas possuem ainda uma jaqueta externa em cujo interior faz-se circular água termostatizada a $25,0 \pm 0,1^\circ C$ durante o transcorrer das titulações.

• Microcomputador

Foram utilizados no tratamento dos dados os microcomputadores CP-500 da Prológica e Nexus 2600 PC da Scopus acoplados respectivamente às impressoras P-700 e P-720 XT ambas da Prológica.

2.3 Calibração dos Eletrodos - Medida da Concentração Hidro-geniônica

A calibração dos eletrodos foi feita em termos de concentração e não de atividades conforme proposto por Pehrson et. all. [67].

Pela teoria de Debye-Huckel, mantendo-se constante a temperatura e o meio iônico, os coeficientes de atividade do íon H^+ mantém-se constantes durante a titulação. Com isso, a equação de Nernst pode ser escrita como:

$$E = E_a^\circ + 59,16 \log[H^+] + E_I \quad (25,0^\circ C) \quad (16)$$

onde E é o potencial medido, E_a° é um termo que engloba o potencial padrão do eletrodo e o

coeficiente de atividade do íon hidrogênio. E_J é o potencial de junção líquida e é representado por:

$$E_J = J_H[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (17)$$

onde J_H e J_{OH} são característicos do meio iônico.

Assim, a partir de uma titulação potenciométrica de um ácido forte de concentração conhecida com base forte padrão, a temperatura (25°C) e meio iônico constantes é possível determinar os valores de E_a° , J_H e J_{OH} além do produto iônico da água, K_w . Com isso, torna-se possível relacionar o potencial medido com a concentração hidrogeniônica usando-se a equação 16 para titulação de uma amostra desconhecida, realizada nas mesmas condições de força iônica e temperatura.

Na região ácida da titulação de calibração, a equação 16 pode ser escrita como:

$$E = E_a^\circ + 59,16 \log[H^+] + J_H[H^+] \quad (18)$$

uma vez que o termo $J_{OH}[OH^-]$ pode ser desprezado pelo fato da $[OH^-]$ ser muito pequena nesta região. A equação 18 pode ser rearranjada como:

$$E - 59,16 \log[H^+] = J_H[H^+] + E_a^\circ \quad (19)$$

Colocando-se em gráfico o termo $E - 59,16 \log[H^+]$ contra $[H^+]$ obtém-se uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor de J_H e o coeficiente linear fornece E_a° .

Analogamente, na região alcalina da titulação de calibração, a equação 16 pode ser

escrita como:

$$E = E_a^\circ - 59,16 \log[OH^-] + J_{OH}[OH^-] \quad (20)$$

uma vez que $J_H[H^+]$ pode ser desprezado. O termo E_a° engloba o potencial padrão de eletrodo, o coeficiente de atividade do íon OH^- e produto iônico da água. Rearranjando-se a equação 20 obtém-se:

$$E + 59,16 \log[OH^-] = J_{OH}[OH^-] + E_b^\circ \quad (21)$$

Colocando-se em gráfico o termo $E + 59,16 \log[OH^-]$ em função de $[OH^-]$ obtém-se uma reta cujo coeficiente angular fornece J_{OH} e o coeficiente linear fornece E_b° .

Finalmente, a constante de ionização da água, no meio iônico e temperatura usados, é determinada pela expressão:

$$\log K_w = \frac{E_a^\circ - E_b^\circ}{59,16} \quad (22)$$

Experimentalmente, a titulação de calibração foi feita adicionando-se um volume bem conhecido (V_o) de solução de ácido clorídrico por volta de $1 \times 10^{-2} M$ em força iônica apropriada na cela de titulação. Em seguida, a cela é fechada, acoplando-se os eletrodos, a microbureta e tubo de N_2 . Inicia-se a termostatização a $25,0 \pm 0,1^\circ C$ e abre-se o fluxo de N_2 no interior da cela. Após a estabilização do potencial inicial, inicia-se a titulação por incrementos de volume (V) do titulante, solução padrão de hidróxido de sódio, anotando-se o potencial (E) após a sua estabilização. Em todas as calibrações foram tomados cerca de 20 pontos na região ácida e 20 pontos na região básica da titulação. A força iônica foi mantida constante pelo

emprego das soluções em KCl 0,1 ou 1,0 M , ou ainda, $GaHCl$ 6,0 M .

Inicialmente determinou-se o volume de equivalência da titulação, V_e , pelo método de Gran. Deste modo V_e foi determinado pela intersecção das funções $F_1 = (V_o + V)10^{\frac{E}{59,16}}$ (região ácida) e $F_2 = (V_o + V)10^{\frac{-E}{59,16}}$ (região alcalina) com o eixo do volume de titulante adicionado, V , conforme a figura 1.

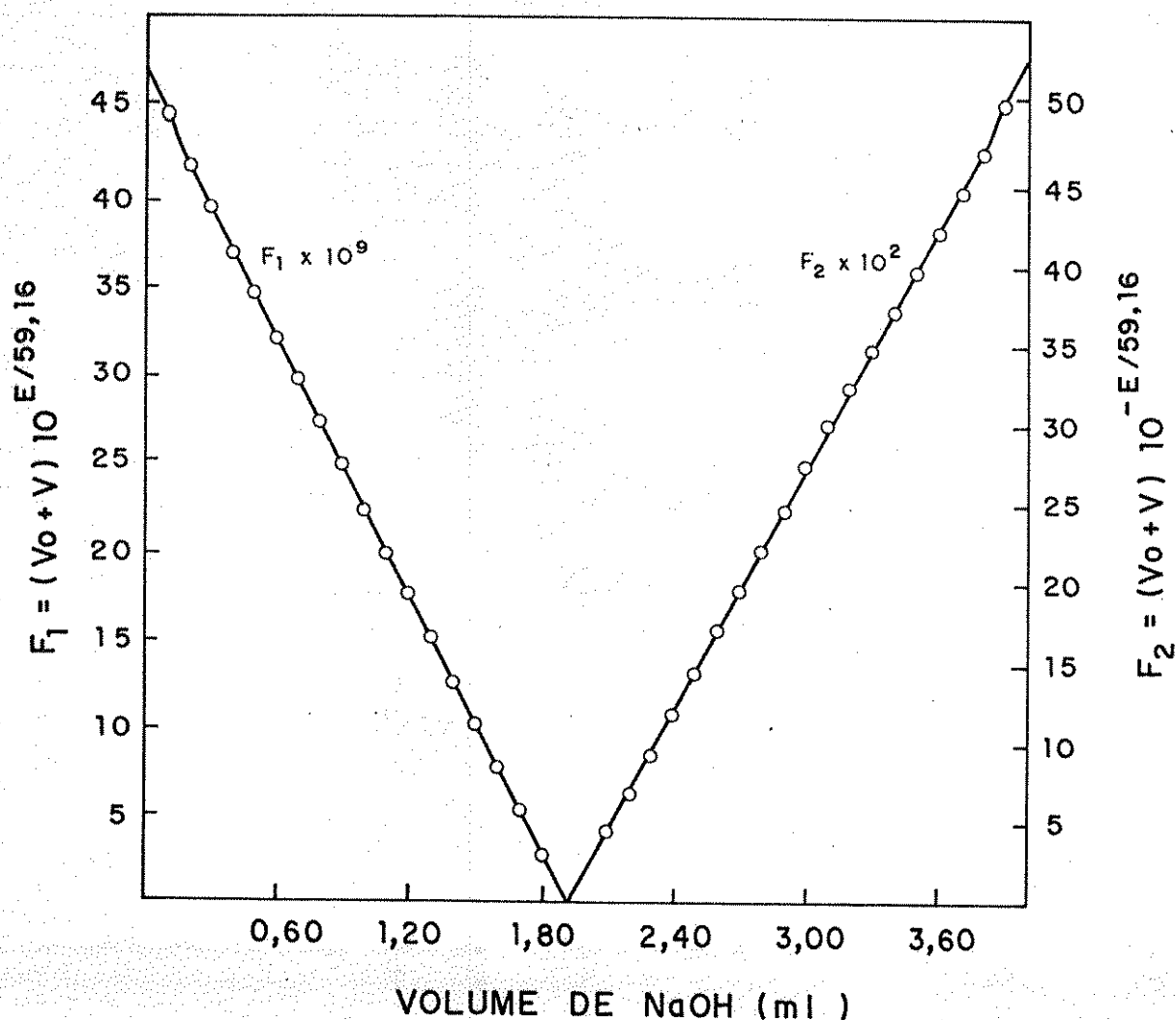


Figura 1: Aplicação do método de Gran para determinação do volume de equivalência da titulação de calibração

Após a determinação do V_e , a concentração hidrogeniônica para os pontos da região ácida é calculada pela equação:

$$[H^+] = \frac{(V_e - V)}{V_o + V} C_B \quad (23)$$

Substituindo-se $[H^+]$ na equação 19 obtém-se os valores de E_a^o e J_H conforme a figura 2.

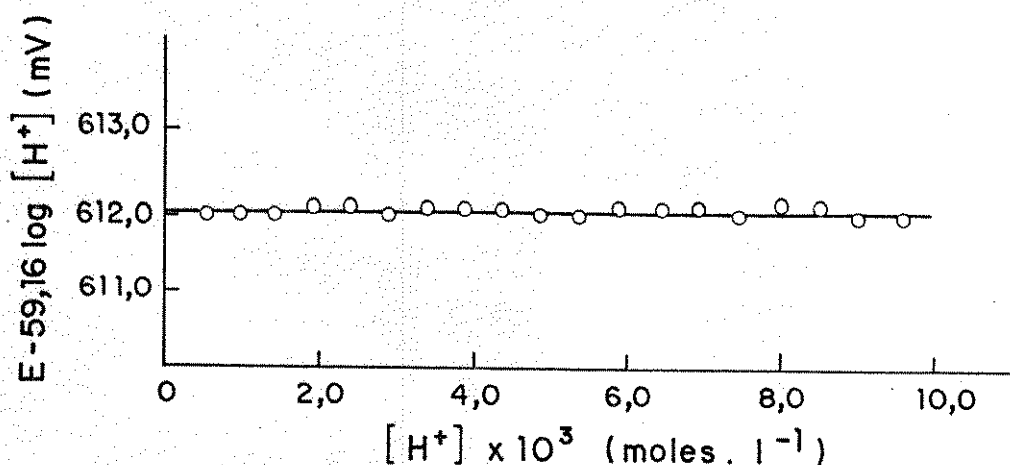


Figura 2: Determinação dos parâmetros E_a^o e J_H

Na região alcalina a concentração hidroxilônica é dada pela expressão:

$$[OH^-] = \frac{(V - V_e)}{V_o + V} C_B \quad (24)$$

Substituindo-se $[OH^-]$ na equação 21 determina-se os parâmetros J_{OH} e E_b^o , conforme a figura 3.

A titulação de calibração é sempre realizada um pouco antes, ou imediatamente após a titulação de uma amostra desconhecida.

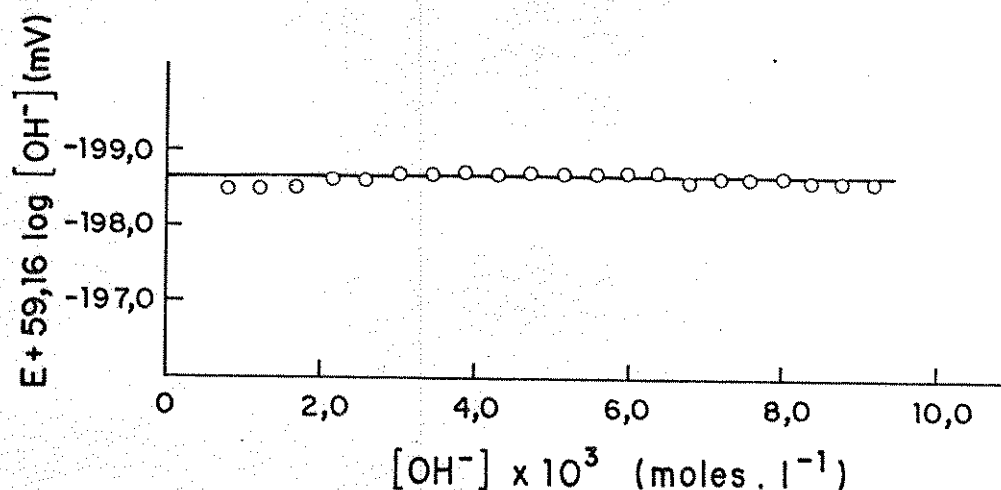


Figura 3: Determinação dos parâmetros E_b^o e J_{OH}

2.4 Titulações de Proteínas

As titulações de soluções de proteínas foram feitas seguindo o procedimento: transfere-se para a cela de titulação um volume conhecido de solução de proteína com a força iônica apropriada. Acoplam-se os eletrodos, a microbureta e o tubo de N_2 . De uma bureta adiciona-se solução de ácido clorídrico 0,1 M, de mesma força iônica que a solução de proteína, até o pH ficar próximo a 2. A soma dos volumes de solução de proteína e de ácido clorídrico é o volume inicial da titulação, V_o . Inicia-se a termostatização e abre-se o fluxo de N_2 no interior da cela. Após a estabilização do potencial inicial (aproximadamente 15 minutos), inicia-se a titulação com incrementos (V) da solução titulante, anotando-se o potencial estabilizado após cada incremento. O procedimento se repete, diminuindo-se os incrementos de titulante quando a variação de potencial aumenta, até atingir-se pH 11 a 11,5. Nestas titulações são tomados cerca de 120 a 150 pontos (volume,

potencial).

A concentração hidrogeniônica ao longo da titulação de proteína é calculada substituindo-se os valores de potencial medido, E , na equação 16 e usando-se os valores de E_a^o , J_H , J_{OH} e K_w determinados na titulação de calibração.

3 Métodos de Cálculo

3.1 Obtenção de Curvas de Titulação Teóricas de Misturas de Ácidos Fracos na Presença de um Ácido Forte com $NaOH$

A equação da curva de titulação de uma mistura de N ácidos fracos, $HA_1, HA_2 \dots HA_N$ na presença de um ácido forte HA_o pode ser deduzida a partir de um rigoroso balanço de massas e cargas para o sistema [68,69]. Considerando-se que a titulação é realizada usando-se solução de $NaOH$ de concentração C_B como titulante, o balanço de massa pode ser escrito como:

$$C_{HA_n} = [HA_n] + [A_n^-] = \frac{(V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})}{V_o - V} C_B \quad (25)$$

onde C_{HA_n} é a concentração molar total do ácido HA_n ; $[HA_n]$ e $[A_n^-]$ são as concentrações no equilíbrio das espécies HA_n e A_n^- ; V_{HA_n} é o volume total de titulante necessário para neutralizar o ácido HA_n ; $V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}$ é o volume de titulante necessário para neutralizar apenas o ácido HA_n ; V_o representa o volume inicial da solução da mistura de ácidos e V o volume de titulante adicionado.

A partir da lei de ação das massas pode-se escrever

$$K_{HA_n} = \frac{[H^+][A_n^-]}{[HA_n]} \quad (26)$$

onde K_{HA_n} é a constante de dissociação estequiométrica do ácido HA_n .

O balanço de carga para o sistema pode ser escrito como:

$$[Na^+] + [H^+] = [A_o^-] + [OH^-] + \sum_{n=1}^N [A_n^-] \quad (27)$$

Os termos $[Na^+]$ e $[A_o^-]$ são reescritos como:

$$[Na^+] = \frac{VC_B}{V_o + V} \quad (28)$$

e

$$[A_o^-] = \frac{V_{HA_o}}{V_o + V} \quad (29)$$

O termo $[A_n^-]$, a partir de rearranjos apropriados das equações 25 e 26, pode ser expresso por:

$$[A_n^-] = \frac{(V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})}{V_o + V} \left(\frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]} \right) C_B \quad (30)$$

Finalmente, substituindo-se as equações 28, 29 e 30 na equação 27 obtém-se a expressão:

$$[H^+] + \frac{VC_B}{V_o + V} = [OH^-] + \frac{V_{HA_o}C_B}{V_o + V} + \sum_{n=1}^N \left[\left(\frac{V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}}{V_o + V} \right) \left(\frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]} \right) C_B \right] \quad (31)$$

que representa a equação da curva de titulação do sistema descrito.

Para o cálculo de $[H^+]$ em função de V usou-se o método iterativo de Newton-Raphson, definindo-se a função $f(H^+)$ por um rearranjo da equação 31 e sua derivada $f'(H^+)$. Essas funções são representadas pelas equações 32 e 33 respectivamente.

$$f(H^+) = (V - V_{HA_o})C_B + \left([H^+] - \frac{K_w}{[H^+]} \right) (V_o + V) - \sum_{n=1}^N \left[(V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}) \left(\frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]} \right) C_B \right] \quad (32)$$

$$f'(H^+) = \left(1 + \frac{K_W}{[H^+]^2}\right) (V_o + V) + \sum_{n=1}^N \left[(V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}}) \left(\frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]} \right) C_B \right] \quad (33)$$

Se $[H^+]_R$ é o valor real da concentração hidrogeniônica para um dado V , substituindo-se um valor aproximado $[H^+]_1$ nas equações 32 e 33 encontra-se um valor mais próximo de $[H^+]_R$ definido como $[H^+]_2$ pela expressão [68]:

$$[H^+]_2 = [H^+]_1 - \frac{f(H^+)}{f'(H^+)} \quad (34)$$

Após i aproximações, o valor da expressão

$$\left[\frac{[H^+]_i - [H^+]_{i-1}}{[H^+]_i} \right] \quad (35)$$

tende a zero [68]. Estabeleceu-se como critério para determinação de $[H^+]_R$ o valor de $[H^+]_i$ para o qual o valor absoluto da equação 35 não seja maior que 0,00001.

Foi elaborado um programa computacional para obtenção das curvas de titulação teóricas. O programa, escrito em linguagem Basic para o microcomputador CP-500 da Prológica, necessita como dados os valores de V , V_o , C_B , K_{HA_n} , V_{HA_n} e K_W . O valor de K_W foi considerado 1×10^{-14} e o coeficiente de atividade dos íons H^+ como unitário. A listagem do programa, denominado TEÓRICO, encontra-se no apêndice 1.

3.2 Método de Linearização de Curvas de Titulação

O método linear se baseia no emprego de funções de Gran modificadas como proposto por Seymour et. all. [25] para determinação de ácidos em condensados atmosféricos. Godinho e

Aleixo usaram essas funções na determinação e caracterização de grupos tituláveis de proteínas, aplicando-as a ovalbumina [26,54], lisozima [32], β -lactoglobulina [33], mioglobina [55], insulina [55] e algumas imunoglobulinas [55,56]. Como a dedução destas funções se encontra de forma detalhada em algumas destas referências, serão apresentadas aqui apenas as formas generalizadas das funções.

Assim, para uma titulação potenciométrica de uma mistura de ácidos fracos HA_n , sendo que n pode variar de 0 a N , na presença de excesso de ácido forte HA_0 a função de Gran modificada para o ácido forte, F_{HA_0} , é representada pela equação 36. Deve-se lembrar que estas funções são deduzidas a partir do balanço de massa e de carga para a mistura de ácidos de modo semelhante aos dados pelas equações 25 e 27 do item anterior

$$F_{HA_0} = V_{HA_0}C_B - V_{C_B} = ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V) - \sum_{n=1}^N (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})C_B A_n \quad (36)$$

As funções de Gran modificadas para os N ácidos fracos HA_n são dadas pela equação

37.

$$\begin{aligned} F_{HA_n} = V_{HA_n}K_{HA_n} - VK_{HA_n} = ([H^+] - [OH^-])(V_0 - V)(K_{HA_n} + [H^+])/C_B + \\ (V - V_{HA_0})[H^+] + (V_{HA_{n-1}} - V_{HA_0})K_{HA_n} - \\ \left[\sum_{j=1, n>1}^{n-1} (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}})A_j + \sum_{j=n+1}^N (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}})A_j \right] (K_{HA_n} + [H^+]) \end{aligned} \quad (37)$$

Nas equações 36 e 37 os termos V_{HA_0} e V_{HA_n} representam o volume de base padrão necessário para neutralizar cada componente ácido presente. Assim, os volumes de base necessários para neutralizar cada ácido individualmente são dados por V_{HA_0} , $V_{HA_1} - V_{HA_0}$, $V_{HA_2} - V_{HA_1}$,

..., $V_{HA_N} - V_{HA_{N-1}}$. Os termos V_o e V representam respectivamente o volume inicial da solução a ser titulada e V o volume de base adicionada. As constantes de dissociação do ácido fraco HA_n é dada por K_{HA_n} e o termo A_n é expresso por:

$$A_n = \frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]} \quad (38)$$

Colocando-se em gráfico os valores numéricos de F_{HA_N} em função do volume de titulante, V , obtém-se retas cujos coeficientes angulares são o negativo das constantes de dissociação K_{HA_n} . Ainda, quando F_{HA_o} ou F_{HA_n} assumem o valor zero, ou seja, quando interceptam a abscissa, determina-se o valor de V_{HA_o} ou V_{HA_n} .

Para aplicação do conjunto de equações são necessárias duas etapas de cálculo. A primeira envolve o cálculo aproximado de V_{HA_o} e V_{HA_n} a partir de K_{HA_n} estimados e dos dados experimentais obtidos na titulação, V , V_o , C_B e $[H^+]$. A segunda etapa envolve o cálculo refinado de V_{HA_n} e K_{HA_n} a partir dos valores aproximados destes parâmetros, obtidos na primeira etapa dos cálculos.

Para o cálculo aproximado de V_{HA_o} , toma-se os dois ou três primeiros pontos da titulação e o primeiro termo da equação 36, $([H^+] - [OH^-])(V_o + V)$, que são os parâmetros conhecidos nesta fase do cálculo. Colocando-se os valores de F_{HA_o} calculados em função de V , define-se um valor aproximado de V_{HA_o} quando $F_{HA_o} = 0$. A seguir, para o cálculo de V_{HA_1} e K_{HA_1} , escolhe-se alguns pontos da titulação em que $V > V_{HA_o}$ e usam-se os dois primeiros

termos da equação 37. No primeiro termo o valor de K_{HA_1} é estimado e no segundo termo introduz-se o valor de V_{HA_0} aproximado. Colocando-se os valores de F_{HA_1} calculados deste modo em função de V , determina-se os valores aproximados de V_{HA_1} , quando $F_{HA_1} = 0$ e K_{HA_1} como o negativo do coeficiente angular da reta. De maneira análoga, prossegue-se o cálculo dos valores aproximados de V_{HA_n} e K_{HA_n} , tomando-se pontos onde $V > V_{HA_{n-1}}$ e usando-se os termos da equação 37, cujas variáveis são conhecidas, ou cujo valor aproximado já foi calculado.

Os valores aproximados V_{HA_0} , V_{HA_n} e K_{HA_n} são usados como valores iniciais na etapa de cálculos refinados dos valores de F_{HAN} . Na região da curva em que $0 < V < V_{HA_0}$ são calculados os valores de F_{HA_0} para cada valor de V com a equação 36. A reta definida por F_{HA_0} em função de V fornece o valor refinado de V_{HA_0} quando $F_{HA_0} = 0$.

Na região da curva em que $V_{HA_0} < V < V_{HA_1}$ o cálculo refinado é feito para F_{HA_1} , substituindo-se na equação 37 o V_{HA_0} refinado e os demais parâmetros obtidos no cálculo aproximado. Os valores de F_{HA_1} em função de V fornecem agora valores refinados de V_{HA_1} e K_{HA_1} . Seguindo-se esta sequência, valores refinados de F_{HA_n} são calculados na região da curva em que $V_{HA_{n-1}} < V < V_{HA_n}$. Os valores que são obtidos vão sendo substituídos na equação 37 e novos cálculos são feitos. O processo é iterativo e se mantém até que a diferença entre os valores de V_{HAN} entre um cálculo e o anterior não exceda 0,01%, quando então os valores refinados de F_{HAN} , V_{HAN} e K_{HAN} são imprimidos [54,55,56].

Os valores definitivos destes parâmetros são calculados adotando-se como critério a tomada de pontos na região de 60-70% antes do V_{HA_n} e até 5% após V_{HA_n} .

Baseado neste processo de cálculo existe um programa em linguagem Basic para os microcomputadores CP-500 da Prológica ou Nexus 2600 PC da Scopus. No programa são necessários os dados $V(I)$, V_o , C_B e $pH(I)$, onde I é o número de pontos (V , pH) e a estimativa de K_{HA_n} . As retas, $F_{HA_n}(V)$, são ajustadas por uma sub-rotina de mínimos quadrados, acoplada ao programa principal. Uma descrição mais detalhada sobre o funcionamento do programa é encontrada nas referências 7, 26 ou 72. Sua listagem é encontrada no Apêndice 2.

3.3 Obtenção de Curvas de Titulação Teóricas Segundo o Modelo de Linderstrom-Lang

Para gerar as curvas de titulação teóricas de proteínas segundo o modelo de Linderstrom-Lang, admitiu-se que todos os grupos de mesma natureza química são titulados com um mesmo pK intrínseco e um termo de correção devido às interações eletrostáticas. Como as constantes de dissociação dos grupos são dependentes da carga da proteína, conforme equação 12 do capítulo 1, calculou-se inicialmente a variação da carga com o pH da solução. Para isso foi desenvolvido um pequeno programa em linguagem Basic para o microcomputador CP-500 da Prológica, baseado na equação :

$$Z = T - \frac{V_o}{P} \left[\sum_{n=1}^N \left(\frac{K_{int} H A_n \cdot 10^{0,883 \cdot W_{HA_n} \cdot Z} \cdot C_{HA_n}}{[H^+] + K_{int} H A_n} \right) \right] \quad (39)$$

onde Z = carga líquida da molécula de proteína; T = carga da proteína quando todos os grupos estão protonados; V_o = volume da solução de proteína; P = número de moles de proteína; N = número de classes de grupos com mesma natureza química; $K_{int} H A_n$ = constante de dissociação intrínseca da classe de grupos $H A_n$; W_{HA_n} = coeficiente de interação eletrostática da classe de

grupos HA_n ; C_{HA_n} = concentração molar total da classe de grupos HA_n ; $[H^+]$ = concentração hidrogeniônica.

A dedução da equação 28 é baseada nos métodos gráficos do tipo $-\log C \times pH$ em que as concentrações das formas protonada e desprotonada de um ácido fraco são determinadas ao longo da titulação [68,69,70]. Porém, ao contrário do que ocorre na aplicação dos métodos gráficos, a dedução da equação 28 não envolve aproximações nos balanços de massa e carga.

O programa desenvolvido utiliza um método iterativo para calcular a carga a partir de um valor inicial estimado, que é fornecido como dado. As cargas foram calculadas em uma região de pH entre 2 e 12, com intervalos de 0,1 unidades de pH . Em seguida, o programa calcula o volume de titulante, V , necessário para se atingir os pH 's pré-estabelecidos, onde foram calculadas as cargas. Para isso usa a equação :

$$V = \frac{([H^+] - [OH^-])V_o - V_{HA_o}C_B - \sum_{n=1}^N (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})C_B A_n}{[H^+] + [OH^-] - C_B} \quad (40)$$

onde

$$A_n = \frac{K_{int} HA_n \cdot 10^{0,868 \cdot W_{HA_n} \cdot Z}}{[H^+] + K_{int} HA_n \cdot 10^{0,868 \cdot W_{HA_n} \cdot Z}} \quad (41)$$

Uma listagem deste programa, denominado PROCARGA, é encontrada no apêndice

3.4 Cálculo do Ponto Isoelétrico a Partir da Estequiometria e pK_a 's dos Grupos Ionizáveis das Proteínas

Considerando-se os grupos tituláveis das proteínas como uma mistura de ácidos fracos monopróticos, o ponto isoelétrico é determinado quando a soma das concentrações dos grupos carregados positivamente iguala-se à soma das concentrações dos grupos carregados negativamente. Assim, o pI é determinado no pH em que vale a expressão:

$$\sum_i [A_i^-] = \sum_j [HA_j^+] \quad (42)$$

Na equação 42 i refere-se a classes de grupos que contribuem com carga negativa, tais como os grupos carboxílicos, fenólicos, sulfidrílicos e fosfato. De maneira semelhante, j representa os grupos que contribuem com carga positiva, ou seja, grupos imidazólicos, ϵ - ou α -aminos, e guanidinos. Deve-se lembrar que os grupos guanidinos não são tituláveis em meio aquoso e, para fins de cálculo, sua estequiometria deve ser obtida de dados sobre a composição de aminoácidos da proteína estudada. Os termos $[A_i^-]$ e $[HA_j^+]$ representam respectivamente as concentrações no equilíbrio das espécies A_i^- e HA_j^+ .

A equação 42 pode ser reescrita em termos das concentrações molares totais dos grupos C_{HA_i} e $C_{HA_j^+}$, suas constantes de dissociação, K_{HA_i} e $K_{HA_j^+}$, além da concentração hidrogeniônica $[H^+]$.

$$\sum_i \left[\frac{C_{HA_i} \cdot K_{HA_i}}{[H^+] + K_{HA_i}} \right] = \sum_j \left[\frac{C_{HA_j^+} \cdot [H^+]}{[H^+] + K_{HA_j^+}} \right] \quad (43)$$

Para determinação da concentração hidrogeniônica na qual é válida a equação 43,

desenvolveu-se um programa computacional para o microcomputador CP-500, usando-se o método iterativo de Newton-Raphson [68].

Para o cálculo do pI deve-se fornecer ao programa os valores de C_{HA_i} , C_{HA_j} , K_{HA_i} e K_{HA_j} , além de um valor de pI aproximado para início do processo iterativo. O valor de pI é imprimido quando a diferença relativa entre a concentração hidrogeniônica calculada entre duas iterações não exceder 0,01%. A listagem do programa, denominado PI , é encontrada no apêndice 4.

4 Avaliação dos Efeitos de Interações Eletrostáticas na Caracterização e Determinação dos Grupos Tituláveis de Proteínas pelo Método de Linearização

4.1 Considerações Gerais

Embora o método de linearização de curvas de titulação já tenha sido aplicado com sucesso a algumas proteínas, um estudo mais sistemático sobre sua aplicação se faz necessário. Assim, os efeitos quali e quantitativos de se considerar os grupos tituláveis de uma cadeia polimérica como uma mistura de ácidos deve ser criticamente estudada. Isto se deve ao fato que nas proteínas, ou cadeias poliméricas, as dissociações não são independentes umas das outras, como ocorre em uma mistura de ácidos fracos propriamente dita. Na realidade os grupos presentes em proteínas obedecem posições fixas na estrutura da cadeia polimérica e, com isso, suas constantes de dissociação ficam sujeitas a uma série de forças que não ocorrem em misturas, tais como forças eletrostáticas exercidas pelas cargas presentes na macromolécula, efeitos de conformação, ressonância, pontes de hidrogênio, etc.

Como foi visto no capítulo 1, o modelo classicamente empregado na interpretação das curvas de titulação de proteínas é aquele proposto por Linderstrom-Lang, no qual considera-se que a principal influência recebida pelas constantes de dissociação são de natureza eletrostática, conforme indicado pela equação 12. Para avaliar os efeitos quali e quantitativos de se considerar os grupos tituláveis como uma mistura de ácidos, ignorando-se a variação de energia livre eletrostática que acompanha a dissociação dos grupos, inicialmente foram geradas curvas de

titulação teóricas para uma proteína de composição bem conhecida e obedecendo a teoria de Linderstrom-Lang. Em seguida os dados destas curvas teóricas foram tratados pelo método de linearização e os resultados avaliados.

As curvas foram geradas pelo método descrito no capítulo 3.3, simulando titulações realizadas em soluções com diferentes valores de força iônica. Esta situação pode ser conseguida atribuindo-se diferentes valores ao parâmetro W , ou o coeficiente de interação eletrostática, uma vez que sua relação com a força iônica é inversamente proporcional, conforme mostrado na equação 9.

Primeiramente, as curvas de titulação foram geradas para um polieletrólito composto por uma cadeia policarboxílica, contendo 51 grupos idênticos com pK_a intrínseco 4,30 e massa molecular 45000 g.mol^{-1} . Foram adotados os seguintes valores para o coeficiente de interação eletrostática: 0; 0,01; 0,02 e 0,03.

Um outro tipo de polieletrólito estudado assemelhou-se mais a uma proteína e sua composição é mostrada na Tabela 1. Como no caso anterior, foram adotados os valores 0; 0,01; 0,02 e 0,03 para o coeficiente de interação eletrostática e massa molecular 45000 g.mol^{-1} .

Com referência à Tabela 1, deve-se salientar que em uma titulação real os grupos guanidinos não são titulados em meio aquoso por serem um ácido muito fraco, porém, devem ser considerados por possuírem carga, que é fundamental na teoria de Linderstrom-Lang, mesmo que esta carga se mantenha constante durante a titulação.

Tabela 1: Composição e pK_a 's dos grupos de um polieletrólito com M.M. 45000 $g.mol^{-1}$

Série ou Ácido	Natureza Química dos Grupos	Número de grupos por mol ($N.G.mol^{-1}$)	pK_{int}
HA_1	carboxílicos	51,0	4,30
HA_2	imidazóis	5,0	6,70
HA_3	aminos	22,0	10,00
HA_4	guanidinos	14,0	12,50

4.2 Resultados e Discussão

Inicialmente foi tratado o caso das curvas de titulação obtidas para o polieletrólito contendo apenas um tipo de grupo titulável na molécula (51,0 grupos carboxílicos com pK_a 4,30). Como já foi visto, seguindo-se a teoria de Linderstrom-Lang deve-se considerar que os grupos apresentam um pK_a aparente que depende da carga da macromolécula, ou do pH da solução, conforme mostrado na equação 12:

$$pK_{aparente}HA = pK_{int}HA + 0,868.W_{HA}Z \quad (12)$$

A variação do $pK_{aparente}$ com o pH da solução para os diferentes valores do coeficiente de interação eletrostática atribuídos é mostrada na Figura 4. A variação da carga com pH e as curvas de titulação são mostradas nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Os dados da curva de titulação obtida para $W_{HA_n} = 0,03$ são mostrados na Tabela 2 e as funções de Gran modificadas para esta curva na Tabela 3. Na Figura 7 é mostrada a curva de titulação dada na Tabela 2 segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 3.

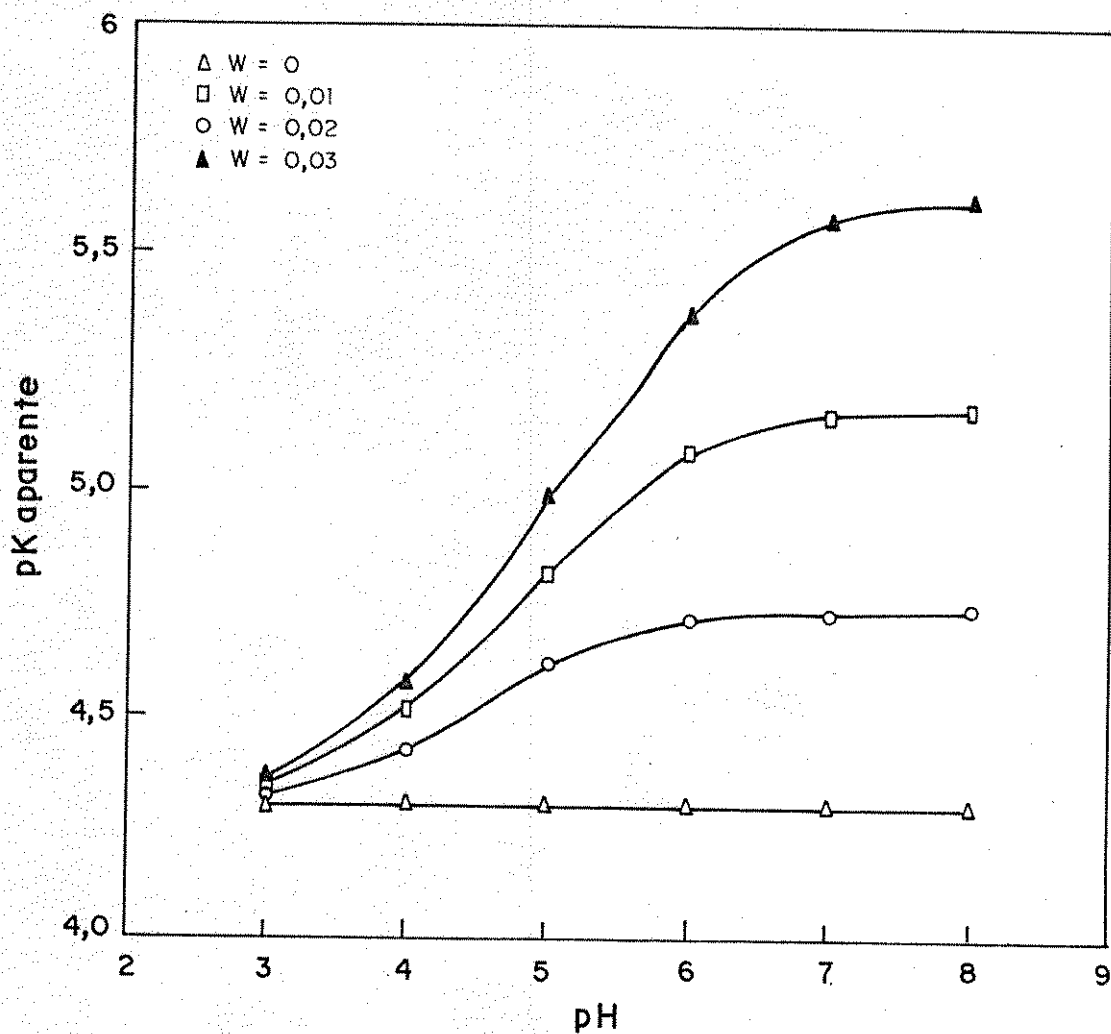


Figura 4: Variação do pK_{aparente} com o pH da solução durante a titulação de um polieletrólito com 51 grupos COOH por mol e $pK_{a,\text{int}} = 4,30$, segundo a Teoria de Linderstrom-Lang (Equação 12), para diferentes valores de W_{HA} .

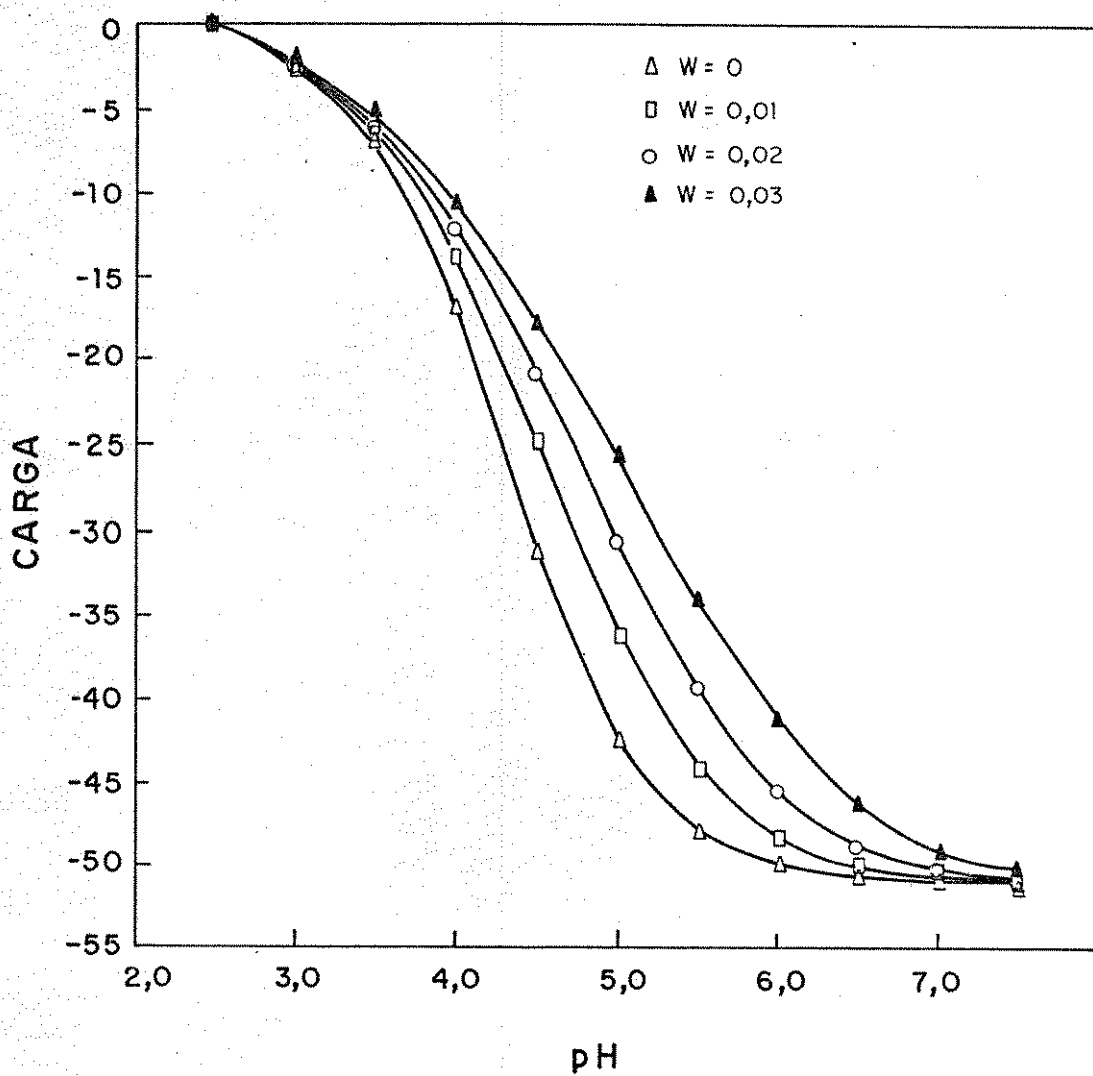


Figura 5: Variação da carga do polieletrólito com o pH da solução calculada pela Equação 39, para diferentes valores de W_{HA_n} .

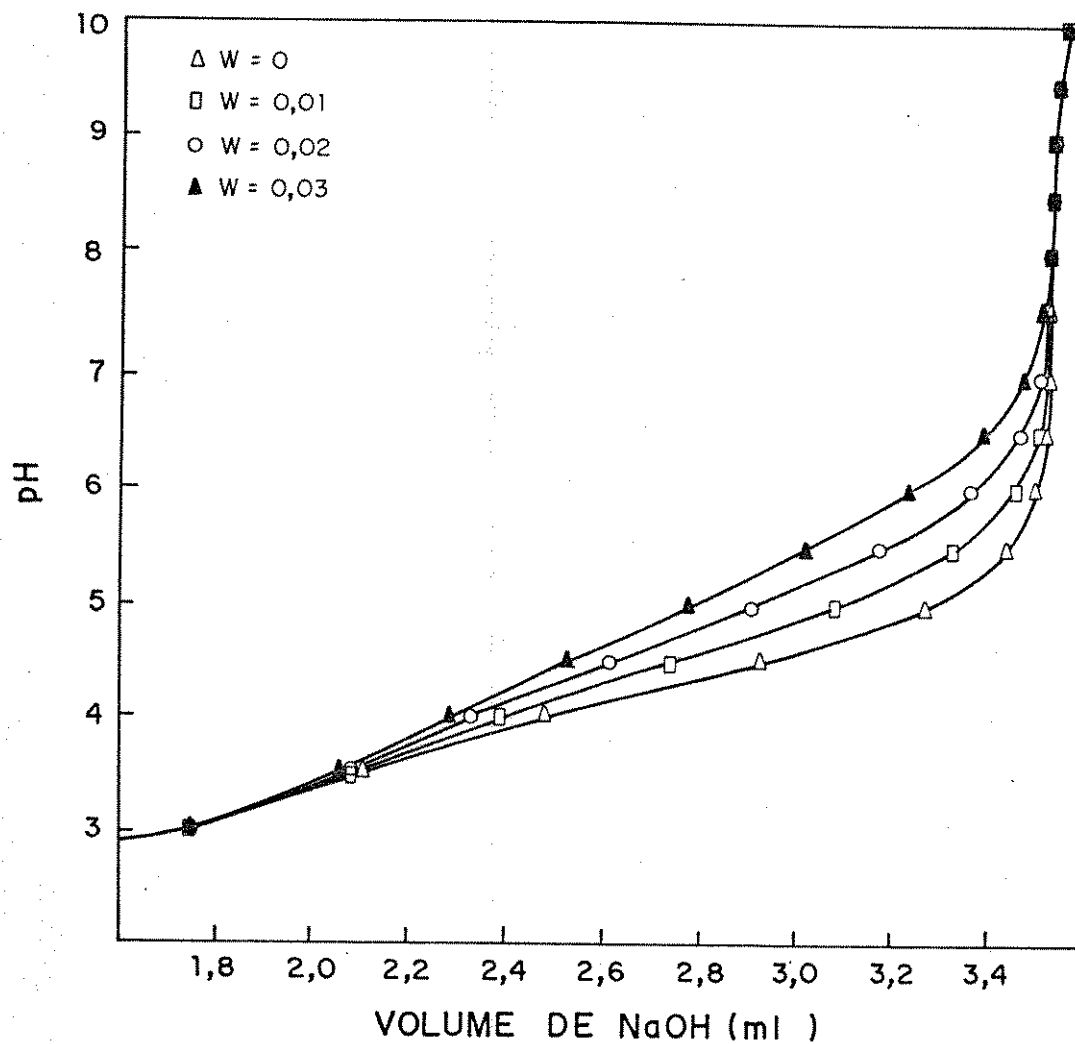


Figura 6: Curvas de titulação para o polieletrólito (51 grupos COOH com $pK_{\text{int.}}$ 4,30), obtidas para diferentes valores de W_{HA_n}

Tabela 2: Dados de volume x pH para a curva de titulação teórica do polieletrólito, com 51 grupos $COOH$ e $pK_{inf.}$ 4,30, segundo o modelo de Linderstrom-Lang, com $W_{HA_n} = 0,03$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
0	0.000	0.000	33	2.115	5.700
1	0.072	2.500	34	2.158	5.800
2	0.268	2.600	35	2.199	5.900
3	0.428	2.700	36	2.237	6.000
4	0.559	2.800	37	2.273	6.100
5	0.667	2.900	38	2.306	6.200
6	0.757	3.000	39	2.336	6.300
7	0.833	3.100	40	2.364	6.400
8	0.899	3.200	41	2.389	6.500
9	0.958	3.300	42	2.411	6.600
10	1.011	3.400	43	2.431	6.700
11	1.060	3.500	44	2.447	6.800
12	1.107	3.600	45	2.462	6.900
13	1.153	3.700	46	2.474	7.000
14	1.198	3.800	47	2.484	7.100
15	1.243	3.900	48	2.493	7.200
16	1.288	4.000	49	2.500	7.300
17	1.335	4.100	50	2.506	7.400
18	1.382	4.200	51	2.511	7.500
19	1.429	4.300	52	2.514	7.600
20	1.477	4.400	53	2.518	7.700
21	1.527	4.500	54	2.520	7.800
22	1.577	4.600	55	2.522	7.900
23	1.627	4.700	56	2.524	8.000
24	1.679	4.800	57	2.525	8.100
25	1.728	4.900	58	2.526	8.200
26	1.779	5.000	59	2.527	8.300
27	1.831	5.100	60	2.528	8.400
28	1.879	5.200	61	2.529	8.500
29	1.930	5.300	62	2.530	8.600
30	1.979	5.400	63	2.531	8.800
31	2.026	5.500	64	2.532	8.900
32	2.071	5.600	65	2.533	9.000

Tabela 3: Funções de Gran modificadas calculadas pelas Equações 36 e 37 para os dados da Tabela 2

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.072	2.500	9.3472E-02	9.3156E-02	3.3907E-01
0.268	2.600	7.3998E-02	7.3961E-02	5.0197E-02
0.428	2.700	5.8175E-02	5.8292E-02	-2.0040E-01
0.559	2.800	4.5272E-02	4.5463E-02	-4.2042E-01
0.667	2.900	3.4678E-02	3.4886E-02	-5.9639E-01
0.757	3.000	2.5888E-02	2.6072E-02	-7.0917E-01
0.833	3.100	1.8479E-02	1.8630E-02	-8.0909E-01
0.899	3.200	1.2104E-02	1.2166E-02	-5.0754E-01
0.958	3.300	6.4765E-03	6.3882E-03	1.3829E+00
1.011	3.400	1.3592E-03	1.1978E-03	1.3483E+01
1.060	3.500	-3.4364E-03	-3.6009E-03	-4.5690E+00
1.107	3.600	-8.0577E-03	-8.2037E-03	-1.7804E+00
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
1.0232	3.4108E-03		-0.9999852	9.7932E-02
Para HA 1				
N1 = 15 N2 = 9				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.243	3.900	2.8706E-05	2.8296E-05	1.4493E+00
1.288	4.000	2.4265E-05	2.4234E-05	1.2894E-01
1.335	4.100	1.9966E-05	1.9992E-05	-1.2864E-01
1.382	4.200	1.5609E-05	1.5750E-05	-8.9518E-01
1.429	4.300	1.1226E-05	1.1507E-05	-2.4402E+00
1.477	4.400	6.8734E-06	7.1747E-06	-4.1992E+00
1.527	4.500	2.5541E-06	2.6616E-06	-4.0378E+00
1.577	4.600	-1.8277E-06	-1.8515E-06	-1.2852E+00
1.627	4.700	-6.2748E-06	-6.3646E-06	-1.4103E+00
1.679	4.800	-1.0757E-05	-1.1058E-05	-2.7253E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.53326	1.775E-03	4.00450	9.0262E-05	-0.99985093

continua

Para HA2				
N1 = 27 N2 = 10				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.831	5.100	2.4426E-06	2.4118E-06	1.2784E+00
1.879	5.200	2.0637E-06	2.0758E-06	-5.8117E-01
1.930	5.300	1.7166E-06	1.7188E-06	-1.2522E-01
1.979	5.400	1.3725E-06	1.3758E-06	-2.3951E-01
2.026	5.500	1.0377E-06	1.0468E-06	-8.6455E-01
2.071	5.600	7.1574E-07	7.3177E-07	-2.1904E+00
2.115	5.700	4.0998E-07	4.2377E-07	-3.2543E+00
2.158	5.800	1.1961E-07	1.2276E-07	-2.5683E+00
2.199	5.900	-1.5728E-07	-1.6425E-07	-4.2427E+00
2.237	6.000	-4.2112E-07	-4.3025E-07	-2.1242E+00
2.273	6.100	-6.6968E-07	-6.8226E-07	-1.8445E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.61905	2.0635E-03	5.15489	7.0002E-06	-0.99990940
Para HA 3				
N1 = 40 N2 = 15				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.364	6.400	1.1382E-07	1.1318E-07	5.7086E-01
2.389	6.500	9.6283E-08	9.6009E-08	2.8537E-01
2.411	6.600	8.0696E-08	8.0902E-08	-2.5505E-01
2.431	6.700	6.7247E-08	6.7168E-08	1.1645E-01
2.447	6.800	5.5409E-08	5.6181E-08	-1.3738E+00
2.462	6.900	4.5552E-08	4.5881E-08	-7.1784E-01
2.474	7.000	3.7155E-08	3.7641E-08	-1.2901E+00
2.484	7.100	3.0157E-08	3.0774E-08	-2.0062E+00
2.493	7.200	2.4418E-08	2.4594E-08	-7.1235E-01
2.500	7.300	1.9672E-08	1.9787E-08	-5.8117E-01
2.506	7.400	1.5805E-08	1.5667E-08	8.8640E-01
2.511	7.500	1.2661E-08	1.2233E-08	3.4961E+00
2.514	7.600	1.0082E-08	1.0173E-08	-8.9793E-01
2.518	7.700	8.0342E-09	7.4264E-09	8.1855E+00
2.520	7.800	6.3523E-09	6.0529E-09	4.9453E+00
2.522	7.900	4.9982E-09	4.6796E-09	6.8085E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.35328	1.1776E-03	6.16324	6.8669E-07	-0.99992400
Número de iterações = 113				

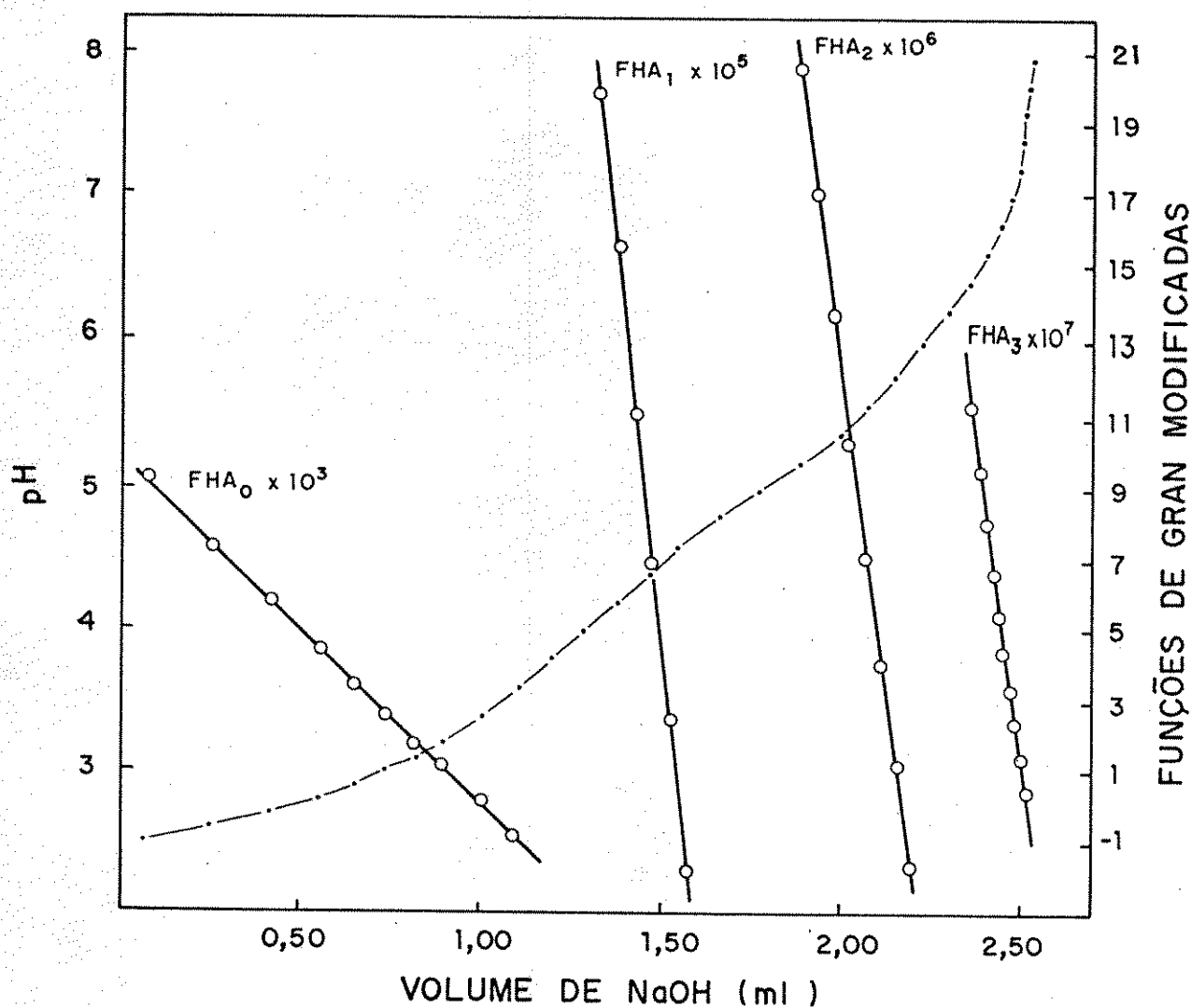


Figura 7: Curva de titulação do polieletrólito dado na Tabela 2 segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 3 ($W = 0,03$)

Tabela 4: Resultados obtidos pelo método de linearização aplicado às curvas de titulação teóricas, geradas segundo o modelo de Linderstrom-Lang

	Coeficiente de interação eletrostática							
	0		0,01		0,02		0,03	
Série	N.G.mol ⁻¹	<i>pK</i>	N.G.mol ⁻¹	<i>pKa</i>	N.G.mol ⁻¹	<i>pKa</i>	N.G.mol ⁻¹	<i>pKa</i>
<i>HA</i> ₁	51,0	4,30	20,2	4,01	16,2	3,93	17,8	4,00
<i>HA</i> ₂			26,2	4,77	22,5	4,84	20,6	5,15
<i>HA</i> ₃			4,5	5,35	12,0	5,70	11,8	6,16
Total	51,0		50,3		50,7		50,2	

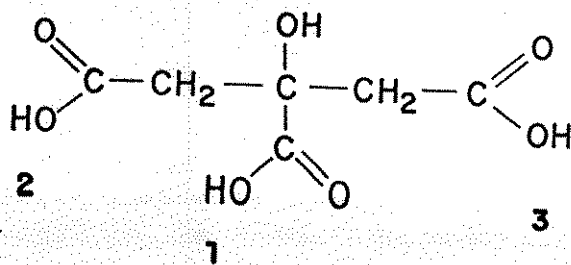
A Figura 4 mostra que a variação do $pK_{aparente}$ com o pH da solução ou a carga do polieletrólito é maior quanto maior for o coeficiente de interação eletrostática. Um reflexo desta variação do $pK_{aparente}$ nos resultados obtidos pela aplicação do método de linearização é a divisão dos grupos nas séries *HA*₁, *HA*₂ e *HA*₃ com *pKa*'s distintos, conforme mostrado na Tabela 4. Por outro lado, admitindo-se o coeficiente de interação eletrostática zero, não se observa a divisão em subséries de grupos, sendo que este cálculo tem sido usado para checar o programa que gera a curva de titulação teórica.

Quanto a curvas geradas admitindo-se o coeficiente de interação eletrostática 0,01; 0,02 e 0,03 observou-se um aumento no número de grupos e no *pKa* da série *HA*₃ paralelo com o aumento do valor de W_{HA_3} . Este fato pode indicar, no caso de uma titulação experimental de proteína, a possibilidade de sobreposição entre os grupos tituláveis na série *HA*₃ com *pKa* 6,16 ($W = 0,03$) e grupos imidazóis da histidina que apresentam *pKa* 6,15-7,20 [31]. Porém deve-se lembrar que a variação da carga em titulações de proteínas contendo diferentes tipos de grupos

tituláveis difere significativamente daquela observada em polieletrólitos com apenas um tipo de grupo titulável, de modo que a variação do pK_{aparente} em proteínas também deve ser diferente.

Por outro lado, a soma dos grupos pertencentes às séries HA_1 , HA_2 e HA_3 , dada na Tabela 4, é bem concordante com o número com o qual as curvas foram geradas, indicando a adequabilidade analítica do método de linearização para determinar a estequiometria e caracterização de grupos tituláveis de uma cadeia policarboxílica. Deste modo, a divisão dos grupos carboxílicos, com propriedades intrínsecas semelhantes, parece ser uma consequência da não consideração do termo de variação de energia livre eletrostática que acompanha a dissociação dos grupos presentes na cadeia polimérica. Este resultado é coerente com a proposta de Levy [49], e posteriormente de Marini et. all. [50], de dividir os grupos de mesma natureza química em um número apropriado de séries de sub-grupos para representar a curva de titulação sem considerar as interações eletrostáticas.

Uma analogia ultra simplificada pode ser feita com relação à dissociação dos prótons tituláveis do ácido cítrico cuja molécula é representada:



Em uma titulação, a primeira dissociação ocorre no próton 1 devido à influência do grupo hidroxila ligado ao carbono α , que estabiliza o ânion carboxilato. A próxima dis-

sociação pode ocorrer com igual probabilidade nos prótons 2 ou 3, uma vez que estão em ambientes idênticos, sujeitos exatamente às mesmas forças. Após a titulação de qualquer um dos dois prótons, haverá a contribuição de mais uma carga àquela já existente e, com isso, a influência destas cargas sobre a dissociação do terceiro próton diferencia-o com um pK_a mais alto. Tratando-se a titulação de ácido cítrico pela teoria Linderstrom-Lang, os prótons 2 e 3 seriam determinados como um único tipo de grupo com um pK intrínseco e os desvios da lei de ação das massas seriam corrigidos pelo coeficiente de interação eletrostática. Obviamente a titulação de um polieletrólito é um sistema muito mais complexo que a titulação de ácido cítrico, mas pode-se supor que a divisão de um tipo de grupo com propriedades intrínsecas semelhantes em séries de grupos com pK_a 's distintos é um reflexo das diversas forças a que estão sujeitas as dissociações destes prótons ao longo da titulação [52]. É claro também que não existe um método de cálculo aplicado a dados de titulações potenciométricas capaz de caracterizar cada uma das 51 dissociações envolvidas no sistema estudado. Porém, segundo estudos em andamento [72], o método de linearização pode caracterizar ácidos com diferença de pK na faixa de 0,5 a 1 unidade, o que pode se aplicar à caracterização dos grupos tituláveis de proteínas como um limite em sua capacidade de distinguir entre uma série de grupos e outra.

Dando-se prosseguimento a este estudo, foram geradas curvas de titulação teóricas, segundo o modelo de Linderstrom-Lang, para a proteína cuja composição foi dada na Tabela 1. As curvas foram geradas admitindo-se as interações eletrostáticas atuando sobre todos os grupos. A variação da carga da macromolécula com o pH da solução é ilustrada na Figura 8 e as diferentes

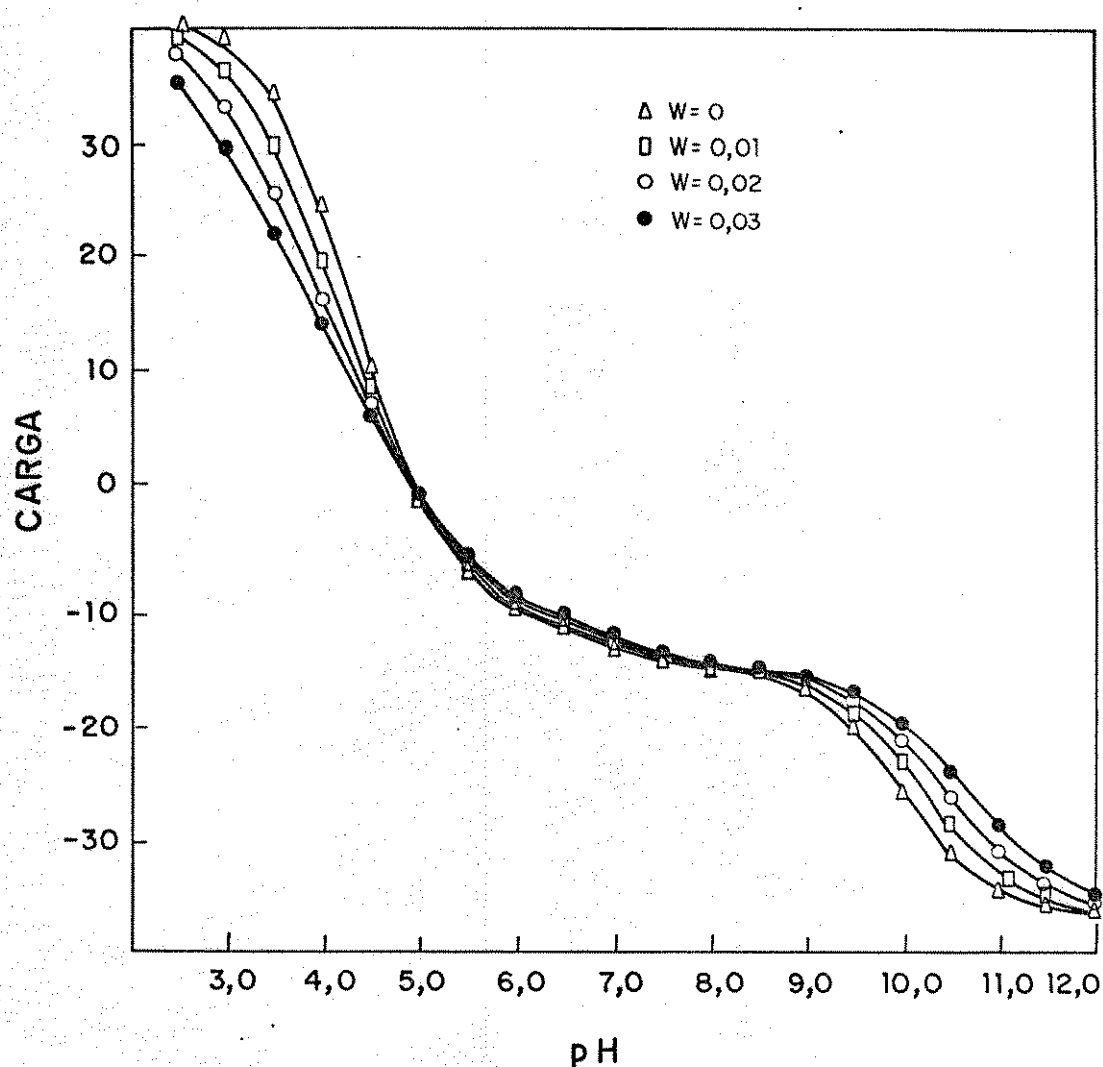


Figura 8: Variação da carga da proteína com o pH da solução, calculada pela Equação 39, admitindo-se $W = 0; 0,01; 0,02$ e $0,03$

curvas de titulação na Figura 9. A variação do $pK_{aparente}$ com o pH da solução para os grupos carboxílicos, imidazóis e aminos são mostrados, respectivamente, nas Figuras 10, 11 e 12. Os dados da curva de titulação, gerada admitindo-se $W = 0,03$, são mostrados na Tabela 5 e as funções de Gran modificadas, resultantes destes dados, estão na Tabela 6. Finalmente, a curva de titulação para $W = 0,03$, segmentada e linearizada, é mostrada na Figura 13.

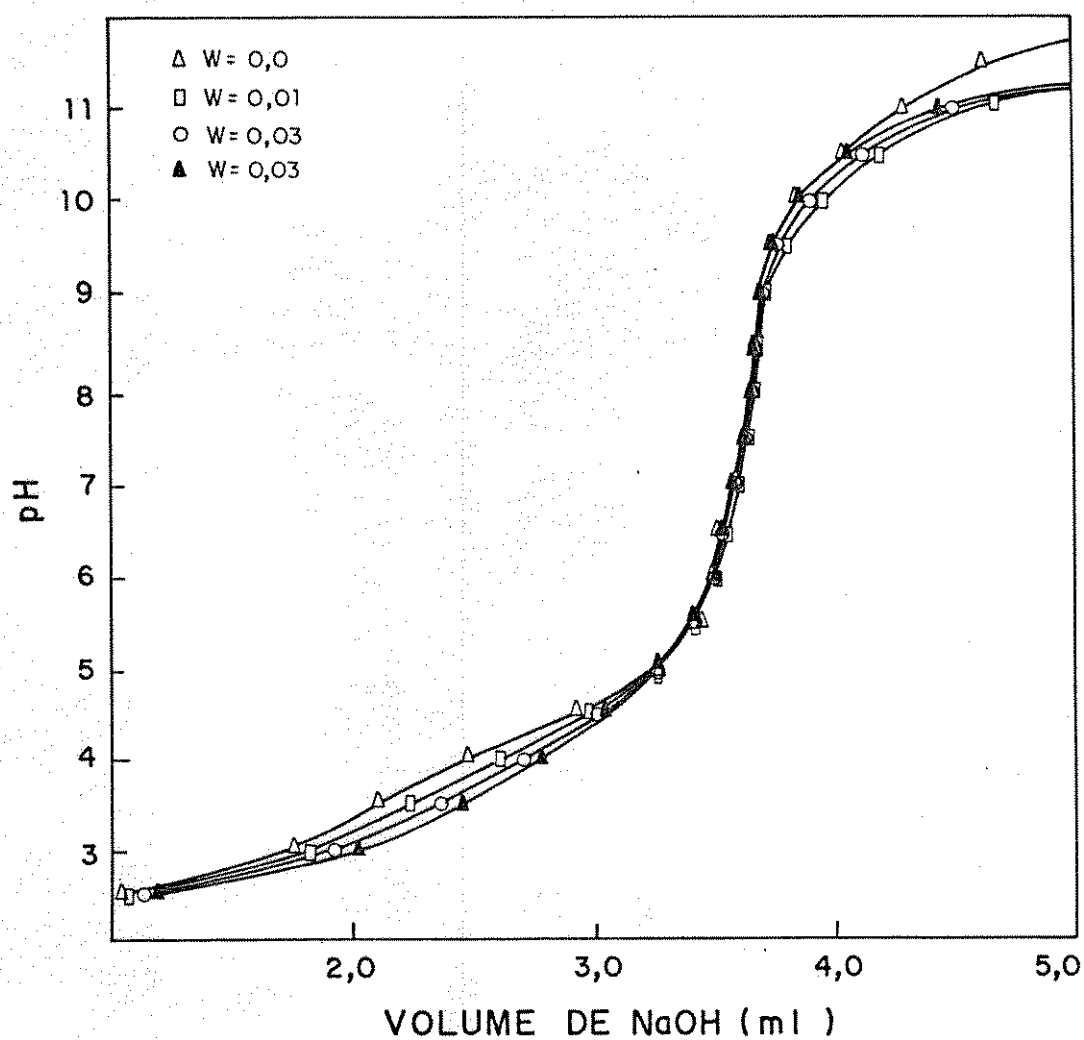


Figura 9: Curvas de titulação teóricas da proteína, segundo o modelo de Linderstrom-Lang, calculadas pelas Equações 40 e 41

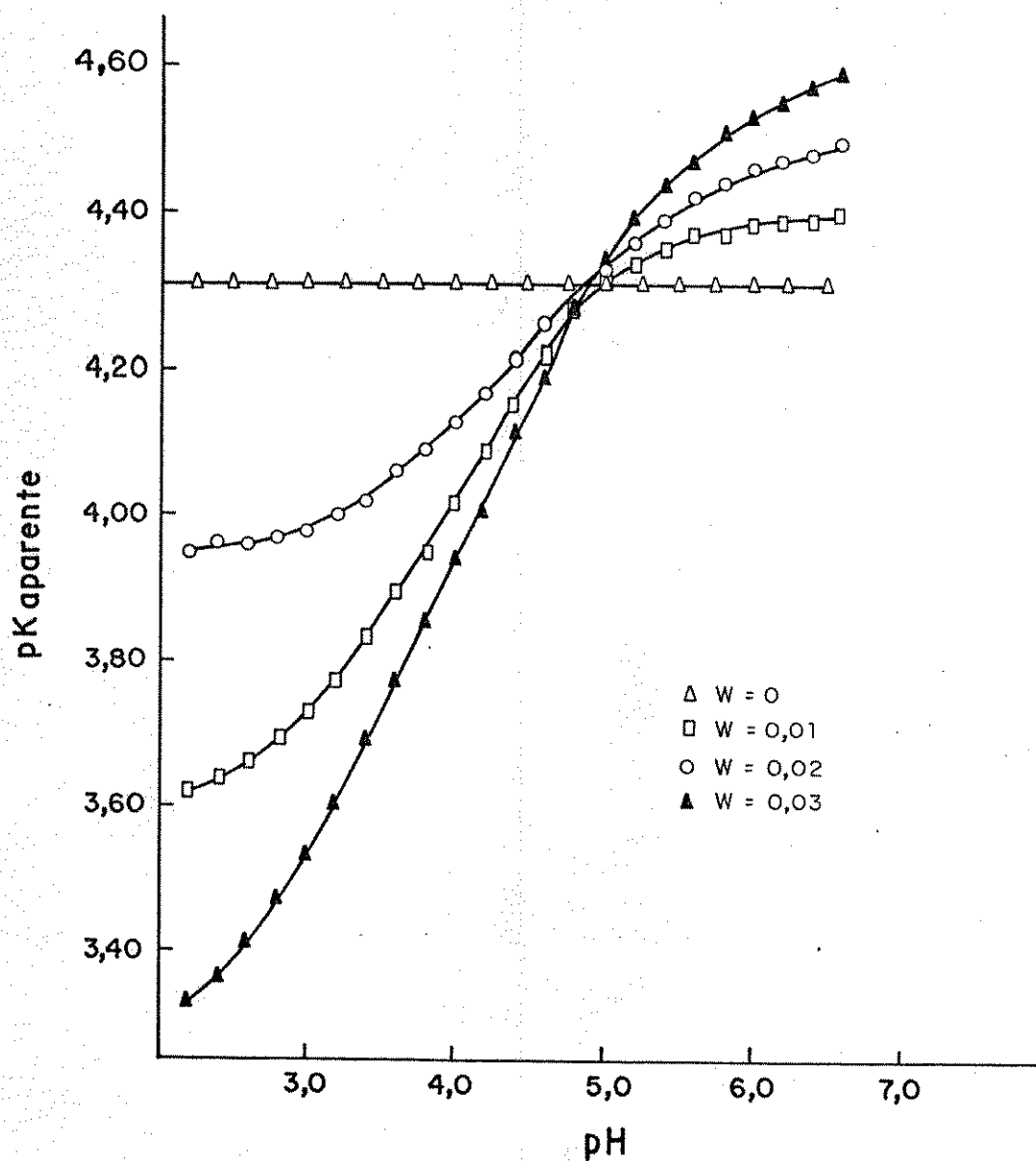


Figura 10: Variação do $pK_{aparente}$ dos grupos carboxílicos com o pH , calculada pela Equação 12

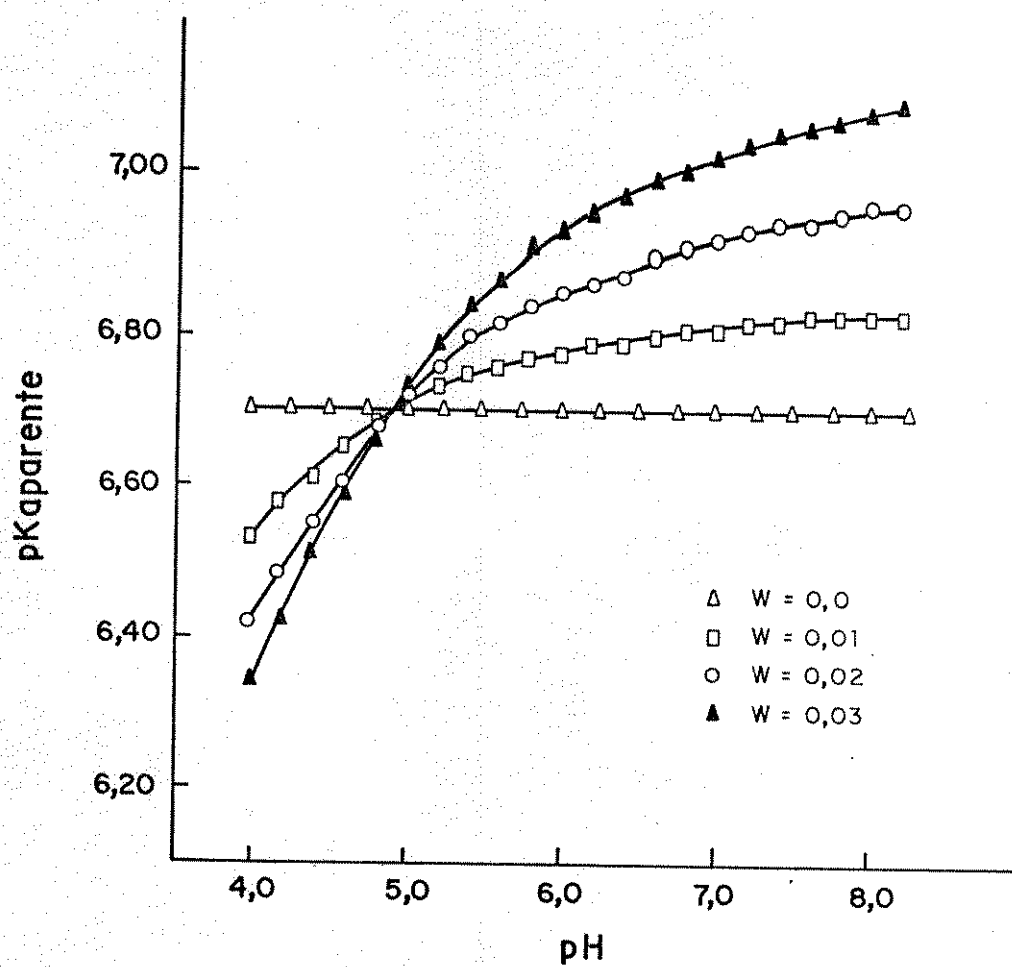


Figura 11: Variação do $pK_{aparente}$ dos grupos imidazóis com o pH , calculada pela Equação 12

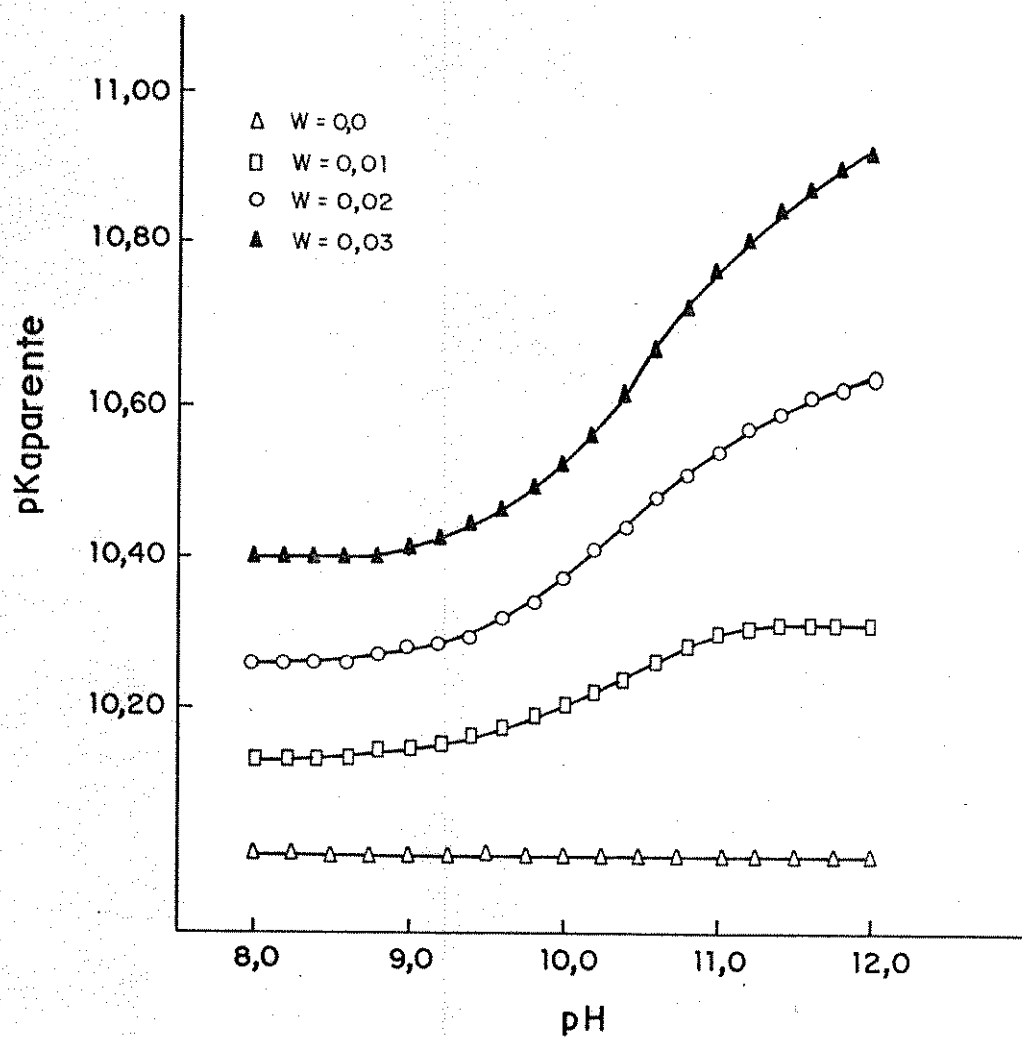


Figura 12: Variação do $pK_{aparente}$ dos grupos aminos com o pH , calculada pela Equação 12

Tabela 5: Dados da curva de titulação da proteína, admitindo-se $W = 0,03$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
1	0.201	2.2	32	3.357	5.3	63	3.680	8.4
2	0.594	2.3	33	3.384	5.4	64	3.684	8.5
3	0.919	2.4	34	3.409	5.5	65	3.687	8.6
4	1.190	2.5	35	3.430	5.6	66	3.691	8.7
5	1.416	2.6	36	3.449	5.7	67	3.695	8.8
6	1.606	2.7	37	3.466	5.8	68	3.700	8.9
7	1.767	2.8	38	3.482	5.9	69	3.706	9.0
8	1.906	2.9	39	3.495	6.0	70	3.713	9.1
9	2.027	3.0	40	3.508	6.1	71	3.721	9.2
10	2.132	3.1	41	3.519	6.2	72	3.731	9.3
11	2.228	3.2	42	3.529	6.3	73	3.743	9.4
12	2.315	3.3	43	3.540	6.4	74	3.757	9.5
13	2.394	3.4	44	3.549	6.5	75	3.773	9.6
14	2.466	3.5	45	3.559	6.6	76	3.792	9.7
15	2.536	3.6	46	3.569	6.7	77	3.813	9.8
16	2.603	3.7	47	3.578	6.8	78	3.838	9.9
17	2.665	3.8	48	3.588	6.9	79	3.866	10.0
18	2.725	3.9	49	3.597	7.0	80	3.898	10.1
19	2.785	4.0	50	3.607	7.1	81	3.933	10.2
20	2.840	4.1	51	3.615	7.2	82	3.973	10.3
21	2.894	4.2	52	3.624	7.3	83	4.018	10.4
22	2.947	4.3	53	3.632	7.4	84	4.067	10.5
23	2.998	4.4	54	3.639	7.5	85	4.124	10.6
24	3.047	4.5	55	3.646	7.6	86	4.188	10.7
25	3.094	4.6	56	3.652	7.7	87	4.261	10.8
26	3.139	4.7	57	3.657	7.8	88	4.346	10.9
27	3.182	4.8	58	3.662	7.9	89	4.445	11.0
28	3.222	4.9	59	3.666	8.0	90	4.562	11.1
29	3.260	5.0	60	3.670	8.1	91	4.871	11.2
30	3.295	5.1	61	3.674	8.2	92	5.079	11.4
31	3.328	5.2	62	3.677	8.3			

Tabela 6: Funções de Gran modificadas calculadas pelas Equações 36 e 37 para os dados da Tabela 5 ($W = 0,03$)

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.201	2.200	1.8733E-01	1.8619E-01	6.1607E-01
0.594	2.300	1.4932E-01	1.4925E-01	4.4039E-02
0.919	2.400	1.1809E-01	1.1871E-01	-5.1510E-01
1.190	2.500	9.2433E-02	9.3235E-02	-8.5996E-01
1.416	2.600	7.1253E-02	7.1995E-02	-1.0305E+00
1.606	2.700	5.3634E-02	5.4137E-02	-9.3018E-01
1.767	2.800	3.8802E-02	3.9006E-02	-5.2160E-01
1.906	2.900	2.6116E-02	2.5942E-02	6.7102E-01
2.027	3.000	1.5046E-02	1.4570E-02	3.2684E+00
2.132	3.100	5.1681E-03	4.7011E-03	9.9353E+00
2.228	3.200	-3.8408E-03	-4.3215E-03	-1.1123E+01
2.315	3.300	-1.2224E-02	-1.2498E-02	-2.1927E+00
2.394	3.400	-2.0146E-02	-1.9923E-02	1.1171E+00
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
2.1820	7.2734E-03		-0.9999605	9.3985E-02
Para HA 1				
N1 = 15 N2 = 10				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.536	3.600	1.1709E-04	1.1477E-04	2.0259E+00
2.603	3.700	9.8895E-05	9.7816E-05	1.1038E+00
2.665	3.800	8.1460E-05	8.2126E-05	-8.1124E-01
2.725	3.900	6.5326E-05	6.6943E-05	-2.4168E+00
2.785	4.000	5.0514E-05	5.1760E-05	-2.4080E+00
2.840	4.100	3.6335E-05	3.7843E-05	-3.9831E+00
2.894	4.200	2.3051E-05	2.4178E-05	-4.6635E+00
2.947	4.300	1.0449E-056	1.0766E-05	-2.9463E+00
2.998	4.400	-1.6811E-06	-2.1391E-06	-2.1411E+00
3.047	4.500	-1.3445E-05	-1.4539E-05	-7.5220E+00
3.094	4.600	-2.4906E-05	-2.6432E-05	-5.7736E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.80753	2.6918E-03	3.59679	2.5305E-04	-0.99957532

continua

Para HA2				
N1 = 30 N2 = 12				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.295	5.100	2.9482E-06	2.9014E-06	1.6128E+00
3.328	5.200	2.5019E-06	2.4798E-06	8.9256E-01
3.357	5.300	2.0935E-06	2.1092E-06	-7.4710E-01
3.384	5.400	1.7351E-06	1.7642E-06	-1.6509E+00
3.409	5.500	1.4223E-06	1.4448E-06	-1.5574E+00
3.430	5.600	1.1449E-06	1.1765E-06	-2.6789E+00
3.449	5.700	9.0481E-07	9.3369E-07	-3.0927E+00
3.466	5.800	6.9587E-07	7.1647E-07	-2.8760E+00
3.482	5.900	5.1362E-07	5.1203E-07	3.0942E-01
3.495	6.000	3.4990E-07	3.4593E-07	1.1468E+00
3.508	6.100	2.0290E-07	1.7982E-07	1.2834E+01
3.519	6.200	6.5891E-08	3.9265E-08	6.7812E+01
3.529	6.300	-6.4350E-08	-8.8508E-08	-2.7295E+01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.53253	1.7751E-03	4.89355	1.2777E-05	-0.99962622

Para HA 3				
N1 = 47 N2 = 15				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.578	6.800	1.0683E-08	1.0408E-08	2.6431E+00
3.588	6.900	9.5478E-09	9.3479E-09	2.1387E+00
3.597	7.000	8.3504E-09	8.3936E-09	-5.1435E-01
3.607	7.100	7.3324E-09	7.3333E-09	-1.2402E-02
3.615	7.200	6.2565E-09	6.4851E-09	-3.5241E+00
3.624	7.300	5.3599E-09	5.5308E-09	-3.0892E+00
3.632	7.400	4.5192E-09	4.6826E-09	-3.4879E+00
3.639	7.500	3.7528E-09	3.9404E-09	-4.7588E+00
3.646	7.600	3.0926E-09	3.1982E-09	-3.3019E+00
3.652	7.700	2.5016E-09	2.5620E-09	-2.3552E+00
3.657	7.800	1.9773E-09	2.0318E-09	-2.6844E+00
3.662	7.900	1.5251E-09	1.5017E-09	1.5605E+00
3.666	8.000	1.1181E-09	1.0776E-09	3.7665E+00
3.670	8.100	7.5505E-10	6.5342E-10	1.5555E+01
3.674	8.200	4.2044E-10	2.2931E-10	8.3354E+01
3.677	8.300	9.4715E-11	-8.8789E-11	-2.0667E+02
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.15409	5.1363E-04	6.97457	1.0603E-07	-0.99895078

continua

Para HA4				
N1 = 72 N2 = 10				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.731	9.300	1.4453E-11	1.4238E-11	1.5100E+00
3.743	9.400	1.2765E-11	1.2630E-11	1.0663E+00
3.757	9.500	1.0802E-11	1.0754E-11	4.4547E-01
3.773	9.600	8.4864E-12	8.6099E-12	-1.4352E+00
3.792	9.700	5.9828E-12	6.0638E-12	-1.3347E+00
3.813	9.800	2.9937E-12	3.2496E-12	-7.8758E+00
3.838	9.900	-2.1755E-13	-1.0064E-13	1.1616E+02
3.866	10.000	-3.9080E-12	-3.8529E-12	1.4314E+00
3.898	10.100	-8.0462E-12	-8.1412E-12	-1.1667E+00
3.933	10.200	-1.2792E-11	-1.2832E-11	-3.0716E-01
3.973	10.300	-1.8091E-11	-1.8192E-11	-5.5475E-01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.16109	5.3695E-04	9.87287	1.3401E-10	-0.99991781
Para HA5				
N1 = 83 N2 = 6				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
4.018	10.400	4.4135E-12	4.3628E-12	1.1604E+00
4.067	10.500	3.4813E-12	3.5014E-12	-5.7609E-01
4.124	10.600	2.4906E-12	2.4994E-12	-3.5064E-01
4.188	10.700	1.3532E-12	1.3742E-12	-1.5330E+00
4.261	10.800	6.1229E-14	9.0893E-14	-3.2636E+01
4.346	10.900	-1.4065E-12	-1.4034E-12	2.2101E-01
4.445	11.000	-3.1117E-12	-3.1438E-12	-1.0222E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.42892	1.4297E-03	10.75498	1.7580E-11	-0.99993801
Número de iterações = 79				

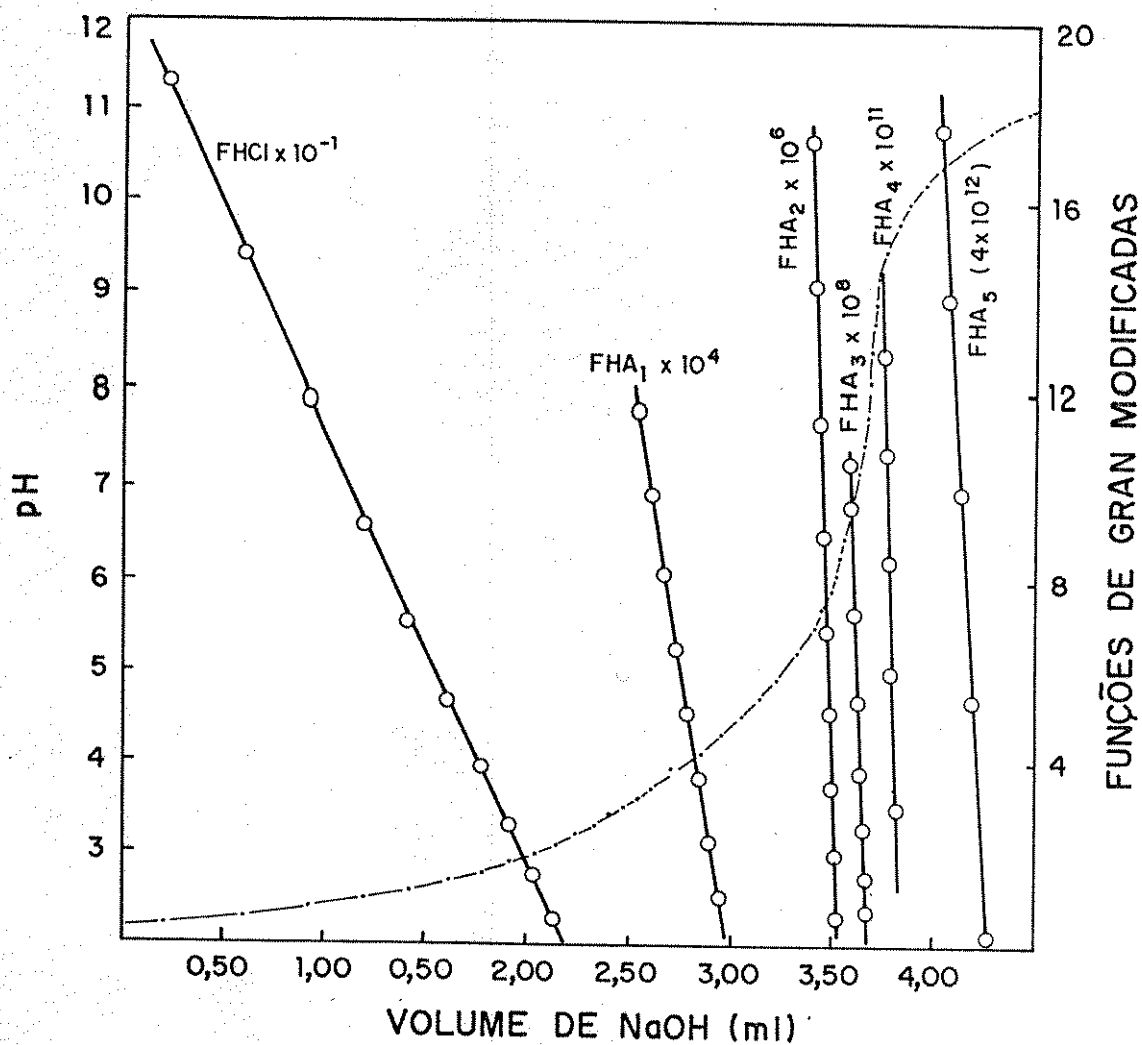


Figura 13: Curva de titulação da Tabela 5, segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 6 ($W = 0,03$)

Tabela 7: Resultados obtidos pela aplicação do método de linearização às curvas de titulação teóricas, geradas para a proteína com composição dada na Tabela 1, segundo a teoria de Linderstrom-Lang

Série	Coeficiente de interação eletrostática							
	0		0,01		0,02		0,03	
	N.G.mol ⁻¹	pKa	N.G.mol ⁻¹	pKa	N.G.mol ⁻¹	pKa	N.G.mol ⁻¹	pKa
HA ₁	51,0	4,30	30,3	3,86	29,0	3,87	26,9	3,60
HA ₂			19,8	4,70	19,4	4,81	17,7	4,89
HA ₁ +HA ₂	51,0		50,1		48,4		44,6	
HA ₃	5,0	6,70	5,0	6,81	5,0	6,94	5,1	6,97
HA ₄	22,0	10,00	6,7	9,81	6,9	9,89	5,4	9,87
HA ₅			15,0	10,38	14,0	10,63	14,3	10,75
HA ₄ +HA ₅	22,0		21,7		20,9		19,7	

Novamente se observou que, quanto mais intensas forem as interações eletrostáticas, maior é a variação do pK_{aparente} dos grupos estudados, conforme as Figuras 10, 11 e 12. Os grupos carboxílicos são os que sofrem maior influência da carga e do coeficiente de interação eletrostática, pois são titulados em uma região de pH em que a carga varia mais bruscamente, conforme indicado pela Figura 8. O pK_{aparente} dos grupos aminos sofre uma variação menos intensa com a mudança do pH (Figura 12) em consequência de uma menor variação da carga na região de pH em que são titulados estes grupos (Figura 8). A Figura 11 mostra que a variação do pK_{aparente} dos grupos imidazóis é bem pouco significativa, uma vez que na região de pH entre 6 e 8 a carga varia muito pouco, como pode ser visto na Figura 8.

Os resultados obtidos pela aplicação do método de linearização aos dados das curvas de titulação teóricas são mostradas na Tabela 7. Pode-se observar, neste caso, que existe uma

forte influência do aumento do coeficiente de interação eletrostática na determinação quantitativa dos grupos carboxílicos e aminos. Assim, a soma dos grupos pertencentes as séries HA_1 e HA_2 , ou seja, grupos carboxílicos, deveria corresponder a $51,0 \text{ grupos.mol}^{-1}$, que é o número com o qual as curvas foram geradas, independentemente do valor do coeficiente de interação eletrostática. Da mesma maneira, a soma dos grupos pertencentes às séries HA_4 e HA_5 (grupos aminos) deveria corresponder a $22 \text{ grupos.mol}^{-1}$. Os grupos pertencentes à série HA_3 , referentes aos grupos imidazóis, foram determinados quantitativamente, apenas com pK_a acima do valor com o qual as curvas foram geradas, em razão da influência das interações eletrostáticas.

Pelos resultados obtidos pode-se supor que o coeficiente de interação eletrostática, aliado a uma carga altamente positiva, quando todos os grupos da proteína estão protonados, favorece fortemente a dissociação de grupos carboxílicos, diminuindo seus pK_a 's, de modo que parte destes grupos podem ser titulados juntamente com o excesso de ácido forte. Essa possibilidade pode ser verificada pela forte variação do pK_{aparente} dos grupos carboxílicos dada na Figura 10 e pelos dados da Tabela 8, onde é mostrado um erro sistemático positivo, crescente com o aumento do coeficiente de interação eletrostática, no volume de equivalência do ácido forte.

Na Tabela 8 também é mostrado que o número de grupos carboxílicos envolvidos na diferença de volumes de equivalência esperado e obtidos para o ácido forte, equivale ao erro observado na determinação quantitativa destes grupos, soma de HA_1 e HA_2 .

Com relação aos grupos aminos, representados nas séries HA_4 e HA_5 da Tabela 7,

Tabela 8: Diferença entre V_{HA_0} esperado e obtido para curvas de titulação teóricas. Número de grupos envolvidos nesta diferença

	Coeficiente de interação eletrostática			
	0	0,01	0,02	0,03
V_{HA_0} esperado (ml)	2,000	2,000	2,000	2,000
V_{HA_0} obtido (ml)	2,000	2,027	2,080	2,182
ΔV_{HA_0} (ml)	0,000	0,027	0,080	0,182
$\frac{\Delta V_{HA_0} \cdot C_B}{V_0 C_P}$ (grupos.mol ⁻¹)	0	0,9	2,7	6,1

observa-se um fenômeno semelhante ao que ocorre com os grupos carboxílicos. Assim, na região de pH em que são titulados, a carga negativa da molécula e o coeficiente de interação eletrostática aumentam o $pK_{aparente}$ dos grupos aminos, de modo que parte deste grupos comportam-se como ácidos muito fracos, permanecendo protonados em pH 's acima de 11. Observa-se que quanto mais intensas forem as interações eletrostáticas maior é o número de grupos aminos que tendem a apresentar tal comportamento, não sendo determinados pelo método de linearização.

Deste modo, se a principal influência sofrida pelas constantes de dissociação dos grupos for de natureza puramente eletrostática, como previsto pela teoria de Linderstrom-Lang, a aplicação do método de linearização às curvas de titulação de proteínas seria limitada na determinação quantitativa dos grupos carboxílicos e aminos, principalmente se a proteína fosse titulada em soluções de baixa força iônica (interações eletrostáticas mais intensas).

Um estudo teórico posterior foi a retirada da função de Gran modificada para o ácido forte do programa visando-se eliminar o problema de sua sobreposição com grupos carboxílicos.

Deste modo os grupos tituláveis da proteína continuariam sendo tratados como uma mistura de ácidos fracos monoproticos, mas agora não se consideraria a presença do excesso de ácido forte. Curvas teóricas foram geradas admitindo-se esta consideração para a proteína com composição dada na Tabela 1. O tratamento dos dados destas curvas pelo método de linearização permitiu a obtenção dos resultados mostrados a Tabela 9. De acordo com estes resultados, pode-se observar que os grupos carboxílicos foram determinados quantitativamente em excelente concordância com o número usado para gerar as curvas. Observa-se também que o pK_a da série HA_1 diminui drasticamente com o aumento das interações eletrostáticas, o que pode realmente indicar que alguns grupos carboxílicos são titulados como ácido forte quando este está presente.

Tabela 9: Estequiometria e pK_a 's dos grupos determinados sem a presença de excesso de ácido forte

Série	Coeficiente de interação eletrostática					
	0,01		0,02		0,03	
	N.G.mol ⁻¹	pK_a	N.G.mol ⁻¹	pK_a	N.G.mol ⁻¹	pK_a
HA_1	25,9	3,72	26,8	3,44	20,6	3,01
HA_2	25,1	4,62	24,0	4,71	21,3	4,24
HA_3					9,2	5,23
$HA_1+HA_2+HA_3$	51,0		50,8		51,1	
HA_4	5,0	6,82	5,1	6,91	4,7	7,06
HA_5	9,1	9,89	6,8	9,88	5,1	9,88
HA_6	12,8	10,45	14,2	10,63	14,3	10,73
HA_5+HA_6	21,9		21,0		19,4	

Por outro lado, a determinação dos grupos aminos continua sendo afetada, observando-se um aumento do pK_a da série HA_6 (Tabela 9) ou HA_5 (Tabela 8) com o aumento do coeficiente de interação eletrostática.

Segundo este último estudo, uma técnica experimental adequada para determinação quantitativa dos grupos carboxílicos seria titular a proteína totalmente protonada, mas sem o excesso de ácido forte. Isto poderia ser conseguido pelo uso de resinas trocadoras fortemente ácidas, ou por adição de excesso de ácido seguida de diálise contra água. Tentativas neste sentido, porém, não se mostraram eficientes.

Paralelamente aos estudos teóricos, fez-se um levantamento dos resultados obtidos pela aplicação do método de linearização a titulações experimentais de proteínas em soluções de *KCl* 0,10 e 1,0 *M*, que refletiriam a influência das interações eletrostáticas sobre os resultados. Na Tabela 10 são mostrados os valores da estequiometria dos grupos carboxílicos determinados para lisozima, ovalbumina e β -lactoglobulina em força iônica 0,1 e 1,0. Na Tabela 11 são mostradas as estequiometrias para o total de grupos titulados na região alcalina das titulações para as mesmas proteínas.

Tabela 10: Número de grupos carboxílicos por *mol* de proteína determinada pelo método de linearização

Proteína	Meio Iônico		Ref.
	<i>KCl</i> 0,10 <i>M</i>	<i>KCl</i> 1,0 <i>M</i>	
Lisozima	10,7 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,1	32
Ovalbumina*	39,2 $\pm$ 0,4	46,2 $\pm$ 0,3	—
β -Lactoglobulina	46,2 $\pm$ 1,6	51,7 $\pm$ 0,7	33

* Resultados obtidos neste trabalho

Os resultados das Tabelas 10 e 11 indicam que a influência da variação de energia livre eletrostática que acompanha a dissociação é bem maior para os grupos carboxílicos do

Tabela 11: Número de grupos por *mol* de proteína titulados na região alcalina determinados pelo método de linearização

Proteína	Meio Iônico		Ref.
	<i>KCl</i> 0,10 <i>M</i>	<i>KCl</i> 1,0 <i>M</i>	
Lisozima	$3,2 \pm 0,2$	$3,29 \pm 0,01$	32
Ovalbumina*	$25,7 \pm 1,4$	$26,0 \pm 0,3$	–
β -Lactoglobulina	$34,5 \pm 1,7$	$34,70 \pm 0,02$	33

* Resultados obtidos neste trabalho

que para os grupos aminos. Deste modo a determinação quantitativa dos grupos carboxílicos em titulações experimentais pelo método de linearização em diferentes condições de força iônica parecem seguir exatamente o que foi observado nos estudos teóricos. Por outro lado, o número de grupos determinados na região alcalina da titulação parece não ser afetado pela força iônica da solução, ao contrário do que foi observado nos estudos teóricos.

Uma observação mais atenta do comportamento das funções de Gran modificadas para o ácido forte, F_{HA_0} , e para as classes de grupos carboxílicos, F_{HA_1} e F_{HA_2} , mostra um pequeno desvio da linearidade destas funções, principalmente nas titulações realizadas em *KCl* 0,10 *M*. Este comportamento pode indicar uma escolha não apropriada de pontos para caracterizar tais funções [12,13,72]. Por outro lado, como o número de pontos tomados neste experimentos não permitiam mais alterações, optou-se pela realização de novas titulações na presença de um maior excesso de ácido forte, iniciando-se a titulação em *pH* 2,0 e tomando-se um grande número de pontos em toda curva de titulação, particularmente na região entre *pH* 3 e 5. Deste modo, na região de *pH* entre 2 e 11 foram tomados cerca de 150 pontos, o que

permitiu uma definição mais adequada do número de séries de grupos presentes, bem como de suas respectivas funções lineares.

Escolheu-se a lisozima e a ovalbumina para realização destas titulações por serem proteínas muito estáveis conformacionalmente em toda região de pH estudada, bem como por terem a composição de aminoácidos [73,74] e o comportamento ácido-base muito bem estudado.

As titulações foram realizadas em triplicata em soluções de KCl 0,10 M e 1,0 M . Os dados de uma curva de titulação de lisozima em KCl 0,10 M são dados na Tabela 12 e as funções de Gran modificadas para esta titulação aparecem na Tabela 13. A curva de titulação segmentada e linearizada é mostrada na Figura 14. Quanto às titulações em KCl 1,0 M foram usados dados obtidos por Hora Alves [75] e são mostrados da Tabela 14. As funções de Gran modificadas são mostradas na Tabela 15 e a curva de titulação segmentada e linearizada aparece na Figura 15.

Quanto à ovalbumina os dados das curvas de titulação em KCl 0,10 e 1,0 M são mostrados nas Tabelas 16 e 18. As funções de Gran modificadas para estas titulações são dadas nas Tabelas 17 e 19 e as curvas de titulação segmentadas e linearizadas aparecem nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Os resultados da aplicação do método de linearização a estas curvas de titulação são mostrados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente para lisozima e ovalbumina, juntamente com a composição de aminoácidos. A Tabela 22 mostra os resultados obtidos para β -lactoglobulina

cujos dados obtidos por Hora Alves [75] foram recalculados.

Tabela 12: Dados da curva de titulação de 4,007 ml de solução de lisozima $1,607 \times 10^{-4}$ com solução de NaOH 0,01293 M em KCl 0,10 M. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos: $E_a^0 = 223,0 \text{ mV}$; $J_H = 0 \text{ mV.M}^{-1}$; $J_{OH} = 550,8 \text{ mV.M}^{-1}$ e $K_W = 2,101 \times 10^{-14}$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
1	0.000	2.331	36	1.900	4.645	71	2.205	8.172
2	0.050	2.351	37	1.920	4.714	72	2.210	8.284
3	0.100	2.371	38	1.940	4.793	73	2.215	8.372
4	0.200	2.410	39	1.960	4.876	74	2.220	8.473
5	0.300	2.452	40	1.970	4.984	75	2.225	8.573
6	0.400	2.498	41	2.000	5.064	76	2.230	8.659
7	0.500	2.544	42	2.010	5.116	77	2.235	8.740
8	0.600	2.593	43	2.020	5.165	78	2.240	8.811
9	0.700	2.647	44	2.030	5.224	79	2.250	8.945
10	0.800	2.706	45	2.040	5.290	80	2.260	9.050
11	0.900	2.770	46	2.050	5.356	81	2.270	9.146
12	1.000	2.841	47	2.060	5.427	82	2.280	9.229
13	1.100	2.924	48	2.070	5.503	83	2.290	9.307
14	1.200	3.020	49	2.080	5.593	84	2.300	9.380
15	1.250	3.073	50	2.090	5.689	85	2.310	9.441
16	1.300	3.132	51	2.100	5.801	86	2.320	9.497
17	1.350	3.198	52	2.110	5.916	87	2.340	9.602
18	1.400	3.272	53	2.115	5.977	88	2.360	9.695
19	1.450	3.352	54	2.120	6.045	89	2.380	9.774
20	1.500	3.448	55	2.125	6.120	90	2.400	9.849
21	1.525	3.499	56	2.130	6.200	91	2.420	9.910
22	1.550	3.556	57	2.135	6.296	92	2.440	9.964
23	1.575	3.614	58	2.140	6.396	93	2.460	10.010
24	1.600	3.680	59	2.146	6.528	94	2.480	10.056
25	1.650	3.822	60	2.150	6.624	95	2.500	10.102
26	1.675	3.898	61	2.155	6.758	96	2.520	10.153
27	1.700	3.977	62	2.160	6.895	97	2.550	10.201
28	1.725	4.053	63	2.165	7.038	98	2.600	10.284
29	1.750	4.138	64	2.170	7.184	99	2.650	10.359
30	1.775	4.217	65	2.175	7.334	100	2.700	10.422
31	1.800	4.302	66	2.180	7.474	101	2.800	10.529
32	1.820	4.362	67	2.185	7.611	102	2.900	10.615
33	1.840	4.432	68	2.190	7.757	103	3.000	10.687
34	1.860	4.501	69	2.195	7.902	104	3.100	10.749
35	1.880	4.569	70	2.200	8.044	105	3.200	10.803

Tabela 13: Funções de Gran modificadas para os dados da curva de titulação da Tabela 12

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.000	2.331	1.8650E-02	1.8593E-02	5.6233E-05
0.050	2.351	1.8028E-02	1.8017E-02	1.1344E-05
0.100	2.371	1.7424E-02	1.7440E-02	-1.5832E-05
0.200	2.410	1.6306E-02	1.6287E-02	1.9316E-05
0.300	2.452	1.5144E-02	1.5134E-02	1.0162E-05
0.400	2.496	1.3989E-02	1.3980E-02	9.0487E-06
0.500	2.544	1.2794E-02	1.2826E-02	-3.3073E-05
0.600	2.593	1.1665E-02	1.1674E-02	-9.3393E-06
0.700	2.647	1.0502E-02	1.0521E-02	-1.8762E-05
0.800	2.706	9.3348E-03	9.3675E-03	-3.2691E-05
0.900	2.770	8.1886E-03	8.2143E-03	-2.5697E-05
1.000	2.841	7.9595E-03	7.0610E-03	-1.9565E-05
1.100	2.924	5.8784E-03	5.9078E-03	-2.9434E-05
1.200	3.020	4.7183E-03	4.7546E-03	-3.6282E-05
1.250	3.073	4.1577E-03	4.1780E-03	-2.0277E-05
1.300	3.132	3.5906E-03	3.6013E-03	-1.0706E-05
1.350	3.198	3.0201E-03	3.0247E-03	-4.6401E-06
1.400	3.272	2.4502E-03	2.4481E-03	2.0992E-06
1.450	3.352	1.9050E-03	1.8715E-03	3.3536E-05
1.500	3.448	1.3268E-03	1.2949E-03	3.1891E-05
1.525	3.499	1.0476E-03	1.0066E-03	4.0998E-05
1.550	3.556	7.5339E-04	7.1827E-04	3.5121E-05
1.575	3.614	4.7063E-04	4.2996E-04	4.0673E-05
1.600	3.680	1.6421E-04	1.4165E-04	2.2561E-05
1.650	3.822	-4.5644E-04	-4.3496E-04	-2.1476E-05
1.675	3.896	-7.6744E-04	-7.2327E-04	-4.4170E-05
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
1.6123	5.2013E-03		-0.9999907	1.1532E-02

continua

Para HA 1				
N1 = 30 N2 = 15				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.775	4.217	1.2087E-05	1.1949E-05	1.3778E-07
1.800	4.302	1.0784E-05	1.0815E-05	-3.1077E-08
1.820	4.362	1.0006E-05	9.9072E-06	9.9132E-08
1.840	4.432	8.9835E-06	8.9996E-06	-1.6025E-08
1.860	4.501	8.0374E-06	8.0919E-06	-5.4496E-08
1.880	4.569	7.1604E-06	7.1843E-06	-2.3934E-08
1.900	4.645	6.1785E-06	6.2767E-06	-9.8222E-08
1.920	4.714	5.3842E-06	5.3690E-06	1.5191E-08
1.940	4.793	4.4810E-06	4.4614E-06	1.9588E-08
1.960	4.876	3.5929E-06	3.5538E-06	3.9123E-08
1.970	4.964	2.6081E-06	3.1000E-06	-4.9182E-07
2.000	5.064	1.7904E-06	1.7385E-06	5.1876E-08
2.010	5.116	1.3434E-06	1.2847E-06	5.8672E-08
2.020	5.165	9.4799E-07	8.3089E-07	1.1710E-07
2.030	5.224	4.8442E-07	3.7708E-07	1.0734E-07
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.42603	0.1374E-02	4.34312	0.4538E-04	-0.99930447
Para HA 2				
N1 = 48 N2 = 13				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.070	5.503	2.8985E-07	2.8201E-07	7.8442E-09
2.080	5.593	2.4658E-07	2.4520E-07	1.3829E-09
2.090	5.689	2.0662E-07	2.0839E-07	-1.7633E-09
2.100	5.801	1.6524E-07	1.7158E-07	-6.3394E-09
2.110	5.916	1.3010E-07	1.3477E-07	-4.6755E-09
2.115	5.977	1.1359E-07	1.1637E-07	-2.7781E-09
2.120	6.043	9.6979E-08	9.7963E-08	-9.8339E-10
2.125	6.120	7.8868E-08	7.9558E-08	-6.9042E-10
2.130	6.200	6.1895E-08	6.1154E-08	7.4192E-10
2.135	6.296	4.3131E-08	4.2750E-08	3.8108E-10
2.140	6.398	2.5162E-08	2.4344E-08	8.1718E-10
2.146	6.528	4.3516E-09	2.2601E-09	2.0915E-09
2.150	6.624	-1.0054E-08	-1.2464E-08	2.4099E-09
2.155	6.758	-2.9311E-08	-3.0867E-08	1.5566E-09
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.10830	0.3494E-03	5.43405	0.3681E-05	-0.99938273
continua				

Para HA 3				
N1 = 47 N2 = 15				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.160	6.895	2.4230E-09	2.3675E-09	5.5493E-11
2.165	7.039	1.9455E-09	1.9431E-09	2.3661E-12
2.170	7.184	1.4853E-09	1.5187E-09	-3.3438E-11
2.175	7.334	1.0344E-09	1.0943E-09	-5.9991E-11
2.180	7.474	6.4447E-10	6.6997E-10	-2.5501E-11
2.185	7.611	2.6725E-10	2.4561E-10	2.1647E-11
2.190	7.757	-1.5032E-10	-1.7877E-10	2.8457E-11
2.195	7.902	-5.8298E-10	-6.0314E-10	2.0158E-11
2.200	8.044	-1.0367E-09	-1.0275E-09	-9.1944E-12
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.04128	0.1332E-03	7.07122	0.8487E-07	-0.99952734
Para HA 4				
N1 = 70 N2 = 9				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.200	6.900	9.5478E-09	9.3479E-09	2.1387E+00
2.205	7.000	8.3504E-09	8.3936E-09	-5.1435E-01
2.210	7.100	7.3324E-09	7.3333E-09	-1.2402E-02
2.215	7.200	6.2565E-09	6.4851E-09	-3.5241E+00
2.220	7.300	5.3599E-09	5.5308E-09	-3.0892E+00
2.225	7.400	4.5192E-09	4.6826E-09	-3.4879E+00
2.230	7.500	3.7528E-09	3.9404E-09	-4.7588E+00
2.235	7.600	3.0926E-09	3.1982E-09	-3.3019E+00
2.240	7.700	2.5016E-09	2.5620E-09	-2.3552E+00
2.250	7.800	1.9773E-09	2.0318E-09	-2.6844E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.04608	0.1487E-03	8.45917	0.3474E-08	-0.99907297
Para HA 5				
N1 = 85 N2 = 10				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.310	9.441	1.6455E-11	1.6007E-11	4.487-E-13
2.320	9.497	1.5471E-11	1.4972E-11	4.9857E-13
2.340	9.602	1.3067E-11	1.2904E-11	1.6281E-13
2.360	9.965	1.0590E-11	1.0835E-11	-2.4543E-13
2.380	9.774	8.4120E-12	8.7667E-12	-3.5479E-13
2.400	9.849	5.9453E-12	6.6982E-12	-7.5293E-13
2.420	9.910	4.0298E-12	4.6297E-12	-5.9983E-13
2.440	9.964	2.2375E-12	2.5611E-12	-3.2357E-13
2.460	10.010	7.1643E-13	4.9255E-13	2.2388E-13
2.480	10.056	-1.0967E-12	-1.5760E-12	4.7932E-13
2.500	10.102	-3.1817E-12	-3.6445E-12	4.6286E-13
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.23079	0.7445E-03	9.98536	0.1034E-09	-0.99757916
Número de iterações = 170				

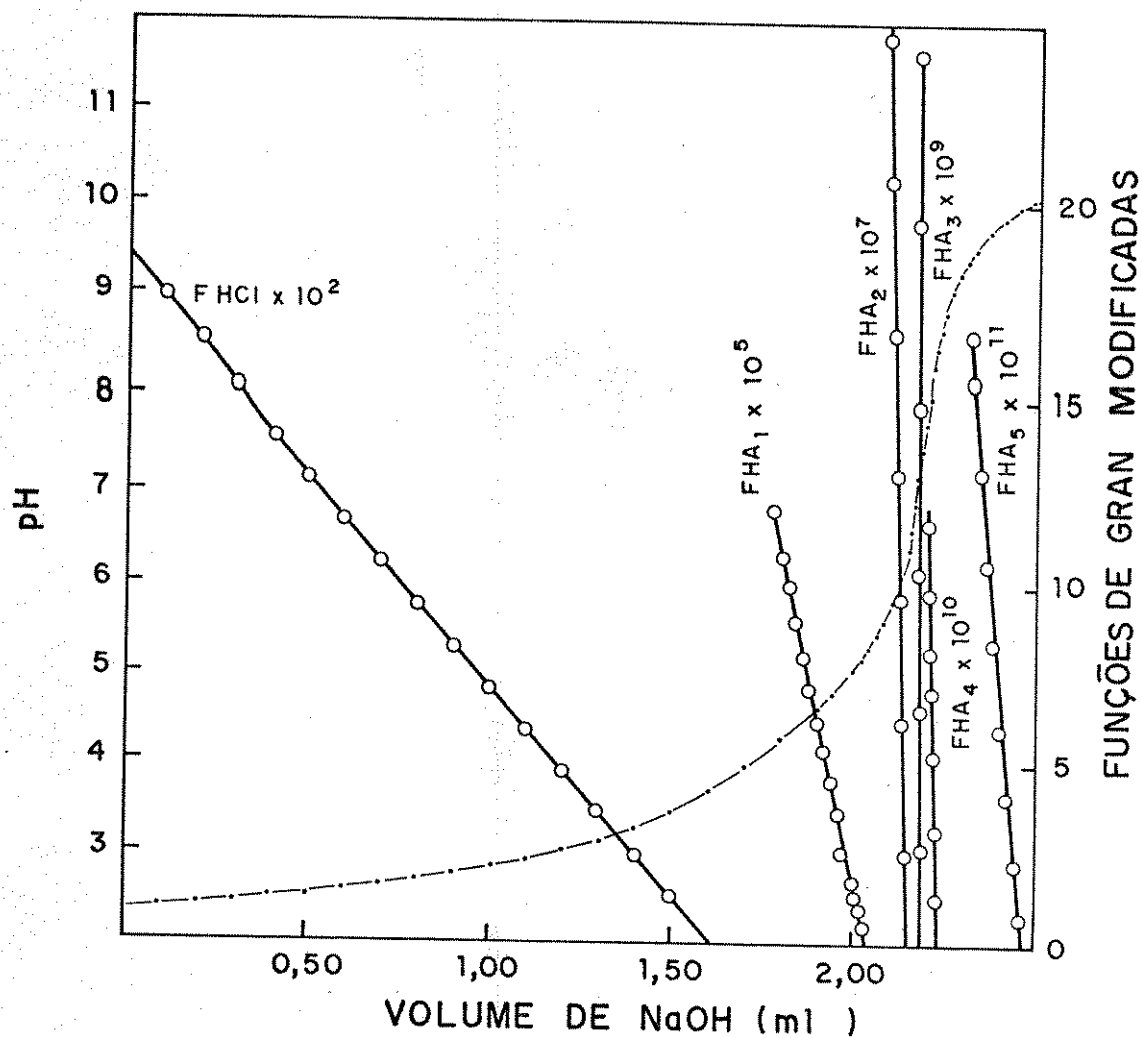


Figura 14: Curva de titulação da lisozima em KCl 0,10 M dada na Tabela 12, segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 13

Tabela 14: Curva de titulação de 30,00 ml de solução $3,290 \times 10^{-4} M$ de lisozima com solução de NaOH 0,1203 M em KCl 1,0 M. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos: $E_a^o = 411,6 \text{ mV}$; $J_H = 0 \text{ mV.M}^{-1}$; $J_{OH} = 372,3 \text{ mV.M}^{-1}$ e $K_W = 1,738 \times 10^{-14}$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
0	0.000	0.000	35	1.340	4.014	70	1.865	6.852
1	0.100	2.419	36	1.360	4.072	71	1.870	6.972
2	0.150	2.441	37	1.380	4.129	72	1.875	7.102
3	0.200	2.464	38	1.400	4.188	73	1.880	7.244
4	0.250	2.491	39	1.420	4.246	74	1.885	7.390
5	0.300	2.517	40	1.440	4.303	75	1.890	7.532
6	0.351	2.545	41	1.465	4.376	76	1.895	7.675
7	0.400	2.574	42	1.480	4.420	77	1.901	7.828
8	0.450	2.606	43	1.500	4.479	78	1.910	8.052
9	0.500	2.638	44	1.520	4.540	79	1.920	8.248
10	0.550	2.676	45	1.540	4.601	80	1.930	8.445
11	0.600	2.714	46	1.566	4.662	81	1.940	8.573
12	0.650	2.755	47	1.580	4.728	82	1.952	8.761
13	0.700	2.801	48	1.600	4.795	83	1.960	8.884
14	0.750	2.850	49	1.620	4.866	84	1.970	9.012
15	0.800	2.904	50	1.642	4.951	85	1.981	9.136
16	0.900	3.027	51	1.662	5.030	86	1.990	9.230
17	0.950	3.101	52	1.680	5.110	87	2.000	9.323
18	1.000	3.184	53	1.700	5.206	88	2.010	9.404
19	1.020	3.220	54	1.720	5.316	89	2.020	9.477
20	1.040	3.255	55	1.740	5.437	90	2.030	9.545
21	1.060	3.296	56	1.761	5.585	91	2.040	9.605
22	1.080	3.336	57	1.780	5.730	92	2.050	9.665
23	1.101	3.382	58	1.800	5.911	93	2.060	9.720
24	1.120	3.424	59	1.810	6.012	94	2.070	9.767
25	1.140	3.470	60	1.815	6.066	95	2.080	9.813
26	1.160	3.519	61	1.820	6.122	96	2.090	9.859
27	1.180	3.568	62	1.825	6.181	97	2.100	9.902
28	1.200	3.620	63	1.830	6.245	98	2.110	9.945
29	1.220	3.674	64	1.835	6.313	99	2.120	9.983
30	1.240	3.729	65	1.840	6.382	100	2.130	10.021
31	1.261	3.788	66	1.845	6.460	101	2.140	10.056
32	1.280	3.840	67	1.850	6.541	102	2.150	10.090
33	1.300	3.898	68	1.855	6.634	103	2.160	10.123
34	1.320	3.957	69	1.860	6.739	104	2.170	10.154
						105	2.180	10.182

Tabela 15: Funções de Gran modificadas para os dados da Tabela 14

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.050	2.397	1.1789E-01	1.1778E-01	9.3382E-02
0.100	2.419	1.1201E-01	1.1201E-01	-1.4834E-03
0.150	2.441	1.0639E-01	1.0623E-01	1.4685E-01
0.200	2.464	1.0079E-01	1.0046E-01	3.2277E-01
0.250	2.491	9.4516E-02	9.4688E-02	-1.8137E-01
0.300	2.517	8.8814E-02	8.8915E-02	-1.1345E-01
0.351	2.545	8.3003E-02	8.3026E-02	-2.7944E-02
0.400	2.574	7.7322E-02	7.7369E-02	-6.0428E-02
0.450	2.606	7.1427E-02	7.1596E-02	-2.3584E-01
0.500	2.638	6.5907E-02	6.5822E-02	1.2821E-01
0.550	2.675	5.9935E-02	6.0049E-02	-1.8313E-01
0.600	2.714	5.4106E-02	5.4276E-02	-3.1393E-02
0.650	2.755	4.8434E-02	4.8503E-02	-1.4310E-01
0.700	2.801	4.2572E-02	4.2730E-02	-3.6917E-01
0.750	2.850	3.6857E-02	3.6957E-02	-2.6970E-01
0.800	2.904	3.1115E-02	3.1184E-02	-2.2196E-01
0.900	3.027	1.9837E-02	1.9638E-02	1.0121E+00
0.950	3.101	1.4018E-02	1.3865E-02	1.1025E+00
1.000	3.184	8.1609E-03	8.0916E-03	8.5717E-01
1.020	3.220	5.8047E-03	5.7824E-03	3.8629E-01
1.040	3.225	3.6069E-03	3.4731E-03	3.8512E+00
1.060	3.296	1.1350E-03	1.1639E-03	-2.4827E+00
1.080	3.336	1.1788E-03	-1.1454E-03	2.9232E+00
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
1.0701	4.2910E-03		-0.9999943	1.1546E-01
Para HA 1				
N1 = 25 N2 = 14				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.120	3.424	6.6659E-05	6.6531E-05	1.9224E-01
1.140	3.470	6.1032E-05	6.0755E-05	4.5686E-01
1.160	3.519	5.5046E-05	5.4978E-05	1.2366E-01
1.180	3.568	4.9444E-05	4.9201E-05	4.9350E-01
1.200	3.620	4.3511E-05	4.3424E-05	1.9898E-01
1.220	3.674	3.7495E-05	3.7647E-05	-4.0464E-01
1.240	3.729	3.1574E-05	3.1871E-05	-9.3230E-01
1.261	3.788	2.5388E-05	2.5805E-05	-1.6162E+00
1.280	3.840	2.0172E-05	2.0317E-05	-7.1338E-01
1.300	3.898	1.4313E-05	1.4540E-05	-1.5627E+00
1.320	3.957	8.4319E-06	8.7636E-06	-3.7853E+00
1.340	4.014	2.8990E-06	2.9868E-06	-2.9405E+00
1.360	4.072	-2.7247E-06	-2.7900E-06	-2.3401E+00
1.380	4.129	-8.2027E-06	-8.5667E-06	-4.2492E+00
1.400	4.188	-1.3917E-05	-1.4343E-05	-2.9734E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.28026	1.1238E-03	3.53934	2.8884E-04	-0.99994850

continua

Para HA2				
N1 = 50 N2 = 11				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.620	4.866	4.1617E-08	4.0795E-06	2.0130E+00
1.642	4.951	3.6098E-06	3.5835E-06	7.3206E-01
1.662	5.030	3.1457E-06	3.1326E-06	4.1822E-01
1.680	5.110	2.7063E-06	2.7268E-06	-7.5030E-01
1.700	5.206	2.2331E-06	2.2759E-06	-1.8804E+00
1.720	5.316	1.7540E-06	1.8250E-06	-3.8877E+00
1.740	5.437	1.3040E-06	1.3740E-06	-5.0971E+00
1.761	5.585	8.4019E-07	9.0058E-07	-6.7057E+00
1.780	5.730	4.6069E-07	4.7221E-07	-2.4381E+00
1.800	5.911	5.4868E-08	2.1289E-08	1.5772E+02
1.810	6.012	-1.4824E-07	-2.0417E-07	-2.7395E+01
1.815	6.066	-2.5173E-07	-3.1690E-07	-2.0566E+01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.45060	1.8069E-03	4.64693	2.2546E-05	-0.99936932
Para HA 3				
N1 = 71 N2 = 6				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.865	6.852	9.4737E-9	9.2387E-09	2.5435E+00
1.870	6.972	7.0672E-09	7.0906E-09	-3.3029E-01
1.875	7.102	4.7988E-09	4.9425E-09	-2.9069E+00
1.880	7.244	2.0643E-09	2.7944E-09	-6.8024E+00
1.885	7.390	5.3538E-10	6.4625E-10	-1.7156E+01
1.890	7.532	-1.4277E-09	-1.5019E-09	-4.9411E+00
1.895	7.675	-3.4910E-09	-3.6500E-09	-4.3552E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.08556	3.4310E-04	6.36691	4.2962E-07	-0.99939835
Para HA4				
N1 = 79 N2 = 7				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
1.910	8.052	1.9802E-10	1.9657E-10	7.3899E-01
1.920	8.248	1.6036E-10	1.5881E-10	9.7706E-01
1.930	8.445	1.1239E-10	1.2105E-10	-7.1475E+00
1.940	8.573	8.8863E-11	8.3285E-11	6.6977E+00
1.952	8.761	4.0186E-11	3.7972E-11	5.8301E+00
1.960	8.884	5.9552E-12	7.7631E-12	-2.3288E+01
1.970	9.012	-3.1043E-11	-2.9998E-11	3.3834E+00
1.981	9.136	-7.0826E-11	-7.1534E-11	-9.8956E-01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.07555	3.0296E-04	8.42296	3.7761E-09	-0.99901956

continua

Para HA5				
N1 = 95 N2 = 14				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.070	9.767	1.2780E-11	1.2568E-11	1.6867E+00
2.080	9.813	1.2128E-11	1.1891E-11	1.9984E+00
2.090	9.859	1.1352E-11	1.1213E-11	1.2407E+00
2.100	9.902	1.0615E-11	1.0535E-11	7.5729E-01
2.110	9.945	9.7877E-12	9.8579E-12	-7.1164E-01
2.120	9.983	9.1128E-12	9.1803E-12	-7.3559E-01
2.130	10.021	8.3655E-12	8.5028E-12	-1.6145E+00
2.140	10.056	7.6899E-12	7.8252E-12	-1.7290E+00
2.150	10.090	7.0002E-12	7.1477E-12	-2.0633E+00
2.160	10.123	6.3012E-12	6.4701E-12	-2.6099E+00
2.170	10.154	5.6416E-12	5.7925E-12	-2.6054E+00
2.180	10.182	5.0691E-12	5.1150E-12	-8.9697E-01
2.200	10.240	3.7065E-12	3.7599E-12	-1.4181E+00
2.251	10.371	3.1434E-13	3.0433E-13	3.2902E+00
2.300	10.475	-2.7175E-12	-3.0157E-12	-9.8898E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.29344	1.1767E-03	10.16905	6.7756E-11	-0.99934947
Número de iterações = 79				

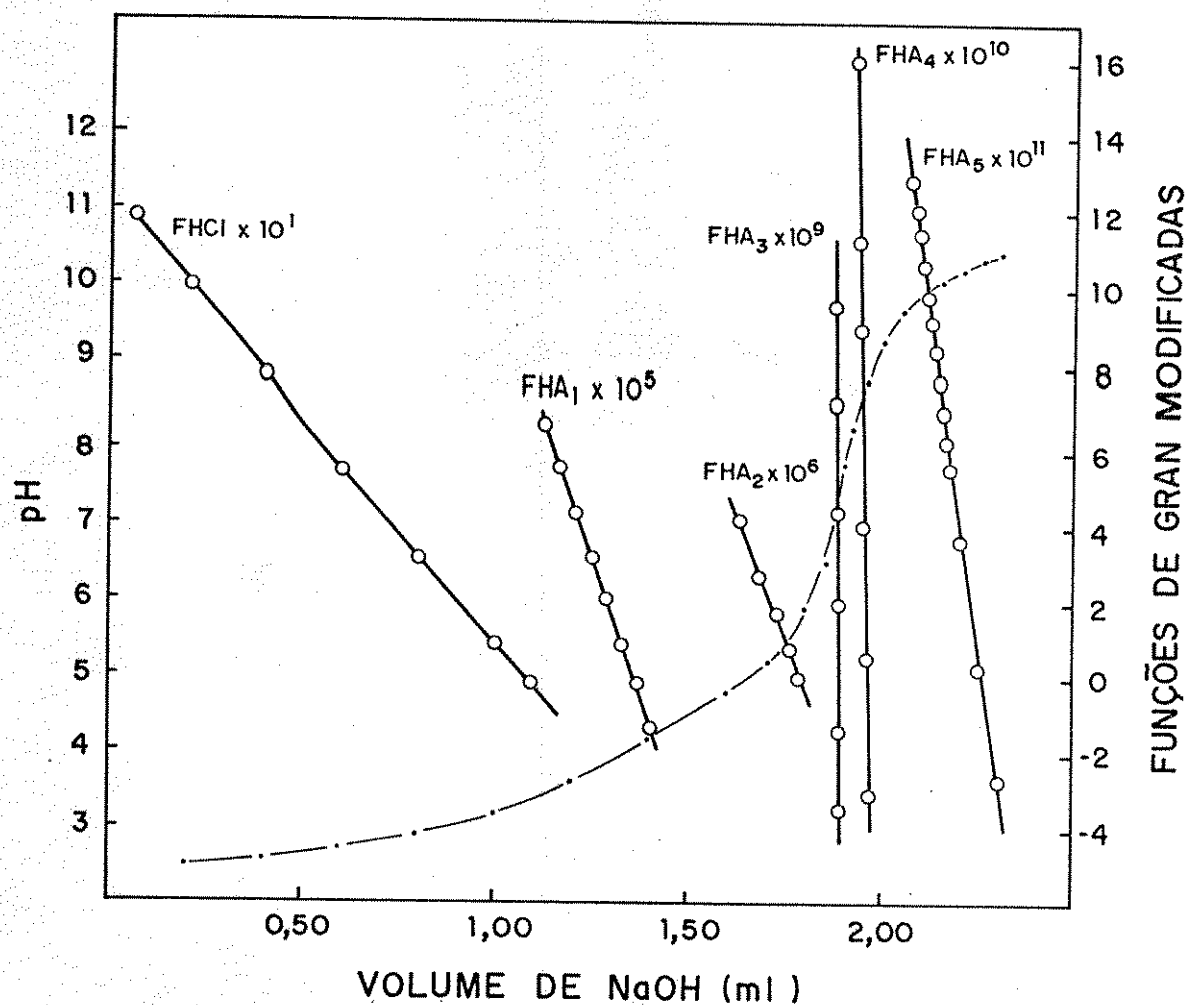


Figura 15: Curva de titulação da lisozima em KCl 1,0 M dada na Tabela 14, segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 15

Tabela 16: Curva de titulação de 23,00 ml de solução $7,903 \times 10^{-5} M$ de ovalbumina com solução de $NaOH$ 0,1104 M em KCl 0,10 M. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos: $E_a^\circ = 612,0 \text{ mV}$; $J_H = 0 \text{ mV.M}^{-1}$; $J_{OH} = 0 \text{ mV.M}^{-1}$ e $K_W = 1,979 \times 10^{-14}$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
1	0.000	1.956	39	2.780	4.586	77	3.110	8.986
2	0.200	1.998	40	2.800	4.682	78	3.115	9.029
3	0.400	2.045	41	2.820	4.782	79	3.120	9.072
4	0.600	2.096	42	2.840	4.892	80	3.125	9.116
5	0.800	2.153	43	2.860	5.013	81	3.130	9.156
6	1.000	2.217	44	2.880	5.149	82	3.135	9.199
7	1.200	2.292	45	2.900	5.303	83	3.140	9.236
8	1.400	2.378	46	2.920	5.478	84	3.150	9.318
9	1.600	2.481	47	2.940	5.695	85	3.160	9.383
10	1.800	2.611	48	2.950	5.825	86	3.170	9.451
11	2.000	2.781	49	2.960	5.960	87	3.180	9.519
12	2.100	2.889	50	2.965	6.036	88	3.190	9.584
13	2.200	3.015	51	2.970	6.117	89	3.200	9.647
14	2.240	3.075	52	2.975	6.200	90	3.210	9.704
15	2.280	3.139	53	2.980	6.293	91	3.220	9.758
16	2.300	3.173	54	2.985	6.388	92	3.230	9.812
17	2.340	3.244	55	2.990	6.487	93	3.240	9.865
18	2.360	3.284	56	2.995	6.599	94	3.250	9.914
19	2.380	3.327	57	3.000	6.707	95	3.260	9.959
20	2.400	3.369	58	3.005	6.827	96	3.270	10.003
21	2.420	3.413	59	3.010	6.947	97	3.280	10.044
22	2.440	3.460	60	3.015	7.084	98	3.290	10.084
23	2.460	3.509	61	3.020	7.224	99	3.300	10.123
24	2.480	3.556	62	3.025	7.377	100	3.320	10.191
25	2.500	3.611	63	3.030	7.530	101	3.341	10.260
26	2.520	3.655	64	3.035	7.701	102	3.360	10.316
27	2.540	3.720	65	3.040	7.860	103	3.380	10.369
28	2.560	3.778	66	3.050	8.131	104	3.400	10.419
29	2.580	3.839	67	3.055	8.245	105	3.425	10.473
30	2.600	3.903	68	3.060	8.345	106	3.450	10.525
31	2.620	3.966	69	3.065	8.433	107	3.475	10.573
32	2.640	4.036	70	3.070	8.519	108	3.500	10.618
33	2.660	4.108	71	3.075	8.592	109	3.525	10.658
34	2.680	4.178	72	3.080	8.658	110	3.550	10.697
35	2.700	4.254	73	3.085	8.724	111	3.575	10.731
36	2.720	4.330	74	3.095	8.839	112	3.600	10.764
37	2.740	4.414	75	3.100	8.889	113	3.650	10.823
38	2.760	4.498	76	3.105	8.936			

Tabela 17: Funções de Gran modificadas calculadas para os dados da Tabela 16

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.000	1.956	2.5370E-01	2.5396E-01	-2.5320E-04
0.200	1.998	2.3194E-01	2.3166E-01	2.8153E-04
0.400	2.045	2.0933E-01	2.0936E-01	-2.7969E-05
0.600	2.096	1.8731E-01	1.8706E-01	2.4584E-04
0.800	2.153	1.6498E-01	1.6477E-01	2.0905E-04
1.000	2.218	1.4246E-01	1.4247E-01	-1.3992E-05
1.200	2.292	1.1991E-01	1.2017E-01	-2.6183E-04
1.400	2.378	9.7644E-02	9.7875E-02	-2.3139E-04
1.600	2.481	7.5489E-02	7.5578E-02	-8.9109E-05
1.800	2.611	5.3119E-02	5.3281E-02	-1.6197E-04
2.000	2.781	3.0867E-02	3.0983E-02	-1.1618E-04
2.100	2.889	1.9727E-02	1.9835E-02	-1.0734E-04
2.200	3.015	8.8678E-03	8.6859E-03	1.8186E-04
2.240	3.075	4.3366E-03	4.2265E-03	1.1012E-04
2.280	3.139	2.0376E-04	-2.3299E-04	4.3675E-04
2.300	3.173	1.9117E-04	-2.4627E-03	2.6539E-03
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
2.2779	1.0877E-02		-0.9999979	1.1149E-01
Para HA 1				
N1 = 15 N2 = 18				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.280	3.139	2.0376E-04	2.0234E-04	1.4164E-06
2.300	3.173	1.9117E-04	1.9002E-04	1.1473E-06
2.340	3.244	1.6697E-04	1.6538E-04	1.5945E-06
2.360	3.284	1.5356E-04	1.5306E-04	5.0155E-07
2.380	3.327	1.3963E-04	1.4074E-04	-1.1121E-06
2.400	3.369	1.2732E-04	1.2842E-04	-1.0960E-06
2.420	3.413	1.1497E-04	1.1610E-04	-1.1212E-06
2.440	3.460	1.0223E-04	1.0377E-04	-1.5446E-06
2.460	3.509	8.9602E-05	9.1454E-05	-1.8512E-06
2.480	3.556	7.8495E-05	7.9133E-05	-6.3750E-07
2.500	3.611	6.5379E-05	6.6812E-05	-1.4324E-06
2.520	3.655	5.6382E-05	5.4491E-05	1.8916E-06
2.540	3.720	4.1742E-05	4.2170E-05	-4.2783E-07
2.560	3.778	2.9859E-05	2.9849E-05	1.0608E-08
2.580	3.839	1.7774E-05	1.7528E-05	2.4607E-07
2.600	3.903	5.5041E-06	5.2068E-06	2.9734E-07
2.620	3.966	-6.0811E-06	-7.1141E-06	1.0331E-06
2.640	4.036	-1.8742E-05	-1.9435E-05	6.9355E-07
2.660	4.108	-3.1366E-05	-3.1756E-05	3.8989E-07
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.33054	01578E-02	3.21039	0.6160E-03	-0.99987113

continua

Para HA2				
N1 = 36 N2 = 11				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.720	4.331	7.8642E-06	7.7763E-06	8.7941E-08
2.740	4.414	6.9568E-06	6.9507E-06	6.0936E-09
2.760	4.498	6.1161E-06	6.1252E-06	-9.0349E-09
2.780	4.586	5.2839E-06	5.2996E-06	-1.5731E-08
2.800	4.682	4.4224E-06	4.4741E-06	-5.1656E-08
2.820	4.782	3.6075E-06	3.6486E-06	-4.1076E-08
2.840	4.892	2.7860E-06	2.8230E-06	-3.7031E-08
2.860	5.013	1.9750E-06	1.9975E-06	-2.2459E-08
2.880	5.149	1.1661E-06	1.1719E-06	-5.8717E-09
2.900	5.303	3.6264E-07	3.4639E-07	1.6247E-08
2.920	5.478	-4.3203E-07	-4.7914E-07	4.7112E-08
2.940	5.695	9.0481E-07	-1.3047E-06	2.5476E-08
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.29994	0.14322E-02	4.38429	0.4128E-04	-0.99991035
Para HA 3				
N1 = 48 N2 = 7				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.950	5.825	9.4098E-08	9.4039E-08	5.9345E-11
2.960	5.960	7.0738E-08	7.0422E-08	3.1605E-10
2.965	6.036	5.8560E-08	5.8613E-08	-5.3433E-11
2.970	6.117	4.6454E-08	4.6804E-08	-3.5038E-10
2.975	6.200	3.5005E-08	3.4996E-08	8.7539E-12
2.980	6.293	2.2854E-08	2.3187E-08	-3.3356E-10
2.985	6.388	1.1323E-08	1.1379E-08	-5.5365E-11
2.990	6.487	-2.0464E-11	-4.3019E-10	4.0973E-10
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.08143	0.3888E-03	5.62677	0.2362E-05	-0.99996328
Para HA4				
N1 = 58 N2 = 8				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.005	6.827	3.6048E-09	3.5897E-09	3.5058E-11
3.010	6.947	3.0616E-09	3.0099E-09	5.1742E-11
3.015	7.084	2.4324E-09	2.4500E-09	-1.7636E-11
3.020	7.224	1.8586E-09	1.8902E-09	-3.1619E-11
3.025	7.377	1.2786E-09	1.3304E-09	-5.1806E-11
3.030	7.530	7.5408E-10	7.7054E-10	-1.6456E-11
3.035	7.701	1.8209E-10	2.1069E-10	-2.3599E-11
3.040	7.860	-3.5207E-10	-3.4910E-10	-2.9630E-12
3.050	8.131	-1.4066E-09	-1.4688E-09	6.2215E-11
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.04706	0.2247E-03	6.95091	0.1120E-06	-0.99970198

continua

Para HA5				
N1 = 75 N2 = 7				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.100	8.889	1.8346E-11	1.8486E-11	-1.4011E-13
3.105	8.937	1.3069E-11	1.2958E-11	1.1113E-13
3.110	8.986	7.0864E-12	7.4303E-12	-3.4384E-13
3.115	9.029	2.9884E-12	1.9023E-12	1.8618E-13
3.120	9.072	-3.2705E-12	-3.6253E-12	3.5483E-13
3.125	9.116	-9.1641E-12	-9.1531E-12	-1.0991E-14
3.130	9.156	-1.4434E-11	-1.4681E-11	2.4691E-13
3.135	9.199	-2.0612E-11	-2.0209E-11	-4.0368E-13
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.07984	0.3812E-03	8.95642	0.1106E-08	-0.99979174
Para HA6				
N1 = 86 N2 = 7				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.170	9.451	1.5301E-11	1.5116E-11	1.8507E-13
3.180	9.520	1.1832E-11	1.1883E-11	-5.0904E-14
3.190	9.584	8.5818E-12	8.6502E-12	-6.8390E-14
3.200	9.647	5.1974E-12	5.4173E-12	-2.1991E-13
3.210	9.704	2.1272E-12	2.1845E-12	-5.7232E-14
3.220	9.758	-9.0408E-13	-1.0484E-12	1.4430E-13
3.230	9.812	-4.1644E-12	-4.2812E-12	1.1680E-13
3.240	9.865	-7.5633E-12	-7.5141E-12	-4.9155E-14
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.10004	0.4777E-03	9.49041	0.3233E-09	-0.99985200
Para HA7				
N1 = 96 N2 = 11				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.270	10.003	3.2193E-12	3.2194E-12	-1.6653E-16
3.280	10.004	3.0279E-12	3.0052E-12	2.2676E-14
3.290	10.085	2.7907E-12	2.7910E-12	-2.4980E-16
3.300	10.123	2.5611E-12	2.5767E-12	-1.5626E-14
3.320	10.191	2.1907E-12	2.1483E-12	4.2376E-14
3.341	10.260	1.6775E-12	1.6984E-12	-2.0858E-14
3.360	10.316	1.2628E-12	1.2914E-12	-2.8533E-14
3.380	10.369	8.4734E-13	8.6290E-13	-1.5557E-14
3.400	10.419	4.0231E-13	4.3444E-13	-3.2131E-14
3.425	10.473	-6.8154E-14	-1.0113E-13	3.2974E-14
3.450	10.526	-6.3100E-13	-6.3670E-13	5.7038E-15
3.475	10.573	-1.1629E-12	-1.1723E-12	9.4161E-15
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.20352	0.9718E-03	10.66912	0.2142E-10	-0.99986935
Número de iterações = 120				

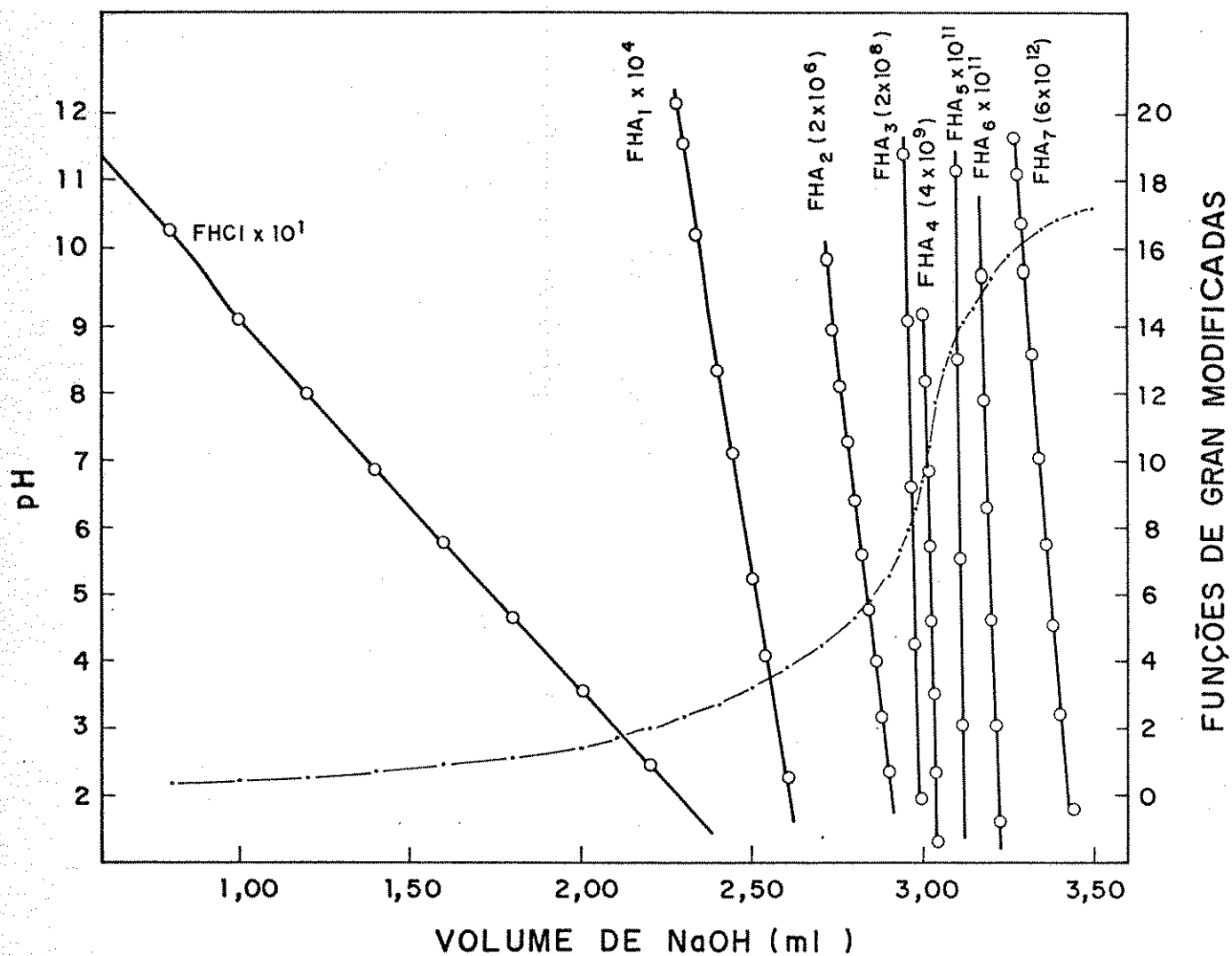


Figura 16: Curva de titulação de ovalbumina em KCl 0,10 M dada na Tabela 16, segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 17

Tabela 18: Curva de titulação de 23,00 ml de solução $7,903 \times 10^{-5} M$ de ovalbumina com solução de NaOH 0,1037 M em KCl 1,0 M. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos: $E_a^0 = 615,1$ mV; $J_H = 0$ mV.M⁻¹; $J_{OH} = 0$ mV.M⁻¹ e $K_W = 1,648 \times 10^{-14}$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
2	0.200	1.989	45	2.780	4.757	88	3.325	7.385
3	0.400	2.032	46	2.800	3.964	89	3.330	7.532
4	0.600	2.079	47	2.820	4.016	90	3.335	7.696
5	0.700	2.104	48	2.840	4.074	91	3.340	7.858
6	0.800	2.132	49	2.850	4.102	92	3.345	8.026
7	0.900	2.158	50	2.870	4.157	93	3.350	8.152
8	1.000	2.187	51	2.880	4.185	94	3.355	8.278
9	1.100	2.219	52	2.900	4.244	95	3.360	8.398
10	1.200	2.253	53	2.920	4.302	96	3.365	8.492
11	1.300	2.287	54	2.930	4.331	97	3.370	8.575
12	1.400	2.328	55	2.940	4.363	98	3.375	8.649
13	1.500	2.368	56	2.950	4.391	99	3.380	8.720
14	1.600	2.415	57	2.960	4.421	100	3.385	8.791
15	1.700	2.464	58	2.970	4.454	101	3.390	8.852
16	1.800	2.520	59	2.980	4.486	102	3.395	8.909
17	1.900	2.583	60	2.990	4.519	103	3.400	8.960
18	2.000	2.654	61	3.000	4.554	104	3.410	9.050
19	2.100	2.737	62	3.010	4.584	105	3.420	9.134
20	2.150	2.782	63	3.020	4.620	106	3.430	9.219
21	2.200	2.830	64	3.031	4.658	107	3.440	9.290
22	2.250	2.889	65	3.040	4.691	108	3.450	9.359
23	2.300	2.948	66	3.060	4.763	109	3.460	9.424
24	2.350	3.015	67	3.080	4.841	110	3.470	9.483
25	2.400	3.091	68	3.120	5.014	111	3.480	9.540
26	2.420	3.122	69	3.140	5.113	112	3.490	9.599
27	2.440	3.155	70	3.150	5.165	113	3.500	9.652
28	2.460	3.191	71	3.160	5.219	114	3.510	9.700
29	2.470	3.208	72	3.180	5.340	115	3.520	9.749
30	2.480	3.227	73	3.200	5.480	116	3.540	9.844
31	2.500	3.264	74	3.210	5.553	117	3.560	9.931
32	2.520	3.303	75	3.220	5.637	118	3.580	10.008
33	2.540	3.343	76	3.240	5.840	119	3.600	10.083
34	2.560	3.384	77	3.250	5.955	120	3.620	10.149
35	2.580	3.426	78	3.260	6.082	121	3.640	10.211
36	2.600	3.472	79	3.270	6.229	122	3.660	10.267
37	2.620	3.515	80	3.280	6.386	123	3.680	10.321
38	2.640	3.562	81	3.290	6.574	124	3.700	10.374
39	2.660	3.609	82	3.295	6.673	125	3.725	10.429
40	2.680	3.710	83	3.300	6.776	126	3.750	10.485
41	2.700	3.705	84	3.305	6.878	127	3.775	10.534
42	2.720	3.756	85	3.310	6.986	128	3.800	10.582
43	2.740	3.806	86	3.315	7.106	129	3.850	10.663
44	2.760	3.857	87	3.320	7.231	130	3.877	10.703

Tabela 19: Funções de Gran modificadas calculadas para os dados da Tabela 18

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.000	1.951	2.5793E-01	2.5784E-01	8.7917E-05
0.200	1.990	2.3796E-01	2.3731E-01	6.5291E-04
0.400	2.032	2.1747E-01	2.1677E-01	6.9635E-04
0.600	2.079	1.9663E-01	1.9624E-01	3.9089E-04
0.700	2.104	1.8630E-01	1.8597E-01	3.2704E-04
0.800	2.132	1.7526E-01	1.7570E-01	-4.4064E-04
0.900	2.159	1.6544E-01	1.6543E-01	4.4852E-06
1.000	2.187	1.5542E-01	1.5517E-01	2.5176E-04
1.100	2.219	1.4479E-01	1.4490E-01	-1.1070E-04
1.200	2.253	1.3422E-01	1.3463E-01	-4.0869E-04
1.300	2.287	1.2439E-01	1.2435E-01	2.9631E-05
1.400	2.328	1.1335E-01	1.1410E-01	-7.4892E-04
1.500	2.368	1.0347E-01	1.0383E-01	-3.5661E-04
1.600	2.415	9.2819E-02	9.3560E-02	-7.4124E-04
1.700	2.464	8.2771E-02	8.3293E-02	-5.2210E-04
1.800	2.520	7.2439E-02	7.3025E-02	-5.8612E-04
1.900	2.583	6.2133E-02	6.2758E-02	-6.2443E-04
2.000	2.654	5.1974E-02	5.2490E-02	-5.1568E-04
2.100	2.737	4.1751E-02	4.2223E-02	-4.7203E-04
2.150	2.782	3.6847E-02	3.7089E-02	-2.4184E-04
2.200	2.830	3.2043E-02	3.1955E-02	8.8286E-05
2.250	2.889	2.6659E-02	2.6821E-02	-1.6177E-04
2.300	2.948	2.1787E-02	2.1687E-02	9.9853E-05
2.350	3.016	1.6733E-02	1.6554E-02	1.7954E-04
2.400	3.092	1.1584E-02	1.1420E-02	1.6409E-04
2.420	3.122	9.6666E-03	9.3663E-03	3.0028E-04
2.440	3.155	7.6593E-03	7.3128E-03	3.4651E-04
2.460	3.191	5.5502E-03	5.2593E-03	2.9088E-04
2.470	3.208	4.5815E-03	4.2326E-03	3.4898E-04
2.480	3.227	3.5171E-03	3.2058E-03	3.1125E-04
2.500	3.264	1.4971E-03	1.1523E-03	3.4479E-04
2.520	3.303	-5.6529E-04	-9.0122E-04	3.3594E-04
2.540	3.343	-2.6180E-03	-2.9547E-03	3.3671E-04
2.560	3.384	-4.6651E-03	-5.0083E-03	3.4320E-04
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
2.5112	1.1268E-02		-0.9999869	1.0268E-01

continua

Para HA 1				
N1 = 41 N2 = 16				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
2.720	3.756	4.3064E-05	4.2653E-05	4.1142E-07
2.740	3.807	3.9209E-05	3.8979E-05	2.3058E-07
2.760	3.857	3.5512E-05	3.5304E-05	2.0826E-07
2.800	3.964	2.7753E-05	2.7956E-05	-2.0290E-07
2.820	4.016	2.4230E-05	2.4281E-05	-5.1217E-08
2.840	4.074	2.9218E-05	2.0607E-05	-3.8898E-07
2.850	4.102	1.8365E-05	1.8770E-05	-4.0475E-07
2.870	4.157	1.4837E-05	1.5095E-05	-2.5888E-07
2.880	4.185	1.3066E-05	1.3258E-05	-1.9178E-07
2.900	4.244	9.3563E-06	9.5839E-06	-2.2758E-07
2.920	4.302	5.8384E-06	5.9096E-06	-7.1219E-08
2.930	4.331	4.1155E-06	4.0724E-06	4.3079E-08
2.940	4.363	2.1955E-06	2.2353E-06	-3.9836E-08
2.950	4.391	5.9292E-07	3.9814E-07	1.9478E-07
2.960	4.422	-1.1950E-06	-1.4391E-06	2.4410E-07
2.970	4.454	-3.0387E-06	-3.2762E-06	2.3748E-07
2.980	4.486	-4.8472E-06	-5.1134E-06	2.6621E-07
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.44094	0.1979E-02	3.73585	0.1837E-03	-0.99988196

Para HA 2				
N1 = 64 N2 = 12				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.060	4.763	3.2346E-06	3.1789E-06	5.5661E-08
3.080	4.841	2.8972E-06	2.8588E-06	3.8370E-08
3.120	5.014	2.2134E-06	2.2186E-06	-5.1850E-09
3.140	5.113	1.8675E-06	1.8985E-06	-3.0958E-08
3.150	5.166	1.6998E-06	1.7384E-06	-3.8635E-08
3.160	5.219	1.5422E-06	1.5784E-06	-3.6190E-08
3.180	5.340	1.2174E-06	1.2583E-06	-4.0919E-08
3.200	5.480	9.0121E-07	9.3817E-07	-3.6956E-08
3.210	5.553	7.6112E-07	7.7812E-07	-1.6998E-08
3.220	5.637	6.1434E-07	6.1806E-07	-3.7244E-09
3.240	5.840	3.1684E-07	2.9795E-07	1.8892E-08
3.250	5.955	1.7646E-07	1.3789E-07	3.8565E-08
3.260	6.082	3.5946E-08	-2.2163E-08	5.8109E-08
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.30645	0.1375E-02	4.79573	0.1601E-04	-0.99931729

continua

Para HA3				
N1 = 82 N2 = 10				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.305	6.878	6.8245E-09	6.4632E-09	3.6134E-10
3.310	6.986	5.6852E-09	5.5271E-09	1.5804E-10
3.315	7.106	4.5431E-09	4.5910E-09	-4.7876E-11
3.320	7.231	3.5202E-09	3.6548E-09	-1.3456E-10
3.325	7.385	2.4149E-09	2.7187E-09	-3.0371E-10
3.330	7.532	1.5421E-09	1.7826E-09	-2.4042E-10
3.335	7.696	6.7074E-10	8.4640E-10	-1.7566E-10
3.340	7.858	-1.4323E-10	-8.9756E-11	-5.3475E-11
3.345	8.026	-1.0319E-09	-1.0259E-09	-5.9401E-12
3.350	8.152	-1.7747E-09	-1.9620E-09	1.8730E-10
3.355	8.278	-2.6435E-09	-2.8982E-09	2.5469E-10
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.08091	0.3630E-03	6.72763	0.1872E-06	-0.99762416
Para HA4				
N1 = 99 N2 = 12				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.390	8.852	5.2262E-11	5.1398E-11	8.2812E-13
3.395	8.910	4.8538E-11	4.8578E-11	-3.9302E-14
3.400	8.960	4.5629E-11	4.5757E-11	-1.2879E-13
3.410	9.050	4.0331E-11	4.0117E-11	2.1394E-13
3.420	9.134	3.4713E-11	3.4477E-11	2.3637E-13
3.430	9.219	2.7995E-11	2.8837E-11	-8.4155E-13
3.440	9.290	2.2707E-11	2.3197E-11	-4.9022E-13
3.450	9.359	1.7090E-11	1.7557E-11	-4.67-7E-13
3.460	9.424	1.1535E-11	1.1916E-11	-3.8097E-13
3.470	9.483	6.3915E-12	6.2763E-12	1.1519E-13
3.480	9.540	1.1126E-12	6.3616E-13	4.7640E-13
3.490	9.599	-4.8561E-12	-5.0040E-12	1.4788E-13
3.500	9.652	-1.0318E-11	-1.0644E-11	3.2657E-13
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.14161	0.6354E-03	9.24871	0.5640E-09	-0.99976474
Para HA5				
N1 = 116 N2 = 10				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
3.580	10.008	6.7667E-12	6.6706E-12	9.6096E-14
3.600	10.083	5.8972E-12	5.9245E-12	-2.7325E-14
3.620	10.149	5.1587E-12	5.1784E-12	-1.9679E-14
3.640	10.211	4.3961E-12	4.4323E-12	-3.6145E-14
3.660	10.267	3.6941E-12	3.6862E-12	7.9659E-15
3.680	10.321	2.9357E-12	2.9401E-12	-4.3229E-15
3.700	10.374	2.1019E-12	2.1940E-12	-9.2031E-14
3.725	10.429	1.2901E-12	1.2613E-12	2.8769E-14
3.750	10.485	3.0950E-13	3.2868E-13	-1.9179E-14
3.775	10.534	-5.6224E-13	-6.0395E-13	4.1703E-14
3.800	10.582	-1.5126E-12	-1.5366E-12	2.4002E-14
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.27768	0.1246E-02	10.42823	0.3731E-10	-0.99983770
Número de iterações = 61				

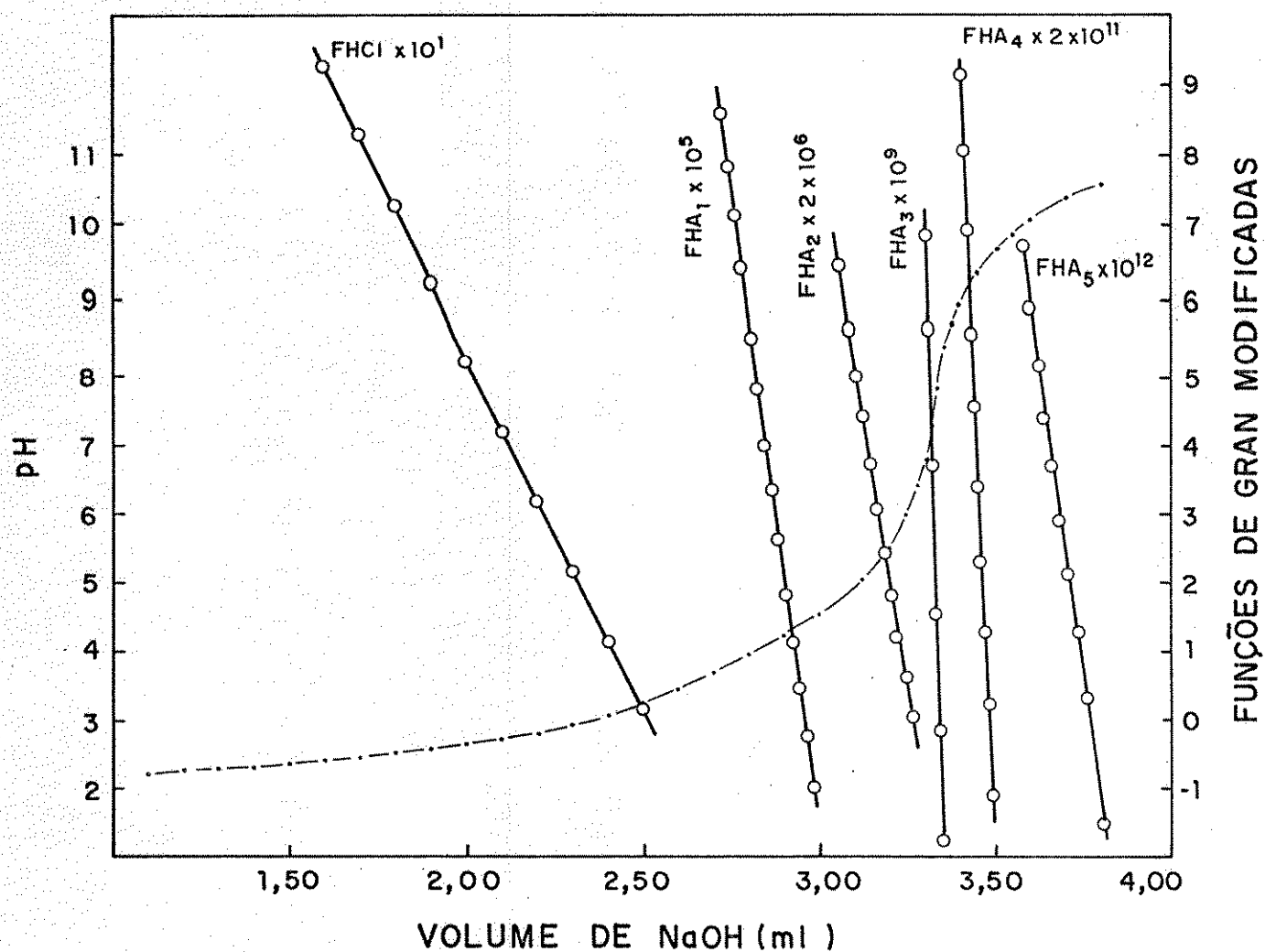


Figura 17: Curva de titulação de ovalbumina em KCl 1,0 M dada na Tabela 18, segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 19

Tabela 20: Resumo dos resultados obtidos para lisozima e sua composição de aminoácidos. Os resultados correspondem à média de três titulações em cada força iônica. A massa molecular foi considerada $14.500 \text{ g.mol}^{-1}$

Meio Iônico					Composição de Aminoácidos [73]
Série	KCl 0,10 M		KCl 1,0 M		
	NG.mol ⁻¹	pKa	NG.mol ⁻¹	pKa	
HA ₁	9,3±0,3	4,38±0,03	4,4±0,1	3,55±0,01	10-11 grupos COOH 1 grupo imidazol 1 grupo α-amino 6 grupos ε-amino 3 grupos fenólicos
HA ₂	2,0±0,3	5,60±0,05	7,0±0,1	4,64±0,01	
HA ₁ + HA ₂	11,3±0,6		11,4±0,2		
HA ₃	0,9±0,1	7,33±0,09	1,4±0,1	6,32±0,08	
HA ₄	0,9±0,1	8,73±0,20	1,1±0,1	8,41±0,02	
HA ₅	4,2±0,3	10,00±0,05	4,5±0,1	10,16±0,01	21-22 grupos.mol ⁻¹
HA ₄ + HA ₅	5,1±0,4		5,6±0,2		
TOTAL	17,3±1,1		17,4±0,5		

Tabela 21: Resumo dos resultados obtidos para ovalbumina e sua composição de aminoácidos. Os resultados correspondem à média de três titulações em cada força iônica. A massa molecular da ovalbumina foi considerada $45.000 \text{ g.mol}^{-1}$

Meio Iônico					
	KCl 0,10 M		KCl 1,0 M		Composição de Aminoácidos [74]
Série	NG.mol ⁻¹	pKa	NG.mol ⁻¹	pKa	
HA ₁	21,6±0,1	3,22±0,01	27,4±0,1	3,73±0,02	47 grupos carboxílicos 7 grupos imidazóis 10 grupos fenólicos
HA ₂	19,4±0,3	4,38±0,01	18,6±0,1	4,79±0,01	
HA ₃	5,3±0,1	5,58±0,05			
HA ₁ + HA ₂ + HA ₃	46,3±0,5		46,1±0,2		20 grupos ε-amino 4 grupos sulfidrílicos
HA ₄	3,2±0,1	6,81±0,04	4,9±0,1	6,71±0,02	
HA ₅	6,0±0,8	8,96±0,01	9,0±0,2	9,26±0,02	
HA ₆	6,2±0,4	9,59±0,09	17,0±0,1	10,43±0,01	
HA ₇	13,5±0,2	10,69±0,02			
HA ₅ + HA ₆ + HA ₇	25,7±1,4		26,0±0,3		88 grupos.mol ⁻¹
TOTAL	75,2±2,0		77,0±0,6		

Os resultados indicam que a tomada de um número adequado de pontos para caracterizar as funções de Gran modificadas do ácido forte, F_{HA_0} e das diferentes classes de grupos

Tabela 22: Resultados obtidos para β -lactoglobulina e sua composição de aminoácidos. Os resultados correspondem à média de três titulações em cada força iônica. A massa molecular foi considerada $35.500 \text{ g.mol}^{-1}$

Meio Iônico					
Série	KCl 0,10 M		KCl 1,0 M		Composição de Aminoácidos [76]
	NG.mol ⁻¹	pK _a	NG.mol ⁻¹	pK _a	
HA ₁	18,3±0,2	3,51±0,03	25,2±0,2	3,88±0,02	2 grupos α - COOH
HA ₂	23,2±0,6	4,68±0,01	24,2±0,2	4,90±0,03	53 grupos β - COOH
HA ₃	7,5±0,1	5,95±0,03			4 grupos imidazóis
HA ₁ + HA ₂ + HA ₃	49,0±0,9		49,4±0,4		2 grupos α-amino
HA ₄	6,6±0,1	7,73±0,05	7,7±0,1	7,54±0,02	29 grupos ε-amino
HA ₅	35,1±2,0	10,57±0,01	34,1±1,4	10,76±0,01	8 grupos fenólicos
TOTAL	90,7±3,0		91,7±1,9		98 grupos.mol ⁻¹

carboxílicos parece resolver o problema de sobreposição entre estas espécies [13]. Com isso, a soma dos grupos pertencentes às séries *HA*₁ e *HA*₂ da lisozima e *HA*₁, *HA*₂ e *HA*₃ da ovalbumina e β -lactoglobulina se mostram independentes da força iônica da solução e bem concordantes com o conteúdo de resíduos de grupos carboxílicos dado pela composição de aminoácidos.

No caso das titulações de ovalbumina e β -lactoglobulina em força iônica 0,1 os grupos pertencentes a série *HA*₁ apresentaram respectivamente *pKa* $3,22 \pm 0,01$ e $3,51 \pm 0,03$, valores abaixo do normalmente encontrado para grupos carboxílicos presentes em proteínas quando se adota o modelo de Linderstrom-Lang [31]. Este fato vem comprovar a possibilidade de alguns grupos carboxílicos serem determinados juntamente com o ácido forte se as funções de Gran modificadas para essas espécies não forem adequadamente definidas, de acordo com resultados do estudo teórico e dos estudos experimentais anteriores.

Na titulação de ovalbumina em KCl 0,10 M os grupos titulados na região alcalina também foram divididos em três séries, HA_5 , HA_6 e HA_7 , ou seja, uma a mais que em KCl 1,0 M . Deste modo, o maior número de classes caracterizados nas titulações em força iônica 0,10 parece ser uma consequência imediata das interações eletrostáticas mais intensas neste meio que provocam uma maior variação do $pK_{aparente}$ dos grupos, conforme mostrado nas Figuras 10, 11 e 12. Na região de pH entre 8 e 11 são titulados em uma proteína grupos α -aminos terminais, além de grupos fenólicos, sulfidrílicos e ϵ -aminos de cadeia lateral, de modo que a caracterização de várias séries de grupos pode ser atribuída tanto aos efeitos eletrostáticos como a diversidade de espécies químicas tituladas nesta região.

Quanto à titulação da β -lactoglobulina, apesar da estequiometria dos grupos carboxílicos se mostrar independente da força iônica, observou-se um número de grupos 6 unidades abaixo do indicado pela composição de aminoácidos [76]. Por outro lado, os valores obtidos, $49,0 \pm 0,9$ grupos. mol^{-1} e $49,4 \pm 0,4$ grupos. mol^{-1} em KCl 0,10 e 1,0 M , respectivamente, são bastante coerentes com a estequiometria dos grupos carboxílicos determinada por outros autores através de titulações [42,77]. O total de grupos titulados na região alcalina também se mostrou independente da força iônica e coerente com dados da composição de aminoácidos e estudos de titulação [42,77].

Este estudo permite concluir que a consequência de não se considerar o termo de variação de energia livre eletrostática que acompanha as dissociações é a divisão dos grupos de mesma natureza química em subgrupos com pK_a 's distintos, de acordo com o que foi proposto

originalmente por Levy [49]. Logicamente o modelo de Linderstrom-Lang [40] e o refinamento introduzido por Tanford e Kirkwood [43] apresentam um tratamento físico-químico mais completo para o sistema, uma vez que é inegável a influência das cargas sobre as constantes de dissociação dos grupos tituláveis. Por outro lado, no tratamento de Tanford e Kirkwood é necessário o conhecimento prévio da variação de energia livre de interação dos grupos iônicos, informação geralmente não disponível para proteínas [44]. Quanto ao modelo de Linderstrom-Lang, Marini e Martin [51] demonstraram que a curva de titulação potenciométrica de uma proteína muitas vezes não contém as informações suficientes para uma avaliação segura do coeficiente de interação eletrostática, a menos que o número de grupos titulados com o mesmo pK_a intrínseco seja perfeitamente conhecido.

Além das interações puramente eletrostáticas uma série de outros fatores podem atuar sobre as constantes de dissociação. Assim, no estudo teórico, em que foram considerados apenas efeitos eletrostáticos, observou-se uma impossibilidade de se separar adequadamente a região da curva de titulação do excesso de ácido forte e dos grupos carboxílicos com pK_a 's mais baixos. Do mesmo modo foi impossível a localização correta do ponto final da titulação dos grupos amino, quanto maior o valor de W_{HA_n} adotado. Por outro lado, trabalhando-se com dados experimentais foi possível contornar os dois problemas, o que é uma forte indicação que além de interações puramente eletrostáticas, a conformação, a hidratação, os pontos de carga, a ressonância e ligações hidrogênio podem influenciar as constantes de dissociação, sendo portanto duvidoso interpretar as curvas de titulação das proteínas com base apenas nos efeitos

de interações eletrostáticas [51].

Assim, o fato das curvas de titulação das proteínas diferirem substancialmente da sobreposição das titulações de seus constituintes ácidos ou básicos de modo dependente da força iônica tem sido contornado pela divisão destes constituintes em grupos com pK_a 's distintos, ou por tratá-los como uma mistura de ácidos cujos pK_a 's refletem as diversas interações a que estão sujeitos na macromolécula. Com isso comprova-se a adequabilidade das considerações adotadas pelo método de linearização.

Finalizando, deve-se lembrar que além da simplicidade matemática envolvida nesta metodologia, existe também uma maior simplicidade experimental, uma vez que a determinação da carga da proteína não é necessária. Com isso, a titulação da proteína se faz de um extremo de pH a outro sem necessidade da titulação em branco paralela, facilitando a sua aplicação em rotinas e também a automação do processo.

5 Titulações de Ovalbumina e Lisozima Desnaturadas em Soluções de Cloridrato de Guanidino 6 M

5.1 Considerações Gerais

Como foi visto no Capítulo 1, estudos de Tanford et. all. [60] e Nozaki e Tanford [61,62] caracterizaram o estado conformacional de um enrolamento aleatório das proteínas em soluções de *GuHCl* 6,0 M. Nestas condições conformacionais e de alta força iônica, a influência das várias interações, eletrostáticas ou não, sobre as constantes de dissociação dos grupos tituláveis são minimizadas. Com isso, espera-se que a curva de titulação da proteína possa ser representada adequadamente, pela sobreposição das curvas de titulação dos seus constituintes ácidos ou básicos, sem necessidade de divisão destes constituintes em séries de grupos com pK_a 's distintos, como foi observado em estudos teóricos ou nas titulações em *KCl* 0,10 ou 1,0 M.

É interessante também uma comparação dos resultados obtidos em *GuHCl* 6,0 M com a composição de aminoácidos para verificar se a desnaturação foi realmente completa, expondo todos os segmentos da cadeia ao solvente, tornando possível a determinação de todos os grupos tituláveis presentes. Por outro lado, a comparação dos resultados obtidos em *GuHCl* 6,0 M com os obtidos para a proteína nativa pode trazer informações sobre o número e a natureza de grupos presentes em regiões hidrofóbicas da molécula, ou que devido a interações locais intensas, são titulados com pK_a anormal [30].

Finalmente se poderá comparar tais resultados com os obtidos por Silva [56], para

lisozima e ovalbumina desnaturadas em soluções de uréia 9,3 M.

Quanto à parte experimental deste estudo, cuidou-se inicialmente da purificação do *GuHCl*, uma vez que Hora Alves [75] determinou a presença de impurezas tituláveis com pK_a 's 4,02; 5,58 e 9,02, respectivamente nas concentrações $1,749 \times 10^{-4}$, $2,046 \times 10^{-4}$ e $1,749 \times 10^{-4}$ M, no reagente ultrapuro da Schuarz Mann Inc. O procedimento usado na purificação foi descrito em detalhes no item 2.1, reduzindo a concentração total de impurezas a $(1,48 \pm 0,04) \times 10^{-4}$ M. A estequiometria dos grupos tituláveis das proteínas foram corrigidas desta quantidade de impurezas nas regiões de pK_a e proporções determinadas por Hora Alves.

Outro aspecto, estudado com cuidado, foi a calibração dos eletrodos para a medida da concentração hidrogeniônica nas soluções de *GuHCl* 6,0 M.

5.2 Medida da Concentração Hidrogeniônica em *GuHCl* 6,0 M

O *GuHCl* é um eletrólito forte e, portanto, dissocia-se completamente em água nos íons GuH^+ e Cl^- . O íon GuH^+ comporta-se como um ácido fraco que, em soluções alcalinas, pode ser convertido na base livre, guanidina, com remoção de OH^- da solução. Deste modo, em princípio, a concentração de OH^- em solução não pode ser calculada diretamente a partir do excesso de base adicionada.

Por outro lado, Nozaki e Tanford [61] determinaram a constante de dissociação do íon guanidônio, GuH^+ , como 13,74 (25°C) em soluções de *GuHCl* 6,0 M. Este valor está em ótima concordância com o valor 13,65, determinado em soluções diluídas de *GuHCl*. Tais resultados

indicam que é possível considerar a dissociação do íon guanidônio desprezível na região de pH em que normalmente são realizadas as titulações de proteínas.

Deste modo, soluções concentradas de $GuHCl$ comportam-se de maneira semelhante a soluções concentradas de sais de metais alcalinos, principalmente KCl ou $CsCl$, com exceção das regiões de pH acima de 11, onde, além da dissociação do íon guanidônio, pode ocorrer uma rápida decomposição da guanidina [61]. Desta maneira, para manutenção da força iônica constante ao longo da titulação, prepara-se a solução de hidróxido de sódio em KCl , $NaCl$ ou $NaNO_3$. Hora Alves [75] preparou as soluções titulantes 0,1 M em $NaNO_3$ 5,6 M e determinou os parâmetros E_a^o , J_H e J_{OH} necessários para calibração dos eletrodos neste meio. Porém, devido à alta concentração salina, a pureza destes reagentes torna-se muito importante, pois, a presença de substâncias tituláveis pode acarretar erros significativos na estequiometria e pK_a 's dos grupos nas proteínas.

Com este problema em mente, optou-se pelo procedimento proposto por Silva [56], preparando-se as soluções titulantes de hidróxido de sódio em concentrações próximas a 1,0 M e sem a presença de sais. Com isso, pôde-se planejar a titulação de modo que, em seu final, a diluição da amostra não tenha excedido 1 a 2%. Adotando-se este procedimento evita-se a presença de impurezas advindas do sal usado no ajuste da força iônica, bem como uma variação significativa do meio iônico, ao longo da titulação. Finalmente, os valores de E^o , J_H e J_{OH} são determinados diretamente na solução de $GuHCl$ 6,0 M , conforme é mostrado nas Figuras 19 e 20.

5.3 Resultados e Discussão

A calibração dos eletrodos foi feita em termos de concentração, conforme descrito no item 2.3. A curva de titulação de uma solução 6,0 M de *GuHCl* em *HCl* $7,803 \times 10^{-3} M$, linearizada pelo método de Gran clássico, é mostrada na Figura 18. Os gráficos $E - 59,16 \log[H^+] \times [H^+]$ e $E + 59,16 \log[OH^-] \times [OH^-]$ para determinação de E_a° , E_b° , J_H e J_{OH} em *GuHCl* 6,0 M são mostrados, respectivamente, nas Figuras 19 e 20.

Os valores $E_a^\circ = 631,7 \text{ mV}$, $J_H = 4,49 \text{ mV} \cdot M^{-1}$, $E_b^\circ = -172,9 \text{ mV}$, $J_{OH} = 0 \text{ mV} \cdot M^{-1}$ e $K_W = 2,510 \times 10^{-14}$ foram típicos na maioria das calibrações, sempre realizadas momentos antes da titulação de uma solução de proteína.

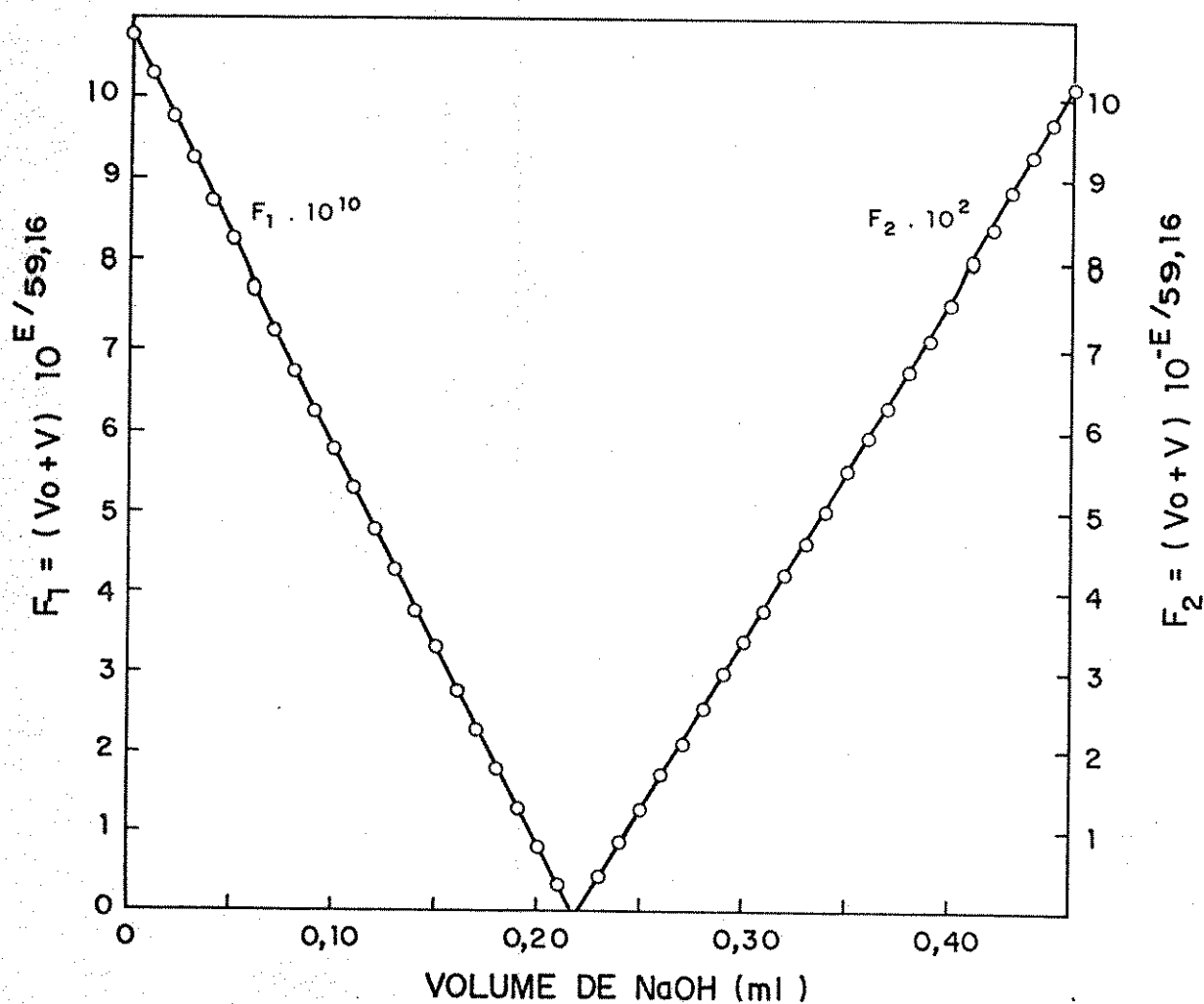


Figura 18: Curva de titulação de 30,00 ml de solução de GuHCl 6,0 M em HCl $7,803 \times 10^{-3}$ M com NaOH 1,085 M, linearizada pelo método de Gran

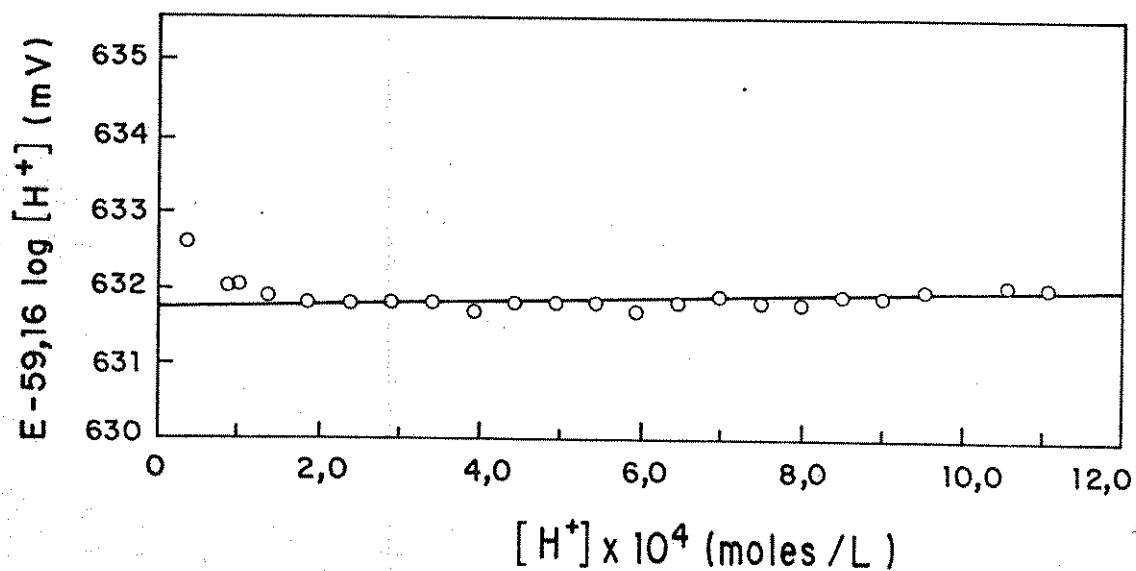


Figura 19: $E - 59,16 \log [H^+] \times [H^+]$ para determinação de E_a° e J_H

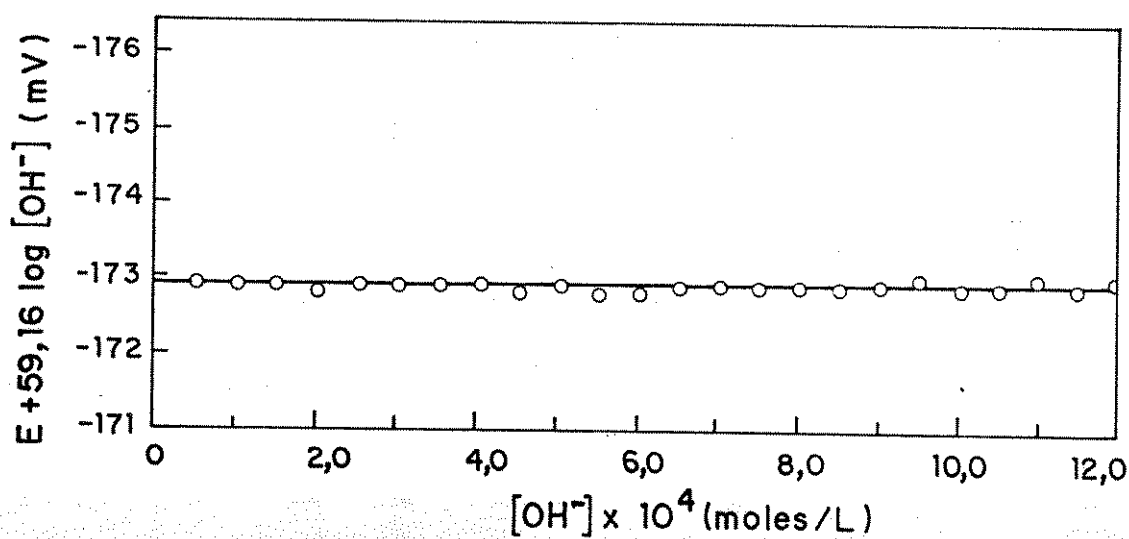


Figura 20: $E + 59,16 \log [OH^-] \times [OH^-]$ para determinação de E_b° e J_{OH}

5.3.1 Titulações de Lisoizima

A Tabela 23 refere-se aos dados de uma titulação de lisoizima desnaturada em *GuHCl* 6,0 M. As funções de Gran modificadas para esta titulação são mostradas na Tabela 24 e a representação gráfica da curva segmentada e linearizada aparece na Figura 21.

Tabela 23: Titulação de 30,00 ml de solução de lisozima $3,444 \times 10^{-4} M$ em $GuHCl$ 6,0 M, na presença de excesso de ácido forte com $NaOH$ 1,085 M. Parâmetros obtidos da calibração de eletrodos em $GuHCl$ 6,0 M: $E_a^0 = 631,5 mV$; $J_H = 43,50 mV.M^{-1}$; $J_{OH} = 9,5 mV.M^{-1}$ e $K_W = 2,509 \times 10^{-14}$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
1	0.0000	2.025	34	0.3470	5.434	67	0.3940	9.230
2	0.0400	2.102	35	0.3500	5.494	68	0.3950	9.327
3	0.0800	2.195	36	0.3525	5.551	69	0.3960	9.405
4	0.1100	2.281	37	0.3550	5.622	70	0.3970	9.476
5	0.1300	2.348	38	0.3575	5.688	71	0.3980	9.537
6	0.1500	2.428	39	0.3600	5.766	72	0.3990	9.594
7	0.1700	2.524	40	0.3625	5.852	73	0.4000	9.643
8	0.1800	2.581	41	0.3650	5.952	74	0.4020	9.736
9	0.2000	2.725	42	0.3675	6.072	75	0.4040	9.817
10	0.2200	2.928	43	0.3700	6.219	76	0.4060	9.887
11	0.2300	3.074	44	0.3710	6.283	77	0.4080	9.951
12	0.2350	3.161	45	0.3720	6.359	78	0.4100	10.007
13	0.2400	3.263	46	0.3730	6.449	79	0.4125	10.068
14	0.2500	3.499	47	0.3740	6.542	80	0.4150	10.125
15	0.2600	3.756	48	0.3750	6.643	81	0.4175	10.176
16	0.2700	3.996	49	0.3760	6.756	82	0.4200	10.223
17	0.2800	4.208	50	0.3770	6.883	83	0.4250	10.309
18	0.2850	4.305	51	0.3780	7.006	84	0.4300	10.386
19	0.2875	4.353	52	0.3790	7.143	85	0.4350	10.453
20	0.2900	4.399	53	0.3800	7.287	86	0.4400	10.514
21	0.2925	4.446	54	0.3810	7.422	87	0.4450	10.568
22	0.2950	4.491	55	0.3820	7.578	88	0.4500	10.619
23	0.3000	4.577	56	0.3830	7.727	89	0.4550	10.659
24	0.3050	4.665	57	0.3840	7.875	90	0.4600	10.701
25	0.3100	4.749	58	0.3850	8.026	91	0.4650	10.744
26	0.3150	4.834	59	0.3860	8.169	92	0.4700	10.781
27	0.3200	4.919	60	0.3870	8.319	93	0.4751	10.818
28	0.3250	5.003	61	0.3880	8.467	94	0.4801	10.852
29	0.3300	5.093	62	0.3890	8.619	95	0.4900	10.914
30	0.3350	5.183	63	0.3900	8.768	96	0.5000	10.969
31	0.3375	5.229	64	0.3910	8.901	97	0.5100	11.020
32	0.3400	5.278	65	0.3920	8.023	98	0.5201	11.068
33	0.3450	5.379	66	0.3930	9.136			

Tabela 24: Funções de Gran modificadas referentes à titulação dada na Tabela 23

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.0000	2.025	2.8298E-01	2.8163E-01	4.8079E-01
0.0400	2.102	2.3724E-01	2.3664E-01	2.5173E-01
0.0800	2.195	1.9164E-01	1.9166E-01	-8.3192E-03
0.1100	2.281	1.5723E-01	1.5792E-01	-4.3470E-01
0.1300	2.348	1.3471E-01	1.3542E-01	-5.2684E-01
0.1500	2.428	1.1194E-01	1.1293E-01	-8.7889E-01
0.1700	2.524	8.9534E-02	9.0438E-02	-1.0002E+00
0.1800	2.581	7.8352E-02	7.9192E-02	-1.0599E+00
0.2000	2.725	5.5710E-02	5.6699E-02	-1.7438E+00
0.2200	2.928	3.3803E-02	3.4206E-02	-1.1773E+00
0.2300	2.074	2.2899E-02	2.2960E-02	-2.6627E-01
0.2350	3.161	1.7713E-02	1.7336E-02	2.1731E+00
0.2400	3.263	1.2539E-02	1.1713E-02	7.0521E+00
0.2500	3.499	2.9189E-03	4.6679E-04	5.2532E+02
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
0.2504	9.0567E-03		-0.9999331	1.1246E+00
Para HA 1				
N1 = 25 N2 = 14				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3350	5.183	4.2012E-07	4.1857E-07	8.5085E-01
0.3375	5.229	3.7149E-07	3.6943E-07	5.5922E-01
0.3400	5.278	3.2149E-07	3.2228E-07	-2.4612E-01
0.3450	5.379	2.2641E-07	2.2799E-07	-6.9298E-01
0.3475	5.434	1.7846E-07	1.8085E-07	-1.3204E+00
0.3500	5.494	1.2907E-07	1.3370E-07	-3.4650E+00
0.3525	5.551	8.5961E-08	8.6559E-08	-6.9092E-01
0.3552	5.622	3.5498E-08	3.5643E-08	-4.0544E-01
0.3575	5.688	-7.6775E-09	-7.7303E-09	-6.8203E-01
0.3600	5.766	-5.4200E-08	-5.4875E-08	-1.2301E+00
0.3625	5.852	-1.0017E-07	-1.0202E-07	-1.8173E+00
0.3650	5.952	-1.4722E-07	-1.4916E-07	-1.3010E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.10667	3.8581E-03	4.72451	1.8858E-05	-0.99992800

continua

Para HA2				
N1 = 42 N2 = 9				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3675	6.072	2.3071E-08	2.2926E-08	6.3400E-01
0.3700	6.219	1.6464E-08	1.6530E-08	-4.0011E-01
0.3710	6.283	1.4056E-08	1.3971E-08	6.0622E-01
0.3720	6.359	1.1435E-08	1.1413E-08	1.9051E-01
0.3730	6.449	8.6547E-09	8.8546E-09	-2.2578E+00
0.3740	6.542	6.1365E-09	6.2961E-09	-2.5352E+00
0.3750	6.643	3.6912E-09	3.7378E-09	-1.2455E+00
0.3760	6.756	1.2065E-09	1.1794E-09	2.2990E+00
0.3770	6.883	-1.3779E-09	-1.3791E-09	-9.0677E-02
0.3780	7.006	-3.7458E-09	-3.9374E-09	-4.8673E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.01937	7.0058E-04	5.59203	2.5584E-06	-0.99989223
Para HA 3				
N1 = 53 N2 = 7				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3800	7.287	2.0881E-10	2.0699E-10	8.8222E-01
0.3810	7.422	1.6862E-10	1.6463E-10	2.6011E+00
0.3820	7.578	1.1874E-10	1.2170E-10	-2.4302E+00
0.3830	7.727	7.5292E-11	7.9059E-11	-4.7645E+00
0.3840	7.875	3.3882E-11	3.6415E-11	-6.9573E+00
0.3850	8.026	-7.7702E-12	-6.2279E-12	2.4765E+01
0.3860	8.169	-4.6764E-11	-4.8871E-11	-4.3118E+00
0.3870	8.320	-8.8921E-11	-9.1513E-11	-2.8321E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.00839	3.0355E-04	7.37015	4.2643E-08	-0.99957800
Para HA4				
N1 = 79 N2 = 7				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3890	8.619	7.9872E-12	7.8439E-12	1.8259E+00
0.3900	8.768	4.8720E-12	5.0110E-12	-2.7728E+00
0.3910	8.901	2.0900E-12	2.1779E-12	-4.0373E+00
0.3920	9.023	-6.3449E-13	-6.5503E-13	-3.1356E+00
0.3930	9.136	-3.4246E-12	-3.4881E-12	-1.8206E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.00691	2.5009E-04	8.54775	2.8330E-09	-0.99967611

continua

Para HA5				
N1 = 76 N2 = 14				
Volumie	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.4060	9.887	1.0693E-12	1.0487E-12	1.9668E+00
0.4080	9.951	1.0088E-12	1.0030E-12	5.7636E-01
0.4100	10.007	9.5803E-13	9.5733E-13	7.2300E-02
0.4125	10.068	9.0527E-13	9.0024E-13	5.5901E-01
0.4150	10.125	8.4338E-13	8.4315E-13	2.7055E-02
0.4175	10.176	7.8679E-13	7.8606E-13	9.3240E-02
0.4200	10.223	7.3016E-13	7.2897E-13	1.6420E-01
0.4250	10.309	6.0950E-13	6.1478E-13	-8.5906E-01
0.4300	10.386	4.8401E-13	5.0060E-13	-3.3132E+00
0.4350	10.453	3.6856E-13	3.8641E-13	-4.6206E+00
0.4400	10.514	2.5197E-13	2.7223E-13	-7.4409E+00
0.4450	10.568	1.4401E-13	1.5804E-13	-8.8786E+00
0.4500	10.619	2.9839E-14	4.3861E-14	-3.1968E+01
0.4550	10.659	-4.8867E-14	-7.0324E-14	-3.0511E+01
0.4600	10.701	-1.5222E-13	-1.8451E-13	-1.7499E+01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.06015	2.1755E-03	10.64136	2.2837E-11	-0.99927616
Número de iterações = 235				

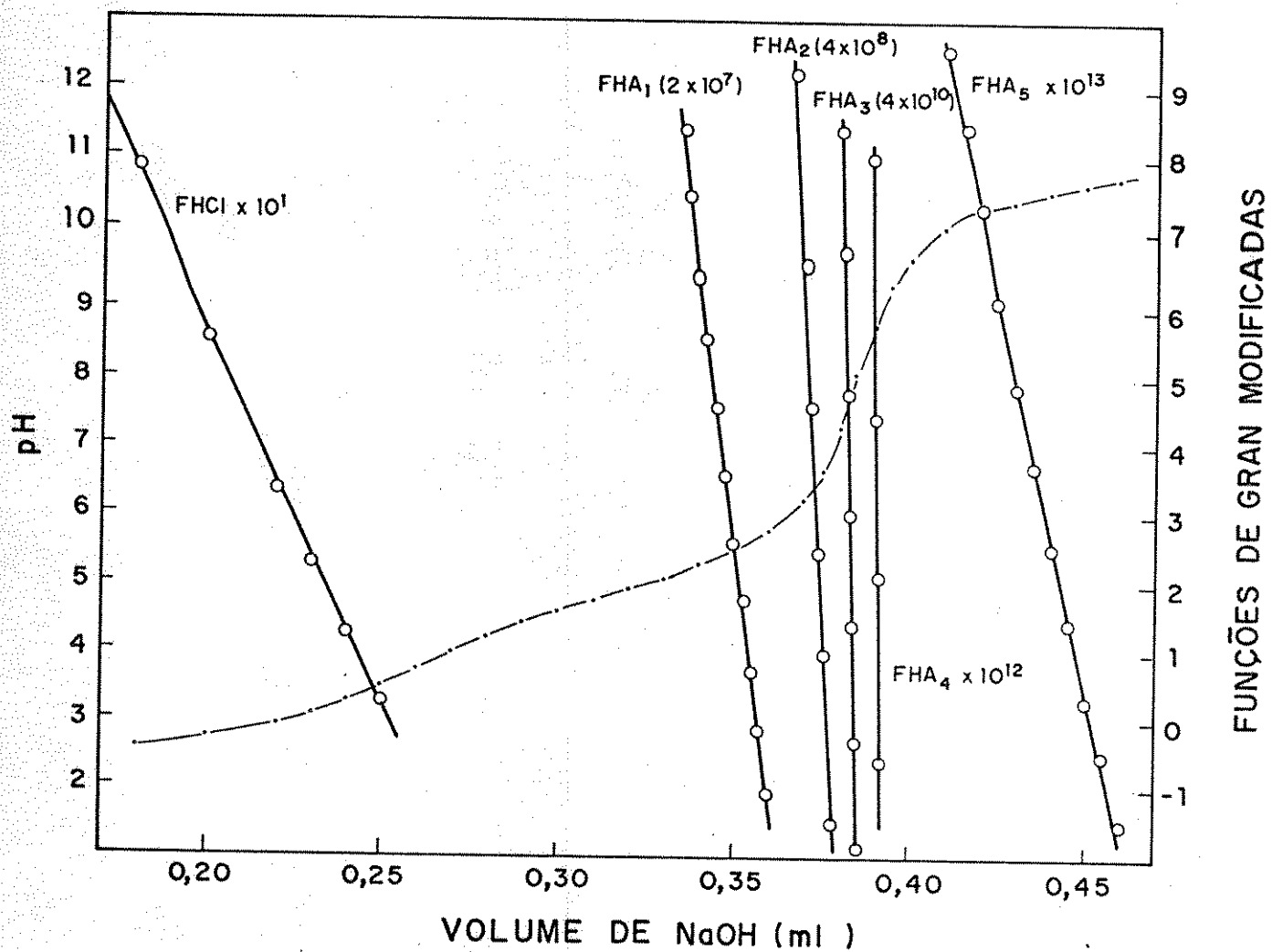


Figura 21: Curva de titulação da lisozima desnaturada em $GuHCl$ 6,0 M, segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas da Tabela 24

Tabela 25: Resultados obtidos pelo método de linearização aplicado a triplicata de titulações de lisozima desnaturada em *GuHCl* 6,0 M. A massa molecular foi considerada $14.500 \text{ g.mol}^{-1}$

Série	Número de Grupos. mol^{-1}	pK_a	Composição de Aminoácidos
HA_1	$11,4 \pm 0,3$	$4,73 \pm 0,03$	7-8 ASP
HA_2	$1,8 \pm 0,3$	$5,70 \pm 0,01$	2 GLU, 1 α -COOH
HA_3	$0,88 \pm 0,01$	$7,43 \pm 0,02$	1 HIS
HA_4	$0,67 \pm 0,05$	$8,56 \pm 0,02$	1- α -amino
HA_5	$6,3 \pm 0,1$	$10,64 \pm 0,01$	3 TYR
Total	$21,1 \pm 0,8$		6 LIS 11-12 ARG

Os $11,4 \pm 0,4$ grupos. mol^{-1} com $pK_a 4,73 \pm 0,03$, caracterizados na série HA_1 , podem ser atribuídos aos grupos carboxílicos. Este resultado é coerente com a composição de aminoácidos determinada por Canfield [73], que indica a presença de 8 resíduos de ácido aspártico, 2 resíduos de ácido glutâmico e 1 grupo carboxílico terminal, num total de 11 grupos. mol^{-1} . Estudos mais recentes [72], porém, indicam que um dos resíduos atribuídos ao ácido aspártico corresponde, na realidade, a um resíduo de asparagina, de modo que existiriam 10 e não 11 grupos carboxílicos na lisozima. Roxby e Tanford [63] já haviam feito esta suposição, a partir dos resultados da titulação de lisozima em *GuHCl* 6,0 M.

Por outro lado, os resultados da Tabela 25 indicam também a presença da série HA_2 , na qual foram determinados $1,8 \pm 0,3$ grupos. mol^{-1} com $pK_a 5,70 \pm 0,11$. Este pK_a pode ser característico, tanto para grupos carboxílicos como para grupos imidazóis. Admitindo-se que os dois grupos caracterizados nesta série podem ser atribuídos como um grupo carboxílico e um

grupo imidazol, estar-se-ia encontrando 12 grupos carboxílicos para lisozima, ou seja, um a mais que o número encontrado por Canfield [73] e dois a mais que o indicado por Imoto et. al. [78].

Outros trabalhos mostram que Donovan et. al. [79] encontraram 12 grupos carboxílicos na lisozima desnaturada em *GuHCl* 6,0 M, enquanto Tanford e Wagner [80] encontraram 14 grupos na proteína nativa. Sakakibara e Hamaguchi [81], por sua vez, determinaram 11 grupos carboxílicos. Assim, o número de grupos carboxílicos determinados por titulação é ainda polêmico e parece depender da amostra estudada.

Como, na maioria dos trabalhos, tem-se encontrado um número de grupos carboxílicos maior que o indicado pela composição de aminoácidos, sugeriu-se que o *GuHCl* poderia reagir com a proteína em soluções ácidas, produzindo novos grupos tituláveis. Esta possibilidade deve ser descartada, uma vez que outras proteínas, como ovalbumina e ribonuclease, não apresentaram comportamento análogo em *GuHCl* 6,0 M.

A presença de impurezas tituláveis na solução de *GuHCl* 6,0 M, em níveis próximos a $1 \times 10^{-4}M$, envolveriam um erro de cerca de 0,5 grupos. mol^{-1} no número total de grupos determinados na lisozima, o que não explicaria a estequiometria encontrada para os grupos carboxílicos.

Sabe-se que os resíduos de ácido glutâmico 7 e o grupo carboxílico terminal da leucina 129 participam da formação de pares iônicos com grupos ϵ -amino das lisinas 1 e 13, respectivamente, o que levaria estes grupos a serem titulados com pK_a 's anormalmente baixos na

proteína nativa [82]. Em *GuHCl* estes pares iônicos são destruídos e os dois grupos carboxílicos titulados com pK_a normal, de modo que seriam determinados de 12 a 13 grupos na região ácida. Esta explicação seria lógica para explicar a diferença observada entre a estequiometria dos grupos carboxílicos determinada na proteína nativa e desnaturada, porém, não é concordante com os dados da composição de aminoácidos.

A divisão dos grupos carboxílicos em séries com pK_a 's distintos parece ter sido diminuída, principalmente admitindo-se correta a composição de aminoácidos determinada por Canfield [73]. Este resultado é coerente com os estudos anteriores sobre a influência das interações eletrostáticas nas constantes de dissociação, uma vez que em *GuHCl* 6,0 M tais interações são minimizadas.

A presença de um grupo imidazólico, caracterizada na série HA_2 , com pK_a $5,70 \pm 0,11$, estaria coerente com a composição de aminoácidos. O pK_a também seria coerente com o valor 6,12 determinado para histidina em *GuHCl* 6,0 M por Nozaki e Tanford [61], uma vez que refletiria a média entre o pK_a do grupo imidazol e de um grupo carboxílico.

Na série HA_3 , os $0,88 \pm 0,01$ grupos. mol^{-1} com pK_a $7,43 \pm 0,06$ podem ser atribuídos ao grupo α -amino terminal, em boa concordância com a composição de aminoácidos e com o pK_a 7,6 determinado para este grupo em *GuHCl* 6,0 M por Roxby e Tanford [63].

Nas séries HA_4 e HA_5 foram determinados, respectivamente, $0,67 \pm 0,05$ grupos. mol^{-1} com pK_a $8,56 \pm 0,02$ e $6,3 \pm 0,1$ grupos. mol^{-1} com pK_a $10,64 \pm 0,01$, que devem correspon-

der à titulação de grupos fenólicos e ϵ -aminos. Porém, a soma dos grupos pertencentes a HA_4 e HA_5 , $7,0 \pm 0,1$ grupos. mol^{-1} , não corresponde aos 9 grupos esperados pela composição de aminoácidos (3 TYR e 6 LIS). Os $6,3 \pm 0,1$ grupos. mol^{-1} caracterizados na série HA_5 podem ser atribuídos aos 6 grupos ϵ -amino da lisina, uma vez que, mesmo na proteína nativa, eles são tituláveis [63,80].

Os grupos fenólicos, por outro lado, não são tituláveis na proteína nativa e os resultados obtidos indicam que apenas um destes grupos foi titulado em $GuHCl$ 6,0 M, ou seja, que a desnaturação não foi completa, ao contrário do observado por Roxby e Tanford [63] e por Donovan et. all. [79]. Segundo estes autores, os 3 grupos fenólicos foram determinados por titulação espectrofotométrica com pK_a $9,8 \pm 0,1$ e os 6 grupos ϵ -amino por titulação potenciométrica com pK_a 10,35 [63].

O número total de grupos indicados na Tabela 25 como $21,1 \pm 0,8$ grupos. mol^{-1} , entretanto, é coerente com a composição de aminoácidos dada por Imoto et. all. [78]. Este valor também é coerente com o valor encontrado por Silva, após a desnaturação da lisozima em uréia 9,3 M ($20,7 \pm 1,1$ grupos. mol^{-1}). Os resultados obtidos por Silva[56] são bastante coerentes com a composição de aminoácidos de Canfield[73], admitindo-se a presença de 11 grupos carboxílicos e que apenas 2 grupos fenólicos são titulados, indicando que a desnaturação não é completa em uréia 9,3 M.

Como se pode notar, a interpretação da curva de titulação da lisozima em $GuHCl$ é bastante difícil, principalmente comparando-se os resultados com os obtidos por Roxby e

Tanford [63]. O fato do número total de grupos determinados aqui ser concordante com o indicado por Imoto et. al. pode sugerir que a desnaturação é completa, mas que os grupos fenólicos estariam sendo titulados com pK_a 's anormalmente baixos. Esta explicação, apesar de pouco provável, pode ser tentada, uma vez que a lisozima é uma proteína relativamente pequena, com quatro pontes dissulfeto em sua molécula que permanecem intactas em $GuHCl$ 6,0 M . Estas pontes dissulfeto conferem grande estabilidade ao estado nativo e um certo grau de ordenação após o processo de desnaturação, de modo que poder-se-ia inferir que a lisozima não tenha atingido o estado que possa ser caracterizado como de enrolamento aleatório. Com isso, alguns grupos poderiam estar sujeitos a fortes interações locais, alterando significativamente seu comportamento ácido-base. Por outro lado, deve-se lembrar que esta explicação ainda está em desacordo com os resultados obtidos por Roxby e Tanford [63].

5.3.2 Titulações de Ovalbumina

Os dados de uma das curvas de titulação da ovalbumina em $GuHCl$ 6,0 M são mostrados na Tabela 26. As funções de Gran modificadas para esta titulação são mostradas na Tabela 27 e a representação gráfica da curva segmenada e linearizada aparece na Figura 21.

Tabela 26: Titulação de 30,00 ml de solução de ovalbumina $7,142 \times 10^{-5} M$ em $GuHCl$ 6,0 M, na presença de excesso de ácido forte com $NaOH$ 1,085 M. Parâmetros obtidos da calibração dos eletrodos em $GuHCl$ 6,0 M: $E^\circ = 638,1 mV$; $J_H = 22,39 mV.M^{-1}$; $J_{OH} = 0 mV.M^{-1}$ e $K_W = 2,419 \times 10^{-14}$

Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH	Ponto	Volume(ml)	pH
1	0.0000	2.025	43	0.2740	4.131	85	0.3580	7.243
2	0.0100	2.044	44	0.2760	4.184	86	0.3590	7.341
3	0.0200	2.062	45	0.2780	4.233	87	0.3600	7.469
4	0.0300	2.081	46	0.2800	4.285	88	0.3610	7.601
5	0.0400	2.102	47	0.2820	4.334	89	0.3620	7.719
6	0.0500	2.122	48	0.2840	4.378	90	0.3630	7.863
7	0.0600	2.144	49	0.2860	4.423	91	0.3640	8.025
8	0.0700	2.168	50	0.2880	4.469	92	0.3650	8.191
9	0.0800	2.191	51	0.2900	4.515	93	0.3660	8.274
10	0.0900	2.218	52	0.2925	4.569	94	0.3670	8.543
11	0.1000	2.245	53	0.2950	4.621	95	0.3680	8.695
12	0.1100	2.274	54	0.2975	4.672	96	0.3690	8.827
13	0.1200	2.305	55	0.3000	4.726	97	0.3700	8.942
14	0.1300	2.339	56	0.3025	4.775	98	0.3710	9.033
15	0.1400	2.375	57	0.3050	4.828	99	0.3720	9.118
16	0.1500	2.415	58	0.3075	4.879	100	0.3730	9.192
17	0.1600	2.459	59	0.3100	4.932	101	0.3740	9.259
18	0.1700	2.506	60	0.3125	4.984	102	0.3750	9.322
19	0.1800	2.560	61	0.3150	5.035	103	0.3760	9.376
20	0.1900	2.623	62	0.3175	5.091	104	0.3780	9.481
21	0.2000	2.693	63	0.3200	5.149	105	0.3800	9.571
22	0.2100	2.776	64	0.3225	5.206	106	0.3820	9.652
23	0.2200	2.877	65	0.3255	5.276	107	0.3840	9.726
24	0.2250	2.938	66	0.3276	5.335	108	0.3860	9.794
25	0.2300	3.009	67	0.3300	5.394	109	0.3882	9.858
26	0.2375	3.131	68	0.3325	5.472	110	0.3900	9.910
27	0.2400	3.179	69	0.3350	5.553	111	0.3925	9.981
28	0.2425	3.230	70	0.3375	5.641	112	0.3950	10.037
29	0.2450	3.286	71	0.3400	5.744	113	0.3976	10.096
30	0.2475	3.348	72	0.3420	5.828	114	0.4000	10.145
31	0.2500	3.416	73	0.3440	5.942	115	0.4050	10.240
32	0.2520	3.470	74	0.3460	6.065	116	0.4100	10.325
33	0.2540	3.528	75	0.3470	6.132	117	0.4150	10.399
34	0.2560	3.588	76	0.3480	6.213	118	0.4200	10.468
35	0.2580	3.651	77	0.3500	6.391	119	0.4250	10.529
36	0.2600	3.715	78	0.3510	6.493	120	0.4300	10.583
37	0.2620	3.779	79	0.3520	6.602	121	0.4350	10.636
38	0.2640	3.842	80	0.3530	6.706	122	0.4400	10.681
39	0.2660	3.901	81	0.3640	6.812	123	0.4500	10.766
40	0.2680	3.962	82	0.3550	6.918	124	0.4600	10.840
41	0.2700	4.019	83	0.3560	7.027	125	0.4700	10.908
42	0.2720	4.075	84	0.3570	7.132			

Tabela 27: Funções de Gran modificadas para os dados da Tabela 26

Para HCl				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.0000	2.025	2.8307E-01	2.8096E-01	7.5339E-01
0.0100	2.044	2.7104E-01	2.7001E-01	3.7843E-01
0.0200	2.062	2.6011E-01	2.5907E-01	4.0010E-01
0.0300	2.081	2.4904E-01	2.4812E-01	3.6924E-01
0.0400	2.102	2.3735E-01	2.3718E-01	7.0937E-02
0.0500	2.122	2.2673E-01	2.2624E-01	2.1658E-01
0.0600	2.144	2.1558E-01	2.1529E-01	1.3415E-01
0.0700	2.168	2.0404E-01	2.0435E-01	-1.5162E-01
0.0800	2.191	1.9356E-01	1.9340E-01	7.9274E-02
0.0900	2.218	1.8192E-01	1.8246E-01	-2.9307E-01
0.1000	2.245	1.7099E-01	1.7151E-01	-3.0722E-01
0.1100	2.274	1.5996E-01	1.6057E-01	-3.7730E-01
0.1200	2.305	1.4896E-01	1.4963E-01	-4.4673E-01
0.1300	2.339	1.3774E-01	1.3868E-01	-6.7609E-01
0.1400	2.375	1.2678E-01	1.2774E-01	-7.4954E-01
0.1500	2.415	1.1560E-01	1.1679E-01	-1.0178E+00
0.1600	2.459	1.0443E-01	1.0585E-01	-1.3408E+00
0.1700	2.506	9.3664E-02	9.4903E-02	-1.3056E+00
0.1800	2.560	8.2633E-02	8.3958E-02	-1.5792E+00
0.1900	2.623	7.1356E-02	7.3014E-02	-2.2707E+00
0.2000	2.693	6.0572E-02	6.2070E-02	-2.4136E+00
0.2100	2.776	4.9797E-02	5.1125E-02	-2.5986E+00
0.2200	2.877	3.9102E-02	4.0181E-02	-2.6842E+00
0.2250	2.938	3.3701E-02	3.4709E-02	-2.9038E+00
0.2300	3.009	2.8244E-02	2.9236E-02	-3.3947E+00
0.2375	3.131	2.0562E-02	2.1028E-02	-2.2143E+00
0.2400	3.180	1.7982E-02	1.8292E-02	-1.6932E+00
0.2425	3.230	1.5556E-02	1.5556E-02	-1.0717E-03
0.2450	3.286	1.3100E-02	1.2820E-02	2.1887E+00
0.2475	3.349	1.0612E-02	1.0084E-02	5.2349E+00
0.2500	3.415	8.2389E-03	7.3476E-03	1.2131E+01
0.2520	3.470	6.3990E-03	5.1587E-03	2.4044E+01
0.2540	3.528	4.5913E-03	2.9698E-03	5.4601E+01
0.2560	3.589	2.8000E-03	7.8088E-04	2.5857E+02
0.2580	3.651	1.0266E-03	-1.40080E-03	-1.7291E+02
0.2600	3.715	-7.5062E-04	-3.5968E-03	-7.9131E+01
VHCL	CHCL		R	INCL.FHCL
0.2567	9.2845E-03		-0.9999162	1.0944E+00

continua

Para HA 1				
N1 = 70 N2 = 9				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3375	5.641	1.8001E-07	1.7813E-07	1.0548E+00
0.3400	5.744	1.4406E-07	1.4499E-07	-6.4290E-01
0.3420	5.828	1.1924E-07	1.1848E-07	6.4172E-01
0.3440	5.942	9.0042E-08	9.1969E-08	-2.0943E+00
0.3460	6.065	6.4174E-08	6.5456E-08	-1.9587E+00
0.3470	6.132	5.1982E-08	5.2200E-08	-4.1753E-01
0.3480	6.213	3.8565E-08	3.8944E-08	-9.7326E-01
0.3500	6.391	1.3063E-08	1.2431E-08	5.0811E+00
0.3510	6.493	-2.4052E-11	-8.2537E-10	-9.7086E+01
0.3520	6.602	-1.3413E-08	-1.4082E-08	-4.7464E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.09422	3.4078E-03	4.87758	1.3256E-05	-0.99983686
Para HA2				
N1 = 83 N2 = 12				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3560	7.027	5.6635E-10	5.5205E-10	2.5895E+00
0.3570	7.132	5.0488E-10	4.9487E-10	2.0216E+00
0.3580	7.243	4.3758E-10	4.3769E-10	-2.5162E-02
0.3590	7.341	3.8701E-10	3.8052E-10	1.7058E+00
0.3600	7.470	3.1269E-10	3.2333E-10	-3.2917E+00
0.3610	7.601	2.4655E-10	2.6616E-10	-7.3663E+00
0.3620	7.720	1.9662E-10	2.0898E-10	-5.9139E+00
0.3630	7.863	1.4051E-10	1.5180E-10	-7.4322E+00
0.3640	8.026	8.4466E-11	9.4611E-11	-1.0728E+01
0.3650	8.191	3.3824E-11	3.7435E-11	-9.6470E+00
0.3660	8.274	1.1997E-11	-1.9742E-11	-1.6077E+02
0.3670	8.543	-7.4806E-11	-7.6923E-11	-2.7521E+00
0.3680	8.695	-1.3097E-10	-1.3410E-10	-2.3366E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.01472	5.3226E-04	7.24276	5.7180E-08	-0.99810469
continua				

Para HA 3				
N1 = 97 N2 = 9				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3700	8.942	2.9416E-12	2.9617E-12	-6.7710E-01
0.3710	9.033	2.6868E-12	2.6604E-12	9.8954E-01
0.3720	9.118	2.3573E-12	2.3592E-12	-7.9706E-02
0.3730	9.192	2.0587E-12	2.0580E-12	3.5403E-02
0.3740	9.260	1.7527E-12	1.7568E-12	-2.3343E-01
0.3750	9.322	1.4408E-12	1.4556E-12	-1.0140E+00
0.3760	9.376	1.1778E-12	1.1543E-12	2.0330E+00
0.3780	9.481	5.4257E-13	5.5190E-13	-1.6898E+00
0.3800	9.571	-5.2236E-14	-5.0543E-14	3.3498E+00
0.3820	9.652	-6.5160E-13	-6.5298E-13	-2.1253E-01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.01418	5.1275E-04	9.52112	3.0122E-10	-0.99992162
Para HA4				
N1 = 110 N2 = 12				
Volume	pH	FG.MODIF	FG.AJUST	Desvio
0.3900	9.910	1.0491E-12	1.0377E-12	1.0986E+00
0.3925	9.981	9.6000E-13	9.7528E-13	-1.5667E+00
0.3950	10.037	9.2071E-13	9.1287E-13	8.5779E-01
0.3976	10.096	8.5115E-13	8.4798E-13	3.7171E-01
0.4000	10.145	7.9505E-13	7.8808E-13	8.8511E-01
0.4050	10.240	6.6512E-13	6.6327E-13	2.7802E-01
0.4100	10.325	5.3165E-13	5.3848E-13	-1.2682E+00
0.4150	10.399	4.0914E-13	4.1368E-13	-1.0960E+00
0.4200	10.468	2.7717E-13	2.8887E-13	-4.0533E+00
0.4250	10.529	1.5479E-13	1.6407E-13	-5.6617E+00
0.4300	10.583	4.1738E-14	3.9274E-14	6.2743E+00
0.4350	10.636	-8.6857E-14	-8.5525E-14	1.5567E+00
0.4400	10.681	-1.9502E-13	-2.1033E-13	-7.2781E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0.05174	1.8713E-03	10.60275	2.4960E-11	-0.99976206
Número de iterações = 66				

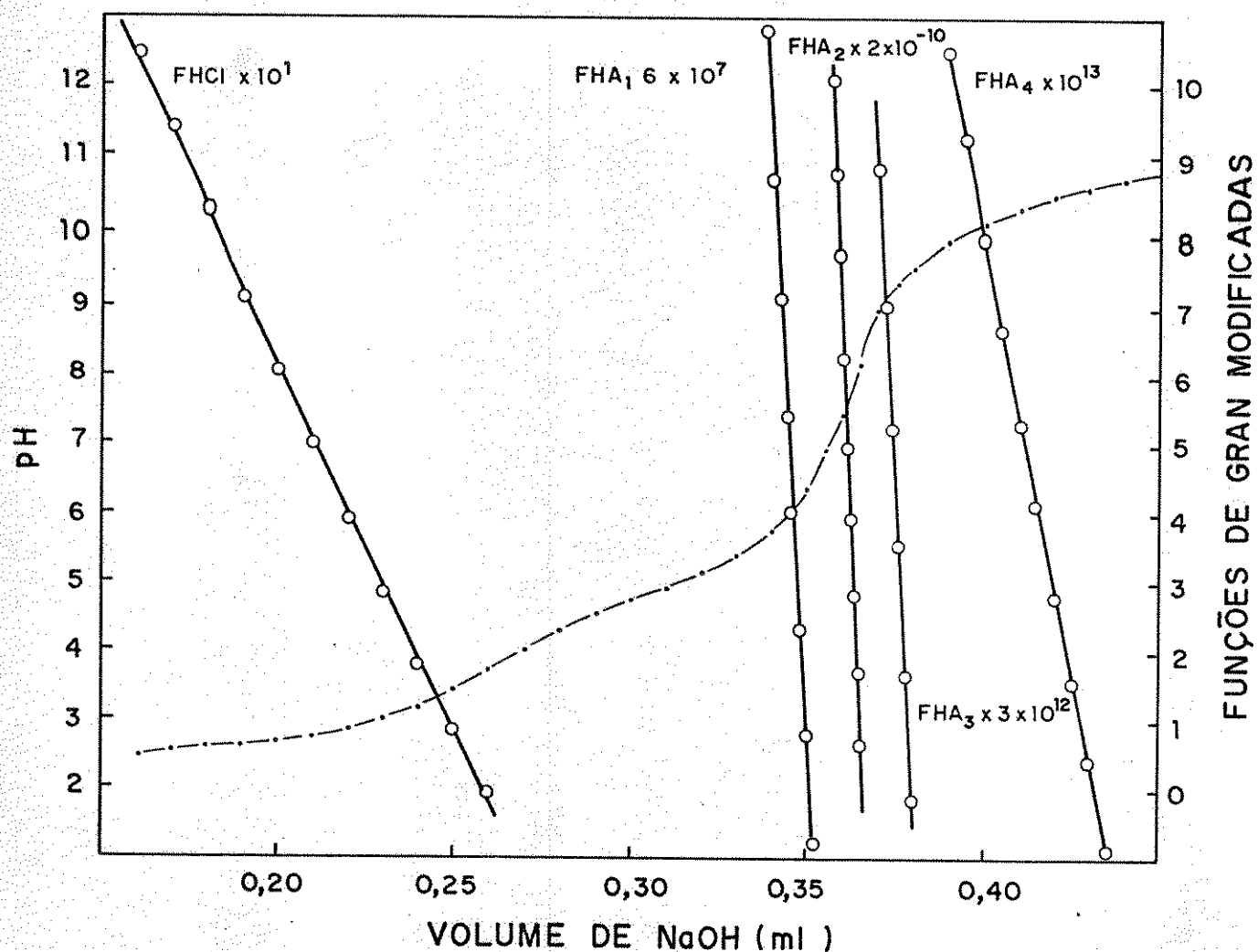


Figura 22: Curva de titulação de ovalbumina em $GuHCl$ 6,0 M, segmentada e linearizada pela funções de Gran modificadas da Tabela 27

Tabela 28: Resultados obtidos pelo método de linearização aplicado a triplicata de titulações de ovalbumina desnaturada em *GuHCl* 6,0 M. A massa molecular foi considerada 45.000 g.mol⁻¹

Série	Número de Grupos.mol ⁻¹	pKa	Composição de Aminoácidos
HA ₁	46,8 ± 0,3	4,87 ± 0,01	14 ASP
HA ₂	7,47 ± 0,06	7,23 ± 0,01	33 GLU
HA ₃	7,3 ± 0,7	9,49 ± 0,06	7 HIS
HA ₄	26,7 ± 0,5	10,64 ± 0,06	4 CYS 10 TYR 20 LIS
Total	88,4 ± 1,6		88

Os 46,8 ± 0,3 grupos.mol⁻¹ com pKa 4,87 ± 0,01, caracterizados na série HA₁, podem ser seguramente atribuídos à soma dos 14 resíduos de ácido aspártico e aos 33 resíduos de ácido glutâmico dados pela composição de aminoácidos[74]. Assim, o total de grupos carboxílicos presentes na ovalbumina está em ótima concordância com o número determinado nas titulações em *GuHCl* 6,0 M. O valor de pKa 4,87 ± 0,01 está em boa concordância com o valor 4,55 determinado para o ácido acético em *GuHCl* 6,0 M por Nozaki e Tanford [61].

Não foi possível a separação entre as duas classes de grupos carboxílicos, ácido aspártico e ácido glutâmico, como obtido por Nozaki e Tanford [61] para a ribonuclease. Acredita-se que esta separação não é possível, uma vez que a diferença de pKa entre esses grupos é inferior a meia unidade, estando abaixo da capacidade de resolução de uma mistura pelo método de linearização [72].

Os $7,47 \pm 0,06$ grupos. mol^{-1} com pK_a $7,23 \pm 0,01$, referentes à série HA_2 , podem ser atribuídos aos grupos imidazóis, uma vez que dados da composição de aminoácidos indicam a presença de 7 destes grupos por mol de proteína. O pK_a determinado está em ótima concordância com o valor 7,18 obtido por Nozaki e Tanford [61] para o imidazol em GuHCl 6,0 M .

Uma análise das séries HA_3 , $7,3 \pm 0,7$ grupos. mol^{-1} com pK_a $9,49 \pm 0,06$ e HA_4 , $26,1 \pm 0,4$ grupos. mol^{-1} com pK_a $10,64 \pm 0,06$, indica a presença de $33,4 \pm 1,1$ grupos. mol^{-1} tituláveis na região de pH alcalino. Deve-se lembrar que esta região da curva de titulação de uma proteína é bastante complexa, em virtude do fato que espécies de diferentes naturezas químicas são tituladas simultaneamente. Assim, na ovalbumina são titulados 4 grupos sulfidrílicos, 10 grupos fenólicos e 20 grupos ϵ -amino com pK_a 's entre 9,0 e 10,50. Deste modo, o número de grupos encontrados na soma das séries HA_3 e HA_4 , $33,4 \pm 1,1$ grupos. mol^{-1} está em boa concordância com os 34 grupos. mol^{-1} indicados pela composição de aminoácidos.

Comparando-se os resultados obtidos em GuHCl 6,0 M com os obtidos por Silva [56], em uréia 9,3 M , pode-se observar que os resultados obtidos no primeiro caso são mais facilmente correlacionados com a composição de aminoácidos, uma vez que os grupos carboxílicos foram caracterizados em uma única série, enquanto que em uréia 9,3 M foram divididos em três séries com pK_a 's distintos. Além disso, em GuHCl 6,0 M foi possível caracterizar individualmente os grupos imidazóis, enquanto em uréia foram titulados junto com grupos fenólicos, sulfidrílicos e aminos. O número total de grupos determinados em uréia 9,3 M , $88,5 \pm 1,7$ grupos. mol^{-1} ,

está em boa concordância com os $88,1 \pm 1,5$ grupos. mol^{-1} determinados em GuHCl 6,0 M, indicando que a extensão da desnaturação se assemelha nos dois solventes.

Diferentes preparações de ovalbumina podem vir acompanhadas de 0, 1 ou 2 serinas fosforiladas por mol de proteína [85]. Como os resultados obtidos ajustam-se muito bem aos dados da composição de aminoácidos, pode-se inferir que a amostra de ovalbumina estudada não contém grupos fosforilados. Por outro lado, um desvio de 1 ou 2 grupos tituláveis na ovalbumina estaria dentro do erro observado para essa proteína, o que impede uma afirmação conclusiva sobre a presença ou não de grupos PO_4^{3-} na amostra estudada.

Finalmente, pode-se concluir que o comportamento da curva de titulação da ovalbumina em GuHCl 6,0 M apresenta uma ótima concordância com aquele esperado para o estado conformacional de um enrolamento aleatório [60,61,62]. Com isso, todos os grupos tituláveis estão expostos ao solvente e seus pK_a 's assemelham-se aos de compostos modelo. Comparando-se os resultados obtidos para lisozima, deve-se lembrar que a ovalbumina tem uma molécula cerca de três vezes maior e contém apenas uma ponte dissulfeto [74], de modo que a conformação caracterizada por enrolamento aleatório é mais favorável.

A determinação dos grupos de mesma natureza química em uma única série nas titulações em GuHCl 6,0 M é coerente com as predições teóricas para os casos em que as interações eletrostáticas são minimizadas. Com isso, comprova-se mais uma vez a adequabilidade analítica do tratamento dos grupos tituláveis de proteínas como uma mistura de ácidos fracos monopróticos.

6 Determinação do Ponto Isoelétrico de Proteínas e seu Emprego na Atribuição da Natureza Química dos Grupos Caracterizados por Titulação

6.1 Considerações Gerais

O ponto isoelétrico de uma proteína ou peptídeo tem muita importância em processos de separação, tanto de interesse analítico como preparativo. O pI é definido como o pH da solução no qual a carga da proteína é zero. Deste modo, o pI é diretamente relacionado ao número e natureza química dos grupos ionizáveis presentes na molécula, ou seja, aqueles grupos que possuem carga na forma ácida ou básica [71].

Atualmente, o processo mais empregado na determinação do pI é baseado na mobilidade da proteína frente à aplicação de um campo elétrico, técnica conhecida por focalização isoelétrica [86,92,94,95,96].

Métodos computacionais para determinação do pI baseiam-se exclusivamente na composição de aminoácidos (estrutura primária) e pK_a 's de compostos modelo [71,93]. Estes métodos funcionam muito bem para cadeias polipeptídicas que apresentam a conformação caracterizada pelo enrolamento aleatório. Por outro lado, tratando-se de proteínas nativas que têm uma arquitetura molecular bem definida (estrutura terciária), na qual os grupos ionizáveis podem estar sujeitos a vários tipos de interações, a aplicação destes métodos computacionais pode ser comprometido.

Geralmente, titulações de proteínas são realizadas a partir do ponto isoelétrico para os extremos de pH . Porém, na aplicação do método linear desenvolvido por Godinho e Aleixo [26], o conhecimento do pI não é necessário e a titulação é realizada diretamente de um extremo a outro de pH . Com isso torna-se interessante um estudo sobre a possibilidade de determinação do ponto isoelétrico a partir da estequiometria e pK_a 's de grupos caracterizados pela referida metodologia. Deve-se lembrar que o número de grupos guanidinos da arginina não pode ser determinado por titulação em meio aquoso [30,31], de modo que este dado é obtido a partir da composição de aminoácidos.

Com o uso da estequiometria e pK_a 's obtidos por titulação evita-se considerar grupos que aparecem na composição de aminoácidos, mas que na proteína nativa localizam-se em regiões hidrofóbicas da molécula, não sendo acessíveis ao solvente e que, portanto, não contribuem com a carga da macromolécula. Além disso, os pK_a 's determinados por titulação refletem diretamente as influências a que estão sujeitas as dissociações dos grupos, ao contrário dos pK_a 's de compostos modelo [93].

Assim, propõe-se aqui um método computacional para estimar o pI de proteínas a partir de uma combinação de informações dadas pela composição de aminoácidos e resultados de titulações potenciométricas, particularmente, obtidos pelo método linear aqui estudado.

Ajustes entre o pI calculado pelo método proposto e o pI determinado por focalização isoelétrica podem ser muito úteis na atribuição na natureza química de grupos englobados nas diferentes séries determinadas pelo método de linearização, particularmente, aquelas da região

alcalina.

6.2 Resultados e Discussão

A metodologia, descrita no item 3.4, foi aplicada à lisozima e ovalbumina usando-se os resultados obtidos pelo método de linearização mostrados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente. Os valores de pI calculados são mostrados na Tabela 29 comparativamente com os pI 's determinados por focalização isoeletrica.

Tabela 29: pI calculado pelo método proposto e determinado por focalização isoeletrica

Proteína	pI		
	Meio Iônico		Focalização Isoeletrica[87]
	KCl 0,10 M	KCl 1,0 M	
Ovalbumina	4,87	5,08	4,90
Lisozima	10,84	10,92	11,10

Para ovalbumina foram admitidas as seguintes considerações. Para os resultados em KCl 0,10 M , os $46,3 \pm 0,5$ grupos. mol^{-1} referentes à soma das séries HA_1 , HA_2 e HA_3 foram atribuídos aos grupos carboxílicos em boa concordância com a composição de aminoácidos e com o fato de não existirem grupos desta natureza em regiões hidrofóbicas da molécula, ou seja, inaccessíveis ao solvente.

Os $3,2 \pm 0,1$ grupos. mol^{-1} com pKa $6,81 \pm 0,04$ da série HA_4 foram admitidos como imidazóis da histidina. Como a composição de aminoácidos indica a presença de sete destes grupos por mol de proteína, pode-se concluir que cerca de 3 grupos. mol^{-1} estão localizados em

regiões hidrofóbicas da molécula não contribuindo com a sua carga.

Aos $6,0 \pm 0,8$ grupos. mol^{-1} com pK_a $8,96 \pm 0,01$ da série HA_5 foi atribuída a dissociação do tipo $HA_5 \rightleftharpoons H^+ + A_5^-$, característica para grupos fenólicos ou sulfidrílicos, uma vez que o valor de pK_a é muito alto para ser atribuído a grupos imidazóis ou a fosfato. Por outro lado, estudos anteriores com ovalbumina indicam que os grupos fenólicos e sulfidrílicos não são tituláveis na proteína nativa [41]. Portanto, o resultado aqui obtido é interessante, pois indica que cerca de seis, dos catorze grupos. mol^{-1} referentes à soma de grupos fenólicos e sulfidrílicos estão expostos ao solvente, sendo titulados com pK_a normal.

Os $6,2 \pm 0,4$ grupos. mol^{-1} com pK_a $9,59 \pm 0,09$ referentes à série HA_6 e os $13,5 \pm 0,2$ grupos. mol^{-1} com pK_a $10,69 \pm 0,02$ da série HA_7 correspondem, provavelmente, aos grupos ϵ -aminos da lisina em ótima concordância com a composição de aminoácidos, que indica a presença de 20 lisinas por mol de ovalbumina. Deste modo, pode-se concluir que na estrutura nativa todos estes grupos são expostos ao solvente e tituláveis com pK_a 's normais.

No cálculo do pI considerou-se ainda a presença de 14 grupos guanidinos. mol^{-1} que contribuem com carga positiva. Este dado foi obtido a partir da composição de aminoácidos [74].

Quanto aos resultados obtidos em KCl 1,0 M, os $46,1 \pm 0,2$ grupos. mol^{-1} determinados nas séries HA_1 e HA_2 e dados na Tabela 21, foram atribuídos aos grupos carboxílicos. Os $4,9 \pm 0,1$ grupos. mol^{-1} com pK_a $6,71 \pm 0,02$ foram atribuídos aos imidazóis da histidina, indicando, a partir da composição de aminoácidos, que cerca de 3 grupos. mol^{-1} não são tituláveis

na proteína em KCl 1,0 M .

Os $9,0 \pm 0,2$ grupos. mol^{-1} com pK_a $9,26 \pm 0,02$ da série HA_5 foram divididos como 6,0 grupos. mol^{-1} tendo dissociação do tipo $HA_5 \rightleftharpoons A_5^- + H^+$ e 3,0 grupos. mol^{-1} dissociando como $HA_5^+ \rightleftharpoons A_5 + H^+$. Os $17,0 \pm 0,1$ grupos. mol^{-1} com pK_a $10,43 \pm 0,01$ da série HA_6 foram atribuídos aos grupos ϵ -amino que, juntamente com 3 grupos. mol^{-1} da série HA_5 , fecham o balanço de grupos aminos.

Novamente observou-se que, para se conseguir um bom ajuste entre o pI calculado e o pI dado na literatura, foi necessário admitir-se a presença de cerca de seis grupos fenólicos ou sulfidrílicos por mol de ovalbumina tituláveis com pK_a normal.

Quanto à lisozima, os resultados foram semelhantes em KCl 0,10 M ou KCl 1,0 M , valendo as mesmas atribuições nos dois casos. Assim, as séries HA_1 e HA_2 mostradas na Tabela 20 correspondem aos grupos carboxílicos, em concordância com a composição de aminoácidos determinada por Canfield [73], ou seja, com a presença de 11 grupos carboxílicos. mol^{-1} de lisozima. As séries HA_3 e HA_4 podem ser atribuídas ao grupo imidazólico da histidina e ao grupo α -amino terminal, respectivamente. Finalmente, os grupos determinados na série HA_5 podem ser atribuídos aos grupos ϵ -amino da lisina. A composição de aminoácidos indica a presença de 6 grupos ϵ -amino. mol^{-1} de lisozima, o que implica que 1,5 e 1,8 grupos. mol^{-1} não foram titulados em KCl 1,0 e 0,10 M , respectivamente.

Quanto a este último resultado, deve-se salientar que a formação de pares iônicos

entre o grupo amino da lisina 1 e o grupo carboxílico do ácido glutâmico 7, além do grupo amino da lisina 13 com o grupo α -carboxílico da leucina 129, tornam o pK_a dos grupos carboxílicos mais baixos que o normal e o pK_a dos grupos aminos mais alto [82]. O deslocamento do pK_a destes grupos aminos pode dificultar sua determinação por titulação em meio aquoso, uma vez que comportam-se como ácidos muito fracos. Por outro lado, é bem conhecido o fato que todos os grupos aminos da lisina são expostos ao solvente na lisozima nativa, contribuindo com carga [44,63]. Este fato pode explicar os valores de pI 10,84 e 10,92 calculados apresentarem um desvio sistemático abaixo do valor esperado.

Os resultados indicam também que é improvável a presença de dissociação do tipo $HA = H^+ + A^-$ na região alcalina da titulação da lisozima, confirmando estudos anteriores que determinaram que grupos fenólicos da tirosina não são tituláveis na proteína nativa [78,80].

No cálculo do pI da lisozima pelo método proposto foi considerada a presença de 11 grupos guanidínicos da arginina, dado obtido da composição de aminoácidos [73].

Deve-se lembrar que existem outros tipos de atribuições possíveis para os grupos determinados por titulação potenciométrica, que permitem bons ajustes entre o pI calculado e o pI dado por focalização isoeletrica, principalmente no que se refere aos grupos da região alcalina de pH . Dados de titulações ácido-base não permitem interpretações completamente conclusivas sobre a estrutura e as interações moleculares das proteínas, mas por outro lado, trazem um grande número de valiosas informações que, em conjunto com as obtidas por técnicas mais sofisticadas, podem permitir uma clara elucidação sobre características destes complexos

materiais.

Outros resultados para o pI de algumas proteínas, nas quais a metodologia de titulações potenciométricas foi aplicada, são mostrados na Tabela 30, comparativamente com valores obtidos por técnicas eletroforéticas [87,97,98].

Tabela 30: pI calculado para algumas proteínas

Proteína	pI calculado	pI literatura	Ref.
β -Lactoglobulina	5,22	5,39	77
Mioglobina	6,79	6,92	91
Insulina	5,55	5,60	87
Hemoglobina	7,14	7,10 - 7,20	87

7 Investigação sobre a Quantidade Mínima de Proteína que Pode ser Estudada por Titulação Potenciométrica

7.1 Considerações Gerais

Muitas vezes a massa de proteína que pode ser isolada de um dado meio é muito pequena. Com isso, é interessante conhecer a quantidade mínima de proteína que se presta à aplicação da técnica a ser usada, no caso titulação potenciométrica, e que permite a obtenção de resultados com boa exatidão e precisão, evitando desperdício de material. Por outro lado, estudos sistemáticos sobre os limites de aplicação da metodologia envolvida em titulações potenciométricas têm sido pouco divulgados. Além disso, a maior parte dos trabalhos desenvolvidos neste sentido se referem a métodos de cálculo que envolvem ajustes não lineares [1,2,28,88]. Dentro dos estudos envolvendo as limitações de métodos lineares [89], destacam-se alguns trabalhos sobre o método de Gran [9,12,13] ou envolvendo a equação de Ingman e Still [90]. Porém, tanto nos estudos com métodos lineares como naqueles que envolvem ajustes não lineares, os sistemas que foram estudados se referem a dados de titulações teóricas ou a titulações de um ácido fraco com base forte.

Um estudo mais sistemático sobre os limites de aplicação das funções de Gran modificadas do método de linearização na caracterização e determinação estequiométrica de espécies presentes em misturas mais complexas ainda não foi realizado, principalmente no que se refere à sua aplicação em casos ainda mais complicados como polieletrólitos ou proteínas.

7.2 Etapas Seguidas

Inicialmente, estudou-se o efeito da concentração na exatidão dos resultados obtidos pela aplicação do método de linearização a dados de curvas de titulação geradas teoricamente para misturas de ácidos fracos monoproticos, cuja composição escolhida procurou simular aquelas encontradas em proteínas. Tais curvas de titulação foram geradas pelo método descrito no item 3.1 para diferentes concentrações de proteína. As composições adotadas para obtenção das curvas de titulação são mostradas na Tabela 31.

Tabela 31: Estequiometria e pK_a 's para proteínas com massas moleculares 14500 g.mol^{-1} (composição I) e 45000 g.mol^{-1} (composição II)

Série	Composição I		Composição II	
	NG.mol ⁻¹	pK_a	NG.mol ⁻¹	pK_a
HA ₁	9,0	4,35	30,0	4,00
HA ₂	2,0	5,65	17,0	5,40
HA ₃	1,0	7,36	7,0	6,70
HA ₄	1,0	8,70	10,0	8,50
HA ₅	4,5	10,10	20,0	10,10

Os dados da Tabela 31, referentes à composição I, simulam a estequiometria e pK_a 's encontrados para lisozima. Para este caso, as curvas de titulação teóricas foram geradas adotando-se as seguintes concentrações de proteína: $3,290 \times 10^{-4}$, $1,602 \times 10^{-4}$, $5,260 \times 10^{-5}$, $1,721 \times 10^{-5}$ e $8,603 \times 10^{-6} M$.

A composição II simula aquela encontrada para ovalbumina e as curvas de titulação teóricas foram geradas adotando-se as seguintes concentrações de proteína: $7,407 \times 10^{-5}$; $3,704$

$\times 10^{-5}$; $2,222 \times 10^{-5}$; $7,407 \times 10^{-6}$; $2,857 \times 10^{-6}$ e $7,407 \times 10^{-7} M$.

A concentração para cada uma das séries ou ácidos HA_n , para os dois tipos de composição é dada pelo produto entre a concentração de proteína e o número de grupos. mol^{-1} referentes à série HA_n .

Deve-se lembrar que as curvas de titulação teóricas foram geradas simulando as condições experimentais disponíveis no laboratório, ou seja, cela de titulação Metrohm EA-865 e microeletrodo combinado de vidro Metrohm EA-125, que permitem o uso do volume inicial, V_0 , de 4.000 ml, usado nos cálculos. Para as adições do titulante considerou-se a disponibilidade da microbureta Metrohm E-457 com capacidade de 0,5 ml e precisão de 0,2 μl .

Após o estudo teórico, foram realizadas titulações experimentais de lisozima e ovalbumina em várias concentrações, segundo a técnica descrita no item 2. As titulações de lisozima foram realizadas em KCl 0,10 M nas concentrações $3,290 \times 10^{-4}$; $1,602 \times 10^{-4}$ e $5,260 \times 10^{-5} M$ com solução de $NaOH$ 0,1 M no primeiro caso e 0,01 M nos dois últimos. As titulações de ovalbumina foram realizadas nas concentrações $8,412 \times 10^{-5}$; $4,510 \times 10^{-5}$; $1,991 \times 10^{-5}$ e $8,193 \times 10^{-6} M$ com solução de $NaOH$ 0,1; 0,05; 0,01 e 0,01 M, respectivamente, em KCl 1,0 M nos dois primeiros casos e 0,10 M nos dois últimos.

Nas titulações experimentais de soluções de lisozima $5,260 \times 10^{-5} M$, adicionou-se um excesso de ácido forte de modo a iniciar a titulação entre pH 2 - 2,5. Com isso, foi necessário o uso de duas microburetas Metrohm E-457 para a titulação, uma com o módulo de adição com

capacidade de 5,0 ml e a outra com capacidade de 0,5 ml. Usou-se a primeira bureta para iniciar a titulação e conduzi-la até pH próximo a 5, neutralizando-se o excesso de ácido forte e parte dos grupos carboxílicos. Como esta bureta tem uma precisão de 2,0 μl não seria possível detalhar adequadamente a curva de titulação de lisozima na concentração estudada. Com isso, na região de pH entre 5 e 10, os incrementos de titulante foram realizados pela outra bureta com capacidade de 0,5 ml e precisão de 0,2 μl .

Nas titulações de soluções mais diluídas de ovalbumina procurou-se evitar a combinação de duas buretas. Para isso, calculou-se a quantidade de ácido forte necessária para protonar todos os grupos, adicionando-se um excesso de modo que durante a titulação não houve a necessidade de recarregar a bureta de 0,5 ml.

7.3 Resultados e Discussão

As curvas de titulação geradas pelas equações 32 e 33 para os tipos de proteínas com as composições I e II são mostradas nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

Os resultados da aplicação do método de linearização aos dados das curvas de titulação teóricas, adotando-se a composição I, não apresentaram erros entre as concentrações $3,290 \times 10^{-4}$ e $1,721 \times 10^{-5} M$. Os resultados obtidos para a curva de titulação, gerada adotando-se a concentração de proteína $8,603 \times 10^{-6} M$, são mostrados na Tabela 32. Apesar dos pequenos erros observados, o resultado é de pouca confiabilidade, uma vez que a convergência entre os valores de V_{HA} , se mostrou muito dependente das regiões da curva escolhidas para definição das

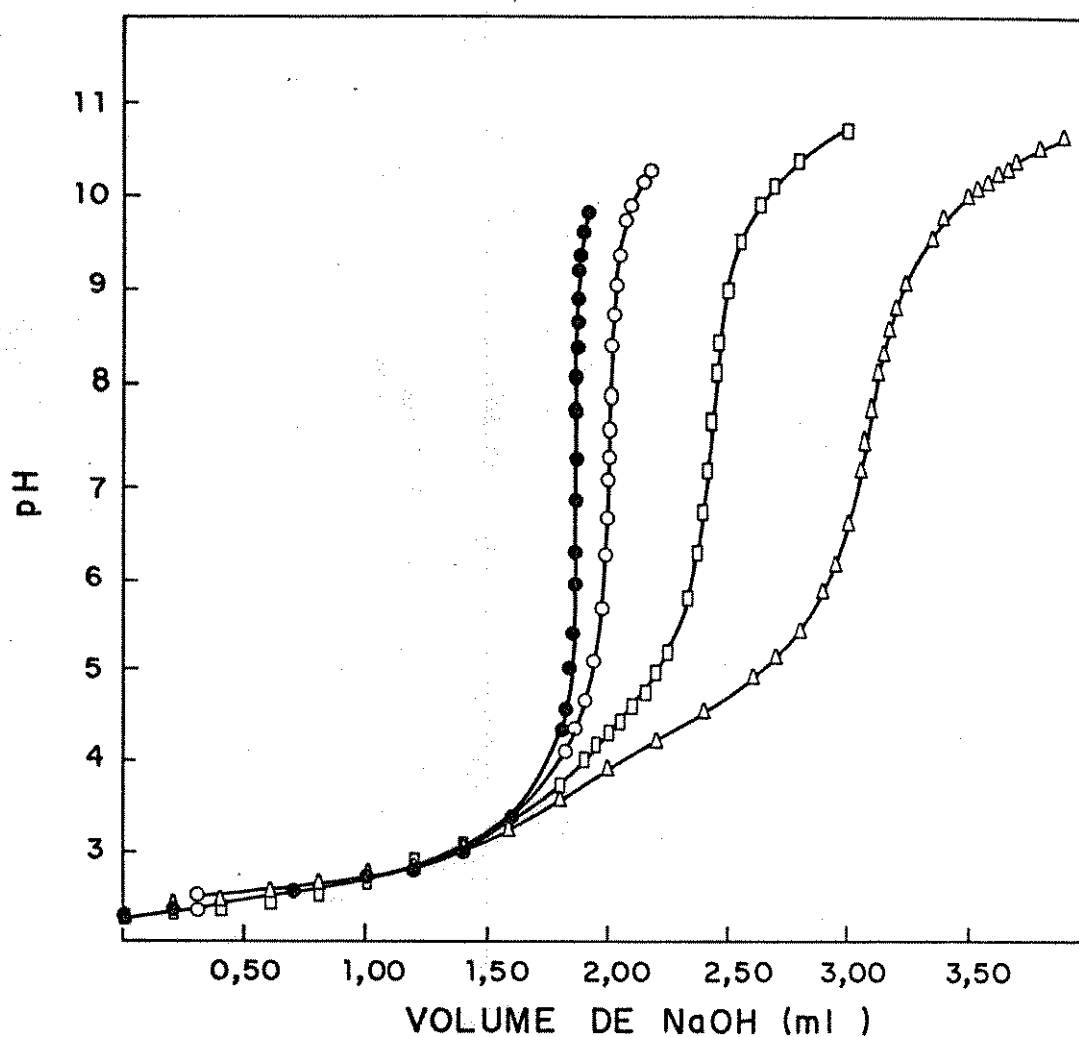


Figura 23: Curvas de titulação teóricas de 4,000 ml de solução de composição I com $NaOH$ 0,1000 M. (●) solução $1,721 \times 10^{-3} M$ ou 0,9982 mg de proteína; (○) solução $5,260 \times 10^{-3} M$ ou 3,051 mg de proteína; (□) solução $1,602 \times 10^{-4} M$ ou 9,292 mg de proteína; (△) solução $3,290 \times 10^{-4} M$ ou 19,08 mg de proteína.

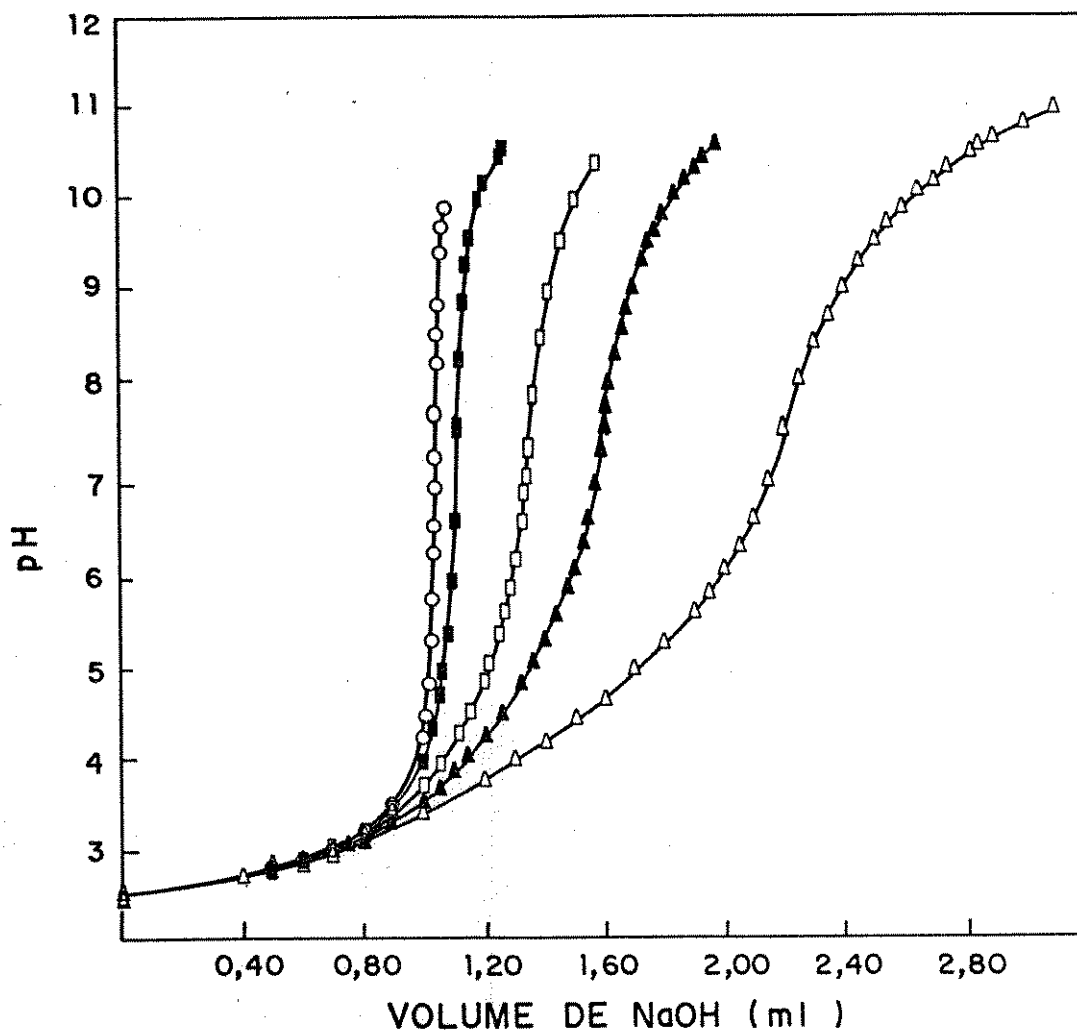


Figura 24: Curvas de titulação teóricas de 4,000 ml de solução de composição II com $NaOH$ 0,1000 M . (○) solução $2,857 \times 10^{-6} M$ ou 0,5143 mg de proteína; (■) solução $7,407 \times 10^{-6} M$ ou 1,333 mg de proteína; (□) solução $2,222 \times 10^{-5} M$ ou 4,000 mg de proteína; (▲) solução $3,704 \times 10^{-5} M$ ou 6,667 mg de proteína; (△) solução $7,407 \times 10^{-5} M$ ou 13,33 mg de proteína

funções de Gran modificadas, F_{HA_n} . Pequenas variações na escolha destas regiões impedem a convergência dos valores de V_{HA_n} , ou os levam a valores absurdos, o que não ocorre quando se consideram as titulações de soluções mais concentradas. Isto implica que, no caso de titulações de uma amostra real com estequiometria e pK_a 's semelhantes aos da composição I, resultados obtidos em concentrações abaixo de $1 \times 10^{-5} M$ podem não corresponder à realidade.

Trabalhando-se com os dados das curvas de titulação teóricas, adotando-se o tipo de proteína com a composição II, não se observou erros significativos até a concentração $2,857 \times 10^{-6} M$, cujos resultados são mostrados na Tabela 32.

Tabela 32: Resultados obtidos das curvas de titulação teóricas para composição I e II, respectivamente nas concentrações $8,603 \times 10^{-6} M$ e $2,857 \times 10^{-6} M$

Série	Composição I				Composição II			
	NG.mol ⁻¹	Erro (%)	pK_a	Erro (%)	NG.mol ⁻¹	Erro (%)	pK_a	Erro (%)
HA ₁	9,0	0,0	4,35	0,0	30,2	+0,60	3,99	-0,25
HA ₂	2,0	0,0	5,65	0,0	17,1	+0,59	5,40	0,0
HA ₃	1,0	0,0	7,35	-0,10	7,0	0,0	6,70	0,0
HA ₄	1,0	0,0	8,71	+0,10	10,0	0,0	8,50	0,0
HA ₅	4,8	+6,7	10,14	+0,40	20,0	0,0	10,10	0,0

Analogamente ao caso anterior, o resultado, apesar de excelente, foi difícil de ser obtido apresentando pouca confiabilidade para o caso de titulação real. Em concentrações menores, como $7,407 \times 10^{-7} M$, não houve convergência entre os valores de V_{HA_n} , não obtendo-se resultado.

Analisando os resultados da Tabela 32, em termos da concentração molar dos ácidos

HA_n presentes na mistura, conforme indicado na Tabela 33, pode-se concluir que, se as concentrações dos componentes estiverem na faixa de $1,0 \times 10^{-5} M$, o método de linearização permite a obtenção de resultados com boa exatidão. Deve-se lembrar que os resultados referem-se a dados de titulações teóricas, em que erros experimentais não estão envolvidos. Deste modo, os erros observados são inerentes ao método de cálculo e, para a faixa de concentração estudada, estão coerentes com os observados por outros autores usando outros métodos de cálculo [1,2,88].

Tabela 33: Concentrações molares dos ácidos presentes nas misturas dados pelas composições I e II referentes aos casos limite da Tabela 32

Ácido	Concentração ($moles.l^{-1} \times 10^5$)	
	Composição I	Composição II
HA_1	7,743	8,571
HA_2	1,721	4,857
HA_3	0,8603	2,000
HA_4	0,8603	2,857
HA_5	3,871	5,714

Um outro fato a considerar é a massa de proteína envolvida em uma titulação. Considerando-se o volume inicial de 4,000 ml, a massa de proteína envolvida nos casos limite para as composições I e II dadas na Tabela 32, são respectivamente 0,4990 e 0,5140 mg por titulação.

As titulações experimentais de lisozima são mostradas na Figura 25 e os resultados, obtidos pela aplicação do método de linearização aos dados de titulações das soluções $3,290 \times 10^{-4}$ e $1,607 \times 10^{-4} M$, são mostrados na Tabela 34, acompanhados da estimativa do desvio

padrão, referindo-se à média de três titulações para cada caso. Estes resultados indicam que não existem diferenças significativas na determinação da estequiometria dos grupos tituláveis nas duas concentrações estudadas. As diferenças são mais significativas quando compara-se o pK_a dos grupos. Como a precisão dos resultados assemelha-se em ambos os casos, a diferença no pK_a pode ser atribuída aos diferentes métodos de calibração de eletrodos empregados, uma vez que nas titulações das soluções $3,290 \times 10^{-4} M$ os eletrodos foram calibrados em termos de atividade [75], enquanto nas titulações de soluções $1,607 \times 10^{-4} M$ foram calibrados em termos de concentração.

Tabela 34: Resultados de titulações experimentais de lisozima $3,290 \times 10^{-4}$ e $1,607 \times 10^{-4} M$ em KCl $0,10 M$

Série	Concentração							
	$3,290 \times 10^{-4} M$				$1,607 \times 10^{-4} M$			
	NG.mol ⁻¹	d.p.(%)	pK_a	d.p.(%)	NG.mol ⁻¹	d.p.(%)	pK_a	d.p.(%)
HA_1	$8,9 \pm 0,4$	4,5	$4,29 \pm 0,01$	0,02	$8,9 \pm 0,3$	3,4	$4,37 \pm 0,03$	0,69
HA_2	$1,89 \pm 0,04$	2,1	$5,74 \pm 0,02$	0,35	$2,2 \pm 0,1$	4,5	$5,45 \pm 0,06$	1,1
HA_3	$0,9 \pm 0,1$	11,1	$7,57 \pm 0,08$	1,1	$0,9 \pm 0,1$	11,1	$7,16 \pm 0,08$	1,1
HA_4	$1,1 \pm 0,1$	9,1	$9,24 \pm 0,06$	0,65	$0,87 \pm 0,06$	6,7	$8,55 \pm 0,09$	1,1
HA_5	$4,6 \pm 0,1$	2,2	$10,34 \pm 0,06$	0,58	$4,3 \pm 0,3$	7,0	$9,94 \pm 0,04$	0,40

Para as titulações de lisozima $5,626 \times 10^{-5}$ e $5,300 \times 10^{-5} M$ foram obtidos os resultados mostrados na Tabela 35, referentes à média de três titulações para cada caso. Pode-se observar que a estequiometria dos grupos tituláveis determinados em soluções $5,626 \times 10^{-5}$ ou $5,300 \times 10^{-5} M$ não difere significativamente dos resultados obtidos em titulações de soluções mais concentradas, apesar do desvio padrão relativo ser maior.

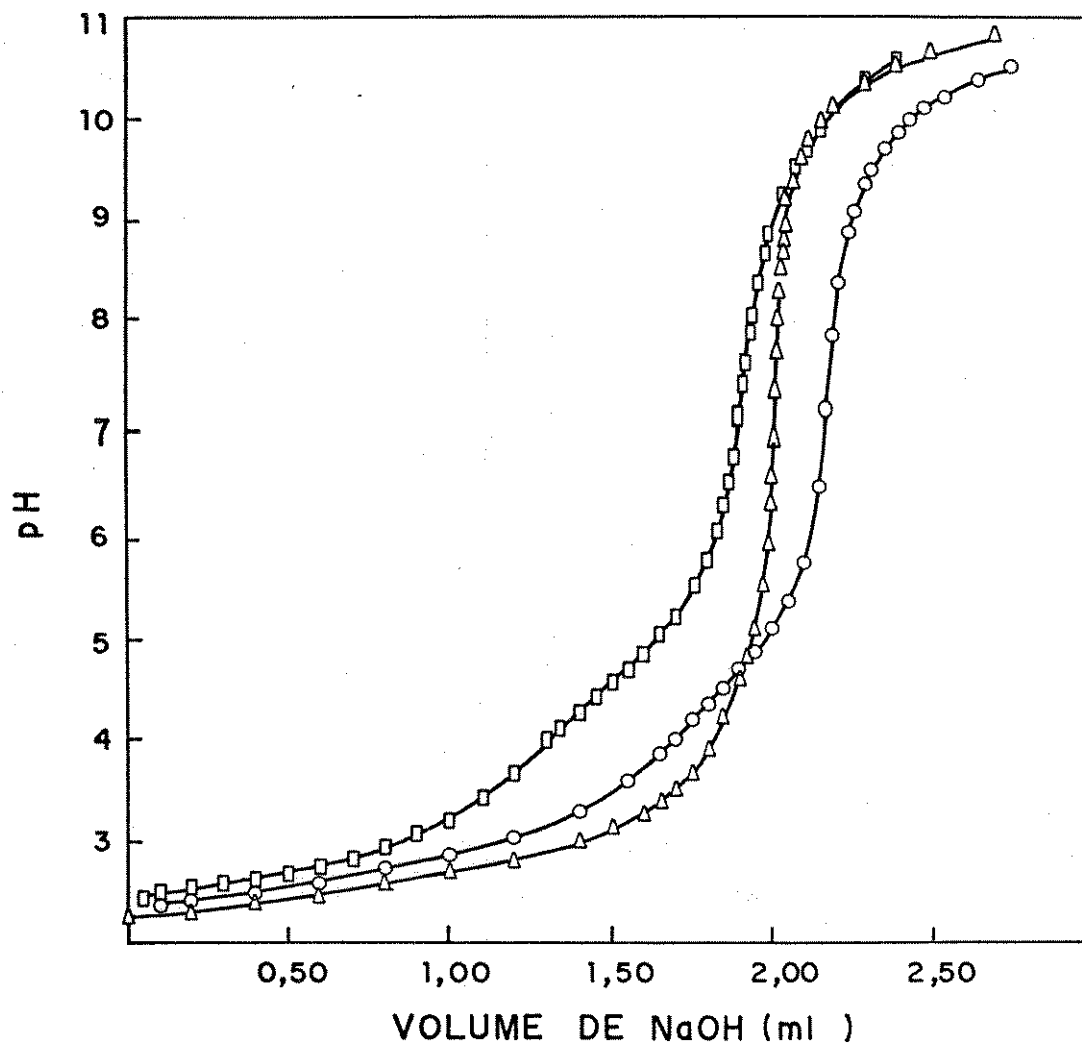


Figura 25: Curvas de titulação de soluções de lisozima em diferentes concentrações . ($\square$) titulação de 30,00 ml de solução de lisozima $3,290 \times 10^{-4} M$ com $NaOH$ 0,1279 M; ($\circ$) titulação de 4,008 ml de solução de lisozima $1,607 \times 10^{-4} M$ com $NaOH$ 0,01212 M; ($\triangle$) titulação de 4,008 ml de solução de lisozima $5,626 \times 10^{-5} M$ com $NaOH$ 0,01275 M

Tabela 35: Resultados de titulações experimentais de lisozima $5,626 \times 10^{-5}$ e $5,300 \times 10^{-5} M$

Série	NG.mol ⁻¹	d.p.(%)	pK _a	d.p.(%)
HA ₁	9,1±0,1	1,10	4,41±0,02	0,45
HA ₂	1,9±0,2	10,5	5,65±0,06	1,10
HA ₃	0,9±0,1	11,1	7,20±0,03	0,42
HA ₄	1,0±0,2	20,0	8,30±0,25	3,01
HA ₅	4,6±0,3	6,52	9,72±0,12	1,23

Em titulações de lisozima, desvios padrões relativos de 10 a 20% são comuns e não impedem a determinação da estequiometria das séries HA₃ ou HA₄. Assim, o valor 1,0±0,2 grupos.mol⁻¹ pertencentes à série HA₄ na Tabela 35, apesar do desvio padrão relativo de 20%, não impede que se conclua sobre a presença de 1 grupo.mol⁻¹ com pK_a 8,30±0,25 na lisozima.

Tratando-se a proteína como uma mistura de ácidos fracos monoproticos, uma solução de lisozima $5,300 \times 10^{-5} M$ comporta-se como uma mistura cujas concentrações dos componentes variam entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4} M$, conforme mostrado na Tabela 36. Esta faixa limite de concentrações, está coerente com o encontrado por Aleixo et. all. para sistemas mais simples com a presença de uma única espécie titulada [72,90]. Concentrações limites da ordem de $10^{-5} M$ também foram determinadas por Meites et. all.[12] usando métodos derivados ou ajustes multiparamétricos em soluções contendo uma ou, no máximo, duas espécies tituláveis.

A massa de lisozima envolvida na titulação da solução $5,300 \times 10^{-5} M$, 3,074 mg, é bem maior que o limite de cerca de 0,5 mg encontrado teoricamente e reflete os erros experimentais envolvidos, principalmente, no que se refere à medida da concentração hidrogeniônica

Tabela 36: Concentrações dos ácidos referentes aos grupos tituláveis de uma solução $5,300 \times 10^{-5} M$ de lisozima

Ácido	Concentração $\times 10^{-5}$ (moles. L^{-1})
HA_1	48,23
HA_2	13,78
HA_3	5,300
HA_4	5,300
HA_5	24,35

destes sistemas, que envolvem equilíbrios múltiplos.

As curvas de titulação experimentais de ovalbumina $8,412 \times 10^{-5}$ e $4,510 \times 10^{-5} M$ em KCl $1,0 M$ e $1,991 \times 10^{-5}$ e $8,193 \times 10^{-6} M$ em KCl $0,10 M$ são mostradas na Figura 26.

Os resultados obtidos das titulações de ovalbumina $8,412 \times 10^{-5}$ e $4,510 \times 10^{-5} M$ são mostrados na Tabela 37 e referem-se à média de seis titulações, sendo três titulações para cada concentração.

Tabela 37: Resultados de titulações experimentais de ovalbumina $8,412 \times 10^{-5}$ e $4,510 \times 10^{-5} M$

Série	NG.mol $^{-1}$	d.p.(%)	pK_a	d.p.(%)
HA_1	$27,5 \pm 0,1$	0,36	$3,73 \pm 0,02$	0,54
HA_2	$18,6 \pm 0,1$	0,56	$4,79 \pm 0,01$	0,21
HA_3	$4,9 \pm 0,1$	2,04	$6,71 \pm 0,02$	0,30
HA_4	$9,0 \pm 0,2$	2,22	$9,26 \pm 0,02$	0,22
HA_5	$17,0 \pm 0,1$	0,59	$10,43 \pm 0,01$	0,096

Os resultados das titulações de ovalbumina $1,991 \times 10^{-5} M$ e $8,193 \times 10^{-6} M$ são

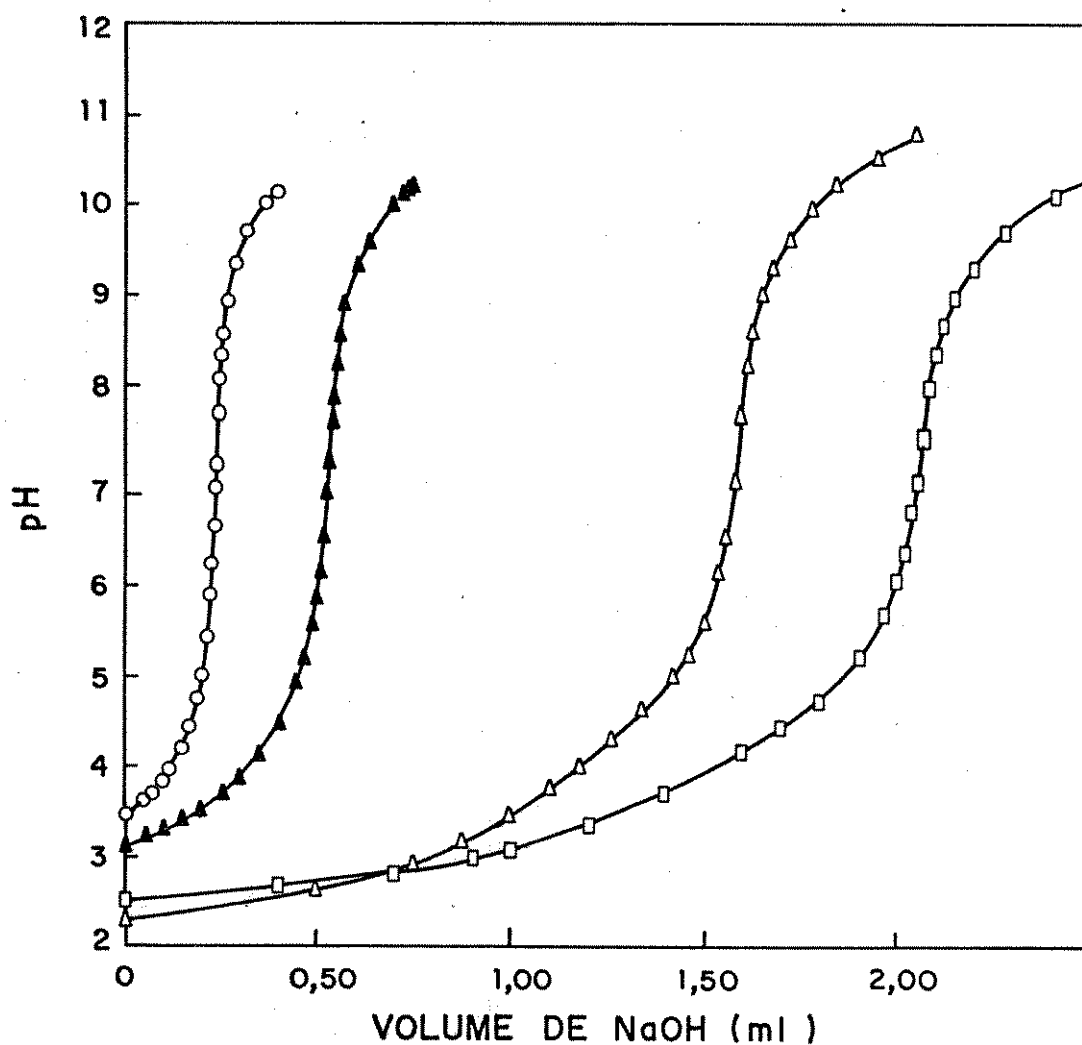


Figura 26: Curvas de titulação experimentais de ovalbumina em diferentes concentrações. (Δ) titulação de 22,00 ml de solução de ovalbumina $8,181 \times 10^{-5} M$ com $NaOH$ 0,1267 M; ($\square$) titulação de 21,10 ml de solução de ovalbumina $4,510 \times 10^{-5} M$ com $NaOH$ 0,05340 M; ($\blacktriangle$) titulação de 4,000 ml de solução de ovalbumina $1,991 \times 10^{-5} M$ com $NaOH$ 0,01217 M; ($\circ$) titulação de 4,203 ml de solução de ovalbumina $8,193 \times 10^{-6} M$ com $NaOH$ 0,01093 M

mostrados na Tabela 38 e referem-se à média de três titulações para cada caso.

Tabela 38: Resultados de titulações experimentais de ovalbumina $1,991 \times 10^{-5}$ e $8,193 \times 10^{-6} M$

Série	Concentração							
	$1,991 \times 10^{-5} M$				$8,193 \times 10^{-6} M$			
	NG.mol ⁻¹	d.p.(%)	pKa	d.p.(%)	NG.mol ⁻¹	d.p.(%)	pKa	d.p.(%)
HA ₁	22,9±0,7	3,1	4,05±0,02	0,49	23,2±0,7	3,0	4,34±0,04	0,92
HA ₂	7,8±0,5	6,4	5,20±0,07	1,4	5,7±0,2	3,5	5,68±0,16	2,8
HA ₃	3,8±0,3	7,9	6,80±0,05	0,74	3,7±0,4	8,5	6,95±0,20	2,9
HA ₄	5,2±1,3	25,0	8,76±0,13	1,5	4,8±2,2	46,8	8,53±0,35	4,1
HA ₅	10,8±0,7	7,0	9,67±0,12	1,2	13,8±1,2	8,7	9,57±0,18	1,9

Pelos dados das Tabelas 37 e 38 pode-se observar que os resultados obtidos das soluções $4,510 \times 10^{-5}$ são indistinguíveis em exatidão e precisão com relação aos obtidos das soluções $8,142 \times 10^{-5} M$ de ovalbumina. Porém, nas titulações de soluções $1,991 \times 10^{-5} M$, cerca de 15 grupos carboxílicos (soma das séries HA₁ e HA₂) e 6 grupos aminos (série HA₅) não foram determinados. Além disso, um aumento na estimativa do desvio padrão muito acentuado na estequiometria da série HA₄ foi observado nos resultados (Tabela 38). Com isso, conclui-se que soluções $1,991 \times 10^{-5} M$ e $8,193 \times 10^{-6} M$ de ovalbumina em KCl 0,10 M não são apropriadas para aplicação da metodologia estudada.

Admitindo-se correta a composição dada na Tabela 37, a concentração dos ácidos fracos (HA₁ a HA₅) da mistura em função da quantidade de proteína é mostrada na Tabela 39, indicando que as concentrações dos ácidos mais diluídos (HA₃) variam de $4,014 \times 10^{-5}$ a $2,210 \times 10^{-4} M$. Na solução mais diluída de ovalbumina ($8,193 \times 10^{-6} M$), a concentração de HA₃

é bastante próxima à encontrada para as séries HA_3 e HA_4 na titulação da lisozima $5,300 \times 10^{-4} M$, em que foram obtidos resultados com boa exatidão e precisão. Com isso, esperar-se-ia obter bons resultados também nas titulações de ovalbumina $8,193 \times 10^{-6} M$.

Uma explicação para isto pode residir no fato que as titulações de ovalbumina $8,142 \times 10^{-5}$ e $4,510 \times 10^{-5} M$ foram realizadas a partir de pH 2 e em KCl $1,0 M$, enquanto as soluções $1,991 \times 10^{-5}$ e $8,193 \times 10^{-6} M$ foram tituladas em KCl $0,10 M$ e a partir de pH 3,5. Nestas concentrações de proteína a quantidade de ácido forte adicionado foi suficiente para protonar todos os grupos da proteína e garantir um excesso. Por outro lado, os dados da titulação iniciada neste pH podem não ser adequadas para uma definição clara das funções de Gran modificadas, dificultando a separação entre a região da curva característica ao ácido forte e a região da curva em que são titulados os grupos carboxílicos com pKa 's mais baixos, conforme já foi visto anteriormente neste trabalho e em estudos recentes sobre o método de Gran [12,13].

Tabela 39: Concentração dos ácidos referentes aos grupos tituláveis da ovalbumina com relação à estequiometria da Tabela 36

	Concentrações dos Ácidos $\times 10^4$ (moles. L^{-1})		
	Concentração de Ovalbumina		
Ácido	$4,510 \times 10^{-5} M$	$1,991 \times 10^{-5} M$	$8,193 \times 10^{-6} M$
HA_1	12,40	5,475	2,253
HA_2	8,389	3,703	1,524
HA_3	2,210	0,9756	0,4014
HA_4	4,059	1,792	0,7374
HA_5	7,667	3,385	1,393

Deste modo acredita-se que as titulações de ovalbumina $1,551 \times 10^{-5}$ e $8,193 \times$

$10^{-6}M$ podem permitir a obtenção de melhores resultados se forem realizadas a partir de pH entre 2 e 2,5, ou em KCl 1,0 M , condições que permitem caracterizar melhor as funções de Gran modificadas para o ácido forte e que diminuem as interações eletrostáticas. Por outro lado, iniciando-se a titulação em pH 2, torna-se necessário, assim como na titulação da solução de lisozima $5,300 \times 10^{-5}M$, o uso de duas buretas, o que procurou-se evitar no trabalho com a ovalbumina.

Impondo esta condição experimental, pode-se concluir que a massa de ovalbumina que se presta à aplicação da metodologia de titulações potenciométricas é próxima àquela empregada nas titulações de 4,000 ml das soluções $4,510 \times 10^{-5}M$, ou seja, 8,118 mg .

8 Conclusões

1. Neste estudo, pôde-se verificar a adequabilidade analítica de se tratar os grupos tituláveis presentes em uma molécula de proteína como uma mistura de ácidos fracos monopróticos. A divisão dos grupos de mesma natureza química em séries é uma consequência deste tratamento e seus pK_a 's refletem as diversas interações (eletrostáticas ou não) a que tais grupos estão sujeitos em seu ambiente na macromolécula.

2. A determinação quantitativa da estequiometria dos grupos não é comprometida, uma vez que a soma dos grupos referentes às diversas séries se mostrou independente da força iônica e bastante coerente com a composição de aminoácidos das proteínas estudadas, bem como com resultados obtidos por outros autores que empregaram o modelo clássico de Linderstrom-Lang.

3. Um maior número de séries para os grupos de mesma natureza química foram caracterizados nas titulações realizadas em soluções de baixa força iônica, em consequência das interações eletrostáticas mais intensas. Nestes casos os melhores resultados foram obtidos de titulações bastante detalhadas (grande número de medidas) em toda faixa de pH estudada, que permitem a caracterização adequada das funções lineares para as diversas espécies tituladas.

4. Estas conclusões são reforçadas pelos resultados obtidos das titulações em $GuHCl$ 6,0 M , meio altamente iônico, em que as interações eletrostáticas são minimizadas. Neste meio não se observou a divisão dos grupos de mesma natureza química em séries. Além disso, com

a desnaturação da proteína pode-se relacionar diretamente os resultados obtidos com os dados da composição de aminoácidos, indicado a adequabilidade analítica do método de cálculo e do sistema empregado para calibração dos eletrodos em *GuHCl* 6,0 M.

5. A estequiometria e os pK_a 's dos grupos tituláveis determinados por titulação da proteína nativa permitem calcular o ponto isoelétrico quando o número de resíduos de arginina/mol de proteína é conhecido. Além disso, os ajustes entre o pI calculado e o pI obtido por métodos eletroforéticos têm auxiliado grandemente na atribuição da natureza química dos grupos, principalmente aqueles titulados na região alcalina de pH .

6. Estudos com curvas de titulação teóricas indicaram que cerca de 0,12 mg/ml de proteína podem ser titulados com obtenção de resultados com boa exatidão. Porém os estudos experimentais com a lisozima e ovalbumina indicaram que a quantidade mínima de proteína depende, além do equipamento disponível para titulação, da própria natureza química da proteína e do meio iônico usado. Por outro lado, pode-se concluir que se os ácidos ou séries de grupos estiverem em uma concentração na ordem de $10^{-4}M$ pode-se esperar a obtenção de resultados com boa exatidão e precisão.

Referências

- [1] L. MEITES, N. FANELLI and P. PAPOFF, *Anal. Chim. Acta* **192**, 33 (1987).
- [2] M. BETTI, P. PAPOFF and L. MEITES, *Anal. Chim. Acta* **182**, 133 (1986).
- [3] G. ARENA, E. RIZZARELLI, S. SAMMARTANO and C. RIGANO, *Talanta* **26**, 1 (1979).
- [4] M. BOSS, *Anal. Chim. Acta* **90**, 61 (1977).
- [5] A. IVASKA, *Talanta* **21**, 1167 (1974).
- [6] L.M. ALEIXO e O.E.S. GODINHO, *Quimica Nova* **7**(1), 32 (1984).
- [7] L.M. ALEIXO e O.E.S. GODINHO, *Quimica Nova* **10**(2), 84 (1987).
- [8] A. IVASKA and I. NAGYPAL, *Talanta* **27**, 721 (1980).
- [9] G. GRAN, *Anal. Chim. Acta* **206**, 111 (1988).
- [10] G. GRAN, *Acta Chem. Scand.* **4**, 559 (1950).
- [11] G. GRAN, *Analyst* **77**, 661 (1952).
- [12] C. MACCÀ and G. GIORGIO BOMBI, *Analyst* **114**, 463 (1989).
- [13] C. MACCÀ, *Analyst* **114**, 689 (1989).
- [14] F.J.C. ROSSOTTI and H. ROSSOTTI, *J. Chem. Ed.* **42**(7), 375 (1965).
- [15] W. STUMM, L. SIGG and J.L. SCHNOOR, *Environ. Sci. Technol.* **21**(1), 8 (1987).
- [16] C.A. JOHNSON and L. SIGG, *Chimia* **39**, 59 (1985).
- [17] B.H.J. HOFSTEE, *Science* **131**, 39 (1960).
- [18] F. INGMAN and E. STILL, *Talanta* **13**, 1431 (1966).
- [19] A. IVASKA and E. WANNINEM, *Anal. Lett.* **6**(11), 961 (1973).
- [20] A. IVASKA, *Talanta* **21**, 1167 (1974).
- [21] A. IVASKA, *Talanta* **21**, 1175 (1974).
- [22] N.E. SOUZA, O.E.S. GODINHO and L.M. ALEIXO, *Analyst* **110**, 989 (1985).
- [23] O.E.S. GODINHO, N.E. SOUZA and L.M. ALEIXO, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**(5), 1028 (1988).

- [24] N.E. SOUZA, *Determinação Simultânea de Ácidos em Misturas por Titulações Potenciométricas e suas Aplicações a Análises de Antiácidos, Sucos de Uva e Vinhos*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1985).
- [25] M.D. SEYMOUR, J.W. CLAYTON and Q. FERNANDO, *Anal. Chem.* **49**, 1429 (1977).
- [26] O.E.S. GODINHO and L.M. ALEIXO, *Anal. Biochem.* **112**, 323 (1981).
- [27] V. NURCHI and G. CRISPONI, *Anal. Chim. Acta* **222**, 359 (1989).
- [28] J.J.B. BAEZA, G.R. RAMOS and C.M. FERNANDEZ, *Anal. Chim. Acta* **223**, 419 (1989).
- [29] G. CRISPONI, V. NURCHI, T. PINTORI and E.F. TROGU, *Anal. Chim. Acta* **184**, 77 (1986).
- [30] J. STEINHARDT and S. BEYCHOK, "The Proteins" (H. Neurath and R.L. Hill eds.) Vol. 2, p.p. 139-303, Academic Press, New York (1964).
- [31] C. TANFORD, *Adv. Prot. Chem.* **17**, 69 (1962).
- [32] O.E.S. GODINHO, L.M. ALEIXO and J.P. HORA ALVES, *Anal. Biochem.* **123**, 244 (1982).
- [33] O.E.S. GODINHO, L.M. ALEIXO and J.P. HORA ALVES, *An. Acad. Bras. Cienc.* **57**(3), 305 (1985).
- [34] W.J. MOORE, "Físico-Química", Vol. 1, p.p. 254-294, Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo (1976).
- [35] M.L. McCLASHAN, "Chemical Thermodynamics", p.p. 159-167, Academic Press Inc., London (1979).
- [36] J.A. MARINSKY, S. GUPTA and P. SCHINDER, *J. Coll. and Interf. Sci.* **89**(2), 412 (1982).
- [37] Y. MEILE and J.A. MARINSKY, *Talanta* **31**(3), 199 (1984).
- [38] S. ALEGRET, M.T. ESCALAS and J.A. MARINSKY, *Talanta* **31**(9), 683 (1984).
- [39] J.A. MARINSKY, *J. Phys. Chem.* **89**, 5294 (1985).
- [40] K. LINDERSTROM-LANG, *Comput. Rend. Lab. Carlsberg* **15**(7), 1 (1924).
- [41] R.K. CANNAN, A.C. KIBRICK and A.H. PALMER, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **41**, 243 (1941).
- [42] R.K. CANNAN, A.H. PALMER and A.C. KIBRICK, *J. Biol. Chem.* **142**, 803 (1941).
- [43] C. TANFORD and J.G. KIRKWOOD, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5333 (1957).

- [44] C. TANFORD and R. ROXBY, *Biochemistry* **11**(11), 2192 (1972).
- [45] S.J. SHIRE, G.I.H. HANANIA and F.R.N. GURD, *Biochemistry* **13**(14), 2967 (1974).
- [46] S.J. SHIRE, G.I.H. HANANIA and F.R.N. GURD, *Biochemistry* **13**(14), 2574 (1974).
- [47] R.W. SHAW and C.R. HARTZELL, *Biochemistry* **15**(9), 1909 (1976).
- [48] J.L. CRAMMER and A. NEUBERGER, *Biochem. J.* **37**, 302 (1943).
- [49] M. LEVY, *Compt Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **30**, 291 (1958).
- [50] M.A. MARINI, C. MARTIN, R.L. BERGER and L. FORLANI, *Biopolymers* **13**, 891 (1974).
- [51] M.A. MARINI and C. MARTIN, *Anal. Lett.* **13**(B2), 93 (1980).
- [52] N.C. KAARSHOLM and P. SCHACK, *Acta Chem. Scand.* **B38**(3), 225 (1984).
- [53] M.A. MARINI, C. MARTIN and L. OFRLANI, *Biopolymers* **20**, 2243 (1981).
- [54] L.M. ALEIXO, *Estudos Potenciométricos de Equilíbrios Ácido-Base e de Formação de Complexos em Solução Aquosa*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1980).
- [55] N.M.S. VASCONCELOS, *Caracterização e Determinação de Grupos Tituláveis de Proteínas e Aminoácidos em Solução Concentrada de Uréia através da Linearização de Curvas de Titulação Potenciométrica*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (1984).
- [56] M.C. SILVA, *Otimização das Condições de Titulações Potenciométricas de Proteínas em Soluções Concentradas de Uréia. Titulação Potenciométrica da Proteína de Bence Jones*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1986).
- [57] P. MASSON, *Analisis* **17**(1-2), 9 (1989).
- [58] C. TANFORD, *Adv. Prot. Chem.* **23**, 121 (1968).
- [59] C. TANFORD, *Adv. Prot. Chem.* **24**, 1 (1970).
- [60] C. TANFORD, K. KAWAHARA and S. LAPANJE, *J. Am. Chem. Soc.* **89**(4), 729 (1967).
- [61] Y. NOZAKI and C. TANFORD, *J. Am. Chem. Soc.* **89**(4), 736 (1967).
- [62] Y. NOZAKI and C. TANFORD, *J. Am. Chem. Soc.* **89**(4), 742 (1967).
- [63] R. ROXBY and C. TANFORD, *Biochemistry* **10**(18), 3348 (1971).

- [64] C.Y. CHA and H.A. SCHERAGA, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 54 (1960).
- [65] N. BACCAN, J.C. de ANDRADE, O.E.S. GODINIHO e J.S. BARONE, "Química Analítica Quantitativa Elementar", p.p. 177-185, Ed. Edgard Blücher, São Paulo (1979).
- [66] I.M. KOLTHOFF and E.B. SANDELL, "Textbook of Quantitative Inorganic Analysis", p. 562, McMillan, New York (1967).
- [67] L. PEHRSSON, F. INGMAN and A. JOHANSSON, *Talanta* **23**, 769 (1976).
- [68] J.N. BUTLER, "Ionic Equilibrium - A Mathematical Approach"; p.p. 61-85, Addison-Wesley Publishing Company Inc., Massachussets (1966).
- [69] A.J. BARD, "Equilíbrio Químico", p.p. 179-188, Ediciones del Castillo, S.A., Madrid (1970).
- [70] S.V. PÉREZ, "Química de las Disoluciones: Diagramas y Cálculos Gráficos", p. 58-74, Ed. Alhambra, Madrid (1979).
- [71] B. SCOOG and A. WICHMAN, *Trends. Anal. Chem.* **5**(4), 82 (1986).
- [72] W.F. da COSTA, *Estudos sobre Linearização de Curvas de Titulações Potenciométricas*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (1989).
- [73] R.E. CANFIELD, *J. Biol. Chem.* **238**, 2698 (1963).
- [74] A.D. NISBET, R.H. SAUNDRY, A.J.G. MOIR, L.A. FOTHERGILL and J.E. FOTHERGILL, *Eur. J. Biochem.* **115**, 333 (1981).
- [75] J.P. HORA ALVES, *Linearização da Curva de Titulação Potenciométrica de Proteínas. Aplicação a Lisozima, β -Lactoglobulina e Imunoglobulina Humana*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1982).
- [76] K.A. PIEZ, E.W. DAVIE, J.E. FOLK and J.A. GLADNER, *J. Biol. Chem.* **236**, 2912 (1961).
- [77] Y. NOZAKI, L.G. BUNVILLE and C. TANFORD, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5523 (1959).
- [78] T. IMOTO, L.N. JOHNSON, A.C.T. NURTH, D.C. PHILIPS and J.A. RUPLY, "The Enzymes", vol. 7, p. 665, Boyer P.D. Ed. 3rd, Academic Press, New York (1972).
- [79] J.W. DONOVAN, H. LASKOWSKI, R.E. CANFIED and H.A. SCHERAGA, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2154 (1960).
- [80] C. TANFORD and M.L. WAGNER, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3331 (1954).

- [81] R. SAKAKIBARA and K. HAMAGUCHI, *J. Biochem.* **64**, 613 (1968).
- [82] T.A. GERKEN, J.E. JENTOFT, N. JENTOFT and D.G. DEARBORN, *J. Biol. Chem.* **257**, 2894 (1982).
- [83] W.F. HARRINGTON, *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 450 (1955).
- [84] R.E. CANFIELD and A.K. LIU, *J. Biol. Chem.* **240**, 1997 (1965).
- [85] G. TABORSKY, *Adv. Prot. Chem.* **28**, 34 (1974).
- [86] A.L. LENINGER, "Bioquímica", Vol. 1, p.p. 49-65, Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo (1976).
- [87] D. MALAMUD and J.W. DRYSDALE, *Anal. Biochem.* **86**, 620 (1978).
- [88] L. MEITES, *Anal. Lett.* **15**(A5), 507 (1982).
- [89] G.R. RAMOS and M.C.B. ALVAREZ-COQUE, *Anal. Chim. Acta* **220**, 145 (1989).
- [90] L.M. ALEIXO, O.E.S. GODINHO and W.F. da COSTA, *Microchem. J.* **35**, 153 (1987).
- [91] E. BRESLOW and F.R.N. GURD, *J. Biol. Chem.* **237**, 371 (1962).
- [92] V.C. YANG and R. LANGER, *Anal. Biochem.* **147**, 148 (1985).
- [93] A. SILLERO and J.M. RIBEIRO, *Anal. Biochem.* **179**; 319 (1989).
- [94] H. SVENSSON, *Acta Chem. Scand.* **15**, 325 (1961).
- [95] H. SVENSSON, *Acta Chem. Scand.* **16**, 456 (1962).
- [96] L.A. SLUYTERMAN and J. WIJDENES, *J. Chromatogr.* **150**, 31 (1978).
- [97] P.G. RIGHETTI and T. CARAVAGGIO, *J. Chromatogr.* **127**, 1 (1976).
- [98] P.G. RIGHETTI and G. TUDOR, *J. Chromatogr.* **220**, 116 (1981).

Apêndice 1: Listagem do Programa "TEÓRICO"

```

10 PRINT "OBTENCAO DE UMA CURVA DE TITULACAO TEORICA"
   INPUT "NUMERO DE ACIDOS FRACOS E DE PONTOS - J,I";N1,N2
20 DIM V1(N2),H(N2),H1(N2),F(N2),F1(N2),A(N1,N2),A1(N1,N2),V(N2),P(N2)
   DIM K(N1),VA(N1),F2(N2),F3(N2),F4(N2),F5(N2),Y(N1,N2),Y1(N1,N2)
30 FOR J=1 TO N1
   READ VA(J),K(J)
40 NEXT J
   INPUT "VOLUME INICIAL - VO";VO
   INPUT "VOL. DE EQUIV. P/ AC. FORTE - VH";VH
   INPUT "CONCENTRACAO DE TITULANTE - B"; B
   INPUT "KW";KW
50 FOR I = 0 TO N2
   READ V(I)
   V1(I)=VO+V(I)
   E=0
   H(0) = 0.001
60 IF I=0 GOTO 80
   H(I)=H(I-1)*0.2
70 GOTO 80
75 H(I)=H1(I)
80 FOR J =1 TO N1
   A(J,I)=K(J)/(K(J)+H(I))
   A1(J,I)= K(J)/((K(J)+H(I))^2)
83 NEXT J
   F(I) = (VH-V(I))*B-(H(I)-KW/H(I))*V1(I)+(VA(1)-VH)*B*A(1,I)
   F1(I) = -((1+KW/(H(I))^2)*V1(I))-(VA(1)-VH)*B*A1(1,I)
   F2(I) =0
   F3(I) =0
85 FOR J=2 TO N1
   Y(J,I)= (VA(J)-VA(J-1))*B*A(J,I)
   Y1(J,I)= (VA(J)-VA(J-1))*B*A1(J,I)
   F2(I)= F2(I)+Y(J,I)
   F3(I)= F3(I)+Y1(J,I)
86 NEXT J
   F4(I)= F(I)+F2(I)
   F5(I)= F1(I)-F3(I)
   H1(I)= H(I)-F4(I)/F5(I)
   E=E+1
   IF ABS (1-H1(I)/H(I))>0.00001 GOTO 75
   P(I)= -LOG(H1(I))/LOG(10)
   NEXT I
   PRINT "PONTO      VOLUME      pH"
   A$="###      ##.###      ##.###"
90 FOR I =1 TO N2
   PRINT USING A$;I,V(I),P(I)
   E=0
100 NEXT I

```

tulação

Apêndice 2: Listagem do Programa de Linearização de Curvas de Ti-

```

10 INPUT "NUMERO MAXIMO DE GRUPOS E PONTOS - N1,N2": N1,N2
INPUT "TITULACAO - DIA/MES/ANO": D$
20 DIM A(N1,N2),Y(N1,N2),F2(N1,N2),F4(N1,N2),F9(N1,N2)
DIM V(N2),H1(N2),H2(N2),F3(N2),F4(N2),F1(N2),VE(N1),H(N2),F8(N2)
DIM P1(N1),P2(N2),F5(N2),K1(N2),KH(N1),R(N1),S(N1)
30 READ VO,CB,KW
PRINT VO,CB,KW
FOR I = 1 TO N1
  READ KH(I)
  PRINT KH(I);
NEXT I
40 FOR J = 1 TO N2
  READ V(J),H(J)
  PRINT J,V(J),H(J)
NEXT J
70 FOR J = 1 TO N2
  H1(J) = (10^(-H(J)))
  H2(J) = (KW/(10^(-H(J))))
NEXT J
80 INPUT "VALORES DE N1 E N2 PARA HCL": P1(0),P2(0)
90 FOR J = P1(0) TO P1(0)+P2(0)
  F1(J) = 0
  F4(J) = ((H1(J)-H2(J))*(VO+V(J))+V(J)*CB)/CB
  F3(J) = F4(J)
  KY=F4(J)+KY
NEXT J
J1 = P1(0)
J2 = P2(0)
100 GOSUB 320
110 KH(0) = -X1/Y1
K1 = Y + KH(0)*X
VE(0)=KY/(P1(0)+P2(0))
GOTO 120
VE(0) = K1/(KH(0))
120 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL": VE(0)
130 FOR K = 1 TO N1
  PRINT "VALORES DE N1 E N2 PARA HA": K
  INPUT P1(K),P2(K)
  FOR J = P1(K) TO P1(K)+P2(K)
    F2(K,J) = (H1(J)-H2(J))*(VO+V(J))*(KH(K)+H1(J))/CB
    F2(K,J) = (V(J)-VE(0))*H1(J)+(VE(K-1)-VE(0))*KH(K)+F2(K,J)
    A(K,J)=KH(K)/(KH(K)+H1(J))
    F5(J)=0
    IF K = 1 THEN 135 ELSE 134
  134 FOR I = 1 TO K-1
    A(I,J)=KH(I)/(KH(I)+H1(J))
    F6(I,J)=0
    F6(I,J)=(VE(I)-VE(I-1))*A(I,J)*(KH(K)+H1(J))
    F5(J)=F6(I,J) + F5(J)
  NEXT I
  135 F9(K,J) = F2(K,J)-F5(J)
  F8(J) = F9(K,J)
  NEXT J
  J1 = P1(K)
  J2 = P2(K)
140 GOSUB 330
KH(K) = -X1/Y1
VE(K) = (Y+KH(K)*X)/KH(K)
150 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA": K; "="; VE(K)
PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIAAO PARA HA": K; "="; KH(K)
NEXT K
170 PRINT "ENTRE COM VALORES DE N1,...;NN"
180 FOR I = 0 TO N1
  PRINT "PARA HA": I;
  INPUT P1(I),P2(I)
  PRINT P1(I),P2(I)
  NEXT I
  E = 0
190 FOR I = 0 TO N1
  S(I) = VE(I)
NEXT I
200 FOR J = P1(0) TO P1(0)+P2(0)
  F8(J) = 0
  F1(J) = 0
  F4(J) = (H1(J)-H2(J))*(VO+V(J))
  FOR I = 1 TO N1
    A(I,J) = KH(I)/(KH(I)+H1(J))
    Y(I,J) = (VE(I)-VE(I-1))*CB*A(I,J)
    F1(J) = F1(J) + Y(I,J)
  
```

```

NEXT I
F8(J) = F4(J)-F1(J)
NEXT J
J1 = P1(0)
J2 = P2(0)
210 GOSUB 330
KH(0) = -X1/Y1
K1(0) = Y+KH(0)*X
VE(0) = K1(0)/(KH(0))
R(0) = R
220 FOR I = 1 TO N1
  FOR J = 1 TO N2
    F2(I,J) = (H1(J)-H2(J))*(V0+V(J))*(KH(I)+H1(J))/CB+(V(J)-VE(0))*H1(J)
230 IF I = 1 THEN 240 ELSE 235
235 F2(I,J) = (VE(I-1)-VE(0))*KH(I)+F2(I,J)
240 NEXT J
NEXT I
250 FOR K = 1 TO N1
  FOR J = P1(K) TO P1(K)+F2(K)
    F3(J) = 0
    FOR I = 1 TO N1
      A(I,J) = KH(I)/(KH(I)+H1(J))
      IF I = K THEN 260 ELSE 255
255 F6(I,J) = (VE(I)-VE(I-1))*A(I,J)*(KH(K)+H1(J))
      F3(J) = F6(I,J)+F3(J)
260 NEXT I
      F9(K,J) = F2(K,J) - F3(J)
      F8(J) = F9(K,J)
    NEXT J
    J1 = P1(K)
    J2 = P2(K)
270 GOSUB 330
KH(K) = -X1/Y1
K1(K) = Y+KH(K)*X
VE(K) = K1(K)/KH(K)
R(K) = R
NEXT K
280 PRINT "*****"
290 FOR I = 0 TO N1
  PRINT "PARA HA"; I,VE(I),ABS(S(I)-VE(I))/VE(I),KH(I),E
  NEXT I
  E = E + 1
  FOR I = 1 TO N1
    IF ABS(S(I)-VE(I))/VE(I) > 0.00001 GOTO 190
  NEXT I
300 A$ = "HH,HHHH      HH,HHH      HH,HHHH^AAA      HH,HHHH^AAA      HH,HHHH^AAA"
  PRINT TAB(20); D$
  PRINT TAB(20); "PARA HCL"
  PRINT "VOLUME      pH      FG.MODIF      FG.AJUST      DESVIO"
  FOR J = P1(0) TO P1(0)+F2(0)
    Y5 = -V(J)*KH(0)+K1(0)
    Y6 = (F8(J)-Y5)*100/Y5
    PRINT USING A$; V(J),H(J),F8(J),Y5,Y6
  NEXT J
  B$ = "HH,HHHH      HH,HHHH^AAA      HH,HHHHHH      HH,HHHH^AAA "
  PRINT "      VHCL      CHCL      R      INCL.FHCL "
  CL = (CB*VE(0))/V0
  PRINT USING B$; VE(0),CL,R(0),KH(0)
  C$ = "HH,HHHHHH      HH,HHHH^AAA      HH,HHHH      HH,HHHH^AAA      HH,HHHHHHHH "
310 FOR K = 1 TO N1
  PRINT TAB(20); "PARA HA"; K
  PRINT "N1="; P1(K); "N2="; P2(K)
  PRINT "VOLUME      pH      FG.MODIF      FG.AJUST      DESVIO "
  FOR J = P1(K) TO P1(K)+F2(K)
    Y5 = -V(J)*KH(K)+K1(K)
    Y6 = (F9(K,J)-Y5)*100/Y5
    PRINT USING A$; V(J),H(J),F9(K,J),Y5,Y6
  NEXT J
  PKA = -LOG(KH(K))/LOG(10)
  CH = ((VE(K)-VE(K-1))*CB)/V0
  PRINT "      VHA      CHA      PKA      KHA      R "
  PRINT USING C$; VE(K)-VE(K-1),CH,PKA,KH(K),R(K)
  NEXT K
  PRINT "NUMERO DE INTERACOES="; E
  INPUT "DESEJA REVER OS RESULTADOS"; I$
  IF I$ = "S" GOTO 300
END
320 X=0
Y=0
FOR J = J1 TO J1+J2
  Y = Y+F3(J)
  X = X+V(J)
NEXT J
X = X/(J2+1)
Y = Y/(J2+1)
X1 = 0
Y1 = 0
FOR J = J1 TO J1+J2
  X1 = X1 + (V(J)-X)*F3(J)

```

```

        Y1 = Y1 + (V(J)-X)^2
    NEXT J
    RETURN
330 Y=0
    X=0
    FOR J = J1 TO J1+J2
        Y = Y + F8(J)
        X = X + V(J)
    NEXT J
    X = X/(J2+1)
    Y = Y/(J2+1)
    X1 = 0
    Y1 = 0
    X2 = 0
    Y2 = 0
    Y3 = 0
    FOR J = J1 TO J1+J2
        X1 = X1 + (V(J)-X)*(F8(J)-Y)
        Y1 = Y1 + (V(J)-X)^2
        Y2 = Y2 + (F8(J)-Y)^2
        Y3 = Y3 + (V(J)-X)*(F8(J)-Y)
    NEXT J
    X4 = Y1*Y2
    R = Y3/SQR(X4)
    RETURN

```

Apêndice 3: Listagem do Programa "PROGARCA"

```

10 PRINT "CALCULO DA CARGA LIQUIDA DE UMA MOLECULA DE PROTEINA"
PRINT "DURANTE UMA TITULACAO ACIDO-BASE"
INPUT "NUMERO DE PONTOS E GRUPOS 1,J";M,G
DIM P1(M),H(M),HA(M,G),A(M,G),Z9(M),NA(M,G),NHA(M,G)
DIM XHA(M,G),XA(M,G),U(M),DP(M),T9(M),L(M),V1(M),V(G)
DIM K1(M,G),L1(M,G),L2(M),L3(M),S(M,G),Q(M)
INPUT "NUMERO DE MOLES DE PROTEINA - NP";NP
INPUT "VOLUME INICIAL - VO(mL)"; VO
INPUT "CARGA QDO TODOS OS GRUPOS ESTAO PROT. OU DESPROT.";NCT
INPUT "pH INICIAL"; PI
INPUT "pH FINAL"; PF
INPUT "INCREMENTO DE pH";DP
VO = VO/1000
E=0
50 FOR J = 1 TO G
  READ C(J),K(J),V(J),W(J)
60 NEXT J
N = INT(PF-PI)/DP
Z9(1)= NCT
70 FOR I = 1 TO N
  IF I <= 0 GOTO 80
  R=DP(I-1)
  DP(I)=R+DP
80 P1(I)=DP(I) + PI
  H(I) = 10^(-P1(I))
120 FOR J = 1 TO G
  Q(I)=Z9(I)
  HA(I,J) = H(I)*C(J)/(H(I)+(K(J)*10^(0.868*W(J)*Z9(I))))
  A(I,J)=K(J)*10^(0.868*W(J)*Z9(I))*C(J)/(H(I)+K(J)*10^(0.868*W(J)*Z9(I)))
130 NHA(I,J) = HA(I,J)*VO
  NA(I,J) = A(I,J)*VO
  XHA(I,J) = NHA(I,J)/NP
  XA(I,J) = NA(I,J)/NP
140 NEXT J
  T9(I) = 0
150 FOR J =1 TO G
  T9(I) = T9(I) + XA(I,J)
160 NEXT J
  Z9(I) = NCT - T9(I)
  E = E + 1
170 IF E = 1 GOTO 120
180 IF ABS (Z9(I) - Q(I))>0.1 GOTO 120
190 NEXT I
  INPUT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA O ACIDO FORTE -VH(mL)";VH
  INPUT "CONCENTRACAO DO TITULANTE -CB";CB
  KW = 1E-14
200 FOR I = 1 TO N
210 FOR J = 1 TO G
  K1(I,J) = K(J)*10^(0.868*W(J)*Z9(I))
  S(I,J) = K1(I,J)/(K1(I,J)+H(I))
220 NEXT J
  L(I) = H(I)*VO - VH*CB - (KW/(H(I)))*VO - (V(1)-VH)*S(I,1)*CB
  L2(I) = 0
230 FOR J = 2 TO G
  L1(I,J) = (V(J)-V(J-1))*S(I,J)*CB
  L2(I) = L2(I) +L1(I,J)
240 NEXT J
  L3(I) = L(I) - L2(I)
  U(I) = KW/H(I) - H(I) -CB
  V1(I) = L3(I)/U(I)
250 NEXT I
PRINT "VOLUME (mL)    pH          CARGA"
A$ = "###.####          ##.###          ###.#"
260 FOR I = 1 TO N
  PRINT USINGA$; V1(I),P1(I),Z9(I)
270 NEXT I

```

Apêndice 4: Listagem do Programa "PI"

```

10 PRINT "CALCULO DO PONTO ISOELETRICO DE UMA PROTEINA"
   INPUT "NUMERO DE GRUPOS COM CARGA - E + -I,J=";N,P
   DIM C(N),C1(P),K(N),K1(P),B(N),B1(N),E(P),E1(P),E2(P)
   PRINT "ESTEQU. (NUMERO DE GRUPOS/MOL) E CONST. DE DISSOC."
   PRINT "PARA ESPECIES COM CARGA - (C(I),K(I))"
20 FOR I = 1 TO N
   PRINT "PARA A";I;"-"
   INPUT C(I),K(I)
30 NEXT I
   PRINT "ESTEQU. (NUMERO DE GRUPOS/MOL) E CONT. DE DISSOC."
   PRINT "PARA ESPECIES COM CARGA + (C1(J),K1(J))"
40 FOR J = 1 TO P
   PRINT "PARA HA";J;"+"
   INPUT C1(J),K1(J)
50 NEXT J
   INPUT "pI APROXIMADO";H
   H=10^(-H)
55 GOTO 70
60 H=H1
   A=0
   A1=0
70 FOR I= 1 TO N
   B(I) = K(I)*C(I)/(K(I) + H)
   A = A + B(I)
   B1(I) = K(I)*C(I)/(K(I)+H)^2
   A1=A1 + B1(I)
80 NEXT I
   D=0
   D1=0
   D2=0
90 FOR J = 1 TO P
   E(J) = C1(J)*H/(H+K1(J))
   D = D + E(J)
   E1(J) = C1(J)*H/(K1(J)+H)^2
   D1=D1 + E1(J)
   E2(J)= C1(J)/(H+K1(J))
   D2 = D2 + E2(J)
100 NEXT J
   F= D - A
   G = D2 -D1 + A1
   H1 = H - F/G
   X = -LOG(H)/LOG(10)
   X1 = -LOG(H1)/LOG(10)
110 IF ABS (1-X1/X)>0.00001 GOTO 60
   PI = X1
   PRINT "pI DA PROTEINA"
   A$= "##.###"
   PRINT USING A$;PI
END

```