

Este exemplar corresponde a redação final da
Tese defendida por Maria da Conceição Silva
e Aprovada pela Comissão Julgadora.
Campinas, 29 de outubro de 1986.
Oswaldo H. Godinho



OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA TITULAÇÕES
POTENCIOMÉTRICAS DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÕES
CONCENTRADAS DE URÉIA. TITULAÇÕES POTENCIO-
MÉTRICAS DA PROTEÍNA DE BENCE JONES (JJO)

Maria da Conceição Silva

Tese de Doutorado

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

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Biblioteca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha Mãe

*Ao meu Pai e à Jorge Eduardo
em memória*

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal da Paraíba, especialmente à Chefia do Departamento de Química e demais colegas desse Departamento, pelo apoio concedido para a realização deste trabalho.
- À Diretoria do Instituto de Química da UNICAMP e à Comissão de Pós-Graduação desse Instituto, pelas facilidades concedidas para a realização do mesmo.
- Ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudos concedida.
- Ao Prof.Dr. Benedito Oliveira, Prof.Dr. Sérgio Marangoni e à colega Risoleta Marques, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela gentileza da cessão da Proteína de Bence Jones (JJO) e pela cordialidade com que sempre nos atendeu.
- Aos amigos Maria José R.M. Camelo, Manoel C.R. Filho e Vera Luzia R. de Matos, pela incansável ajuda prestada durante esse período.
- Ao Prof.Dr. Luiz Manoel Aleixo, pela colaboração e atenção prestadas no decorrer deste trabalho.
- Ao Prof.Dr. Graciliano O. Neto, pela gentileza do empréstimo de várias referências de interesse do trabalho.
- A todos os amigos do laboratório, ao lado dos quais tive a oportunidade de trabalhar neste período, pela colaboração prestada e por terem contribuído para manter o ambiente de trabalho sempre alegre, sadio e amigável.
- À Profª Maria Alice Conde Alves Rodrigues, à amiga Valda Gostautas Carvalho e ao Paulo José, pela rapidez e eficiência nos trabalhos de revisão do texto, datilografia e desenhos.
- Ao Laurindo, pela presteza nos trabalhos de reprodução e encadernação.

Título: Otimização das Condições para Titulações Potenciométricas de Proteínas em Soluções Concentradas de Uréia. Titulações Potenciométricas da Proteína de Bence Jones (JJO).

Aluna: Maria da Conceição Silva

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

Experiências anteriores desenvolvidas neste laboratório acusaram variações consideráveis no potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade em titulações potenciométricas efetuadas em soluções concentradas de uréia.

As investigações apresentadas neste trabalho revelaram que tais variações são causadas pela alteração da composição do solvente parcialmente aquoso. Durante a titulação, ocorre a diminuição da concentração de uréia na solução, em consequência da adição do titulante aquoso. Dependendo da concentração da solução titulante, observam-se ou não variações no potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade.

Foram efetuadas titulações potenciométricas do aminoácido Histidina e das proteínas Lisozima e Ovalbumina, em soluções concentradas de uréia, sob condições que ocasionassem pouca alteração na composição da solução de uréia. Os resultados obtidos com a Ovalbumina confirmaram a estequiometria de grupos titulados da proteína desnaturada em uréia, determinada anteriormente sob condições de maior variação da composição do solvente parcialmente aquoso. Isso demonstra a validade do procedimento empregado para transformar as medidas de f.e.m. em soluções de uréia, nos correspondentes valores de pH.

Os dados das titulações potenciométricas de proteínas foram analisados por um programa de cálculo mais exato que o utilizado em trabalhos anteriores do grupo. Com isso, pôde-se alcançar o limite máximo de separação de ácidos do programa.

Foram feitas, também, titulações potenciométricas da proteína de Bence Jones (JJO), desnaturada em uréia, ou após exposição da proteína a $\text{pH} \approx 3$.

Título: Optimization of the Conditions for Potentiometric Titrations of Proteins in Concentrated Solutions of Urea, Potentiometric Titration of Bence Jones (JJO) Protein.

Aluna: Maria da Conceição Silva

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

In previous studies carried out in this laboratory involving acid-base titrations in concentrated urea solutions a large variation in the liquid junction potential and/or the activity coefficient of hydrogen ion has been observed during the titration.

In this investigation it has been shown that such variations are dependent on the change in composition of the urea solution in the course of the titration. This change in composition of the urea solution depends on the concentration of the titrant solution.

Potentiometric titrations of the amino acid histidine and of the proteins lysozyme and ovalbumin in concentrated urea solutions have been studied. The titrations have been performed in conditions that cause a low variation in the composition of the overall solution. Results obtained with ovalbumin agree quite well with those obtained with more dilute titrants.

A computer program involving the use of a more exact treatment than that employed previously in this laboratory has been used. With this more exact treatment it is possible to attain the maximum capability of separation of the program.

Potentiometric titrations of Bence Jones (JJO) protein, both desaturated in urea and at pH 3, have also been performed.

ÍNDICE

| | pag. |
|--|------|
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| I.1. ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS | 1 |
| I.2. CURVAS DE TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DE PROTEÍNAS .. | 5 |
| I.3. DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS | 15 |
| I.4. MEDIDAS DE pH EM SOLUÇÕES DE URÉIA | 18 |
| I.5. pH EM SOLVENTES NÃO AQUOSOS E PARCIALMENTE AQUOSOS | 23 |
| I.6. pH EM MEIO IÔNICO CONSTANTE | 27 |
| | |
| II. OBJETIVOS | 31 |
| | |
| III. EXPERIMENTAL | 33 |
| III.1. APARELHAGEM | 33 |
| III.2. REAGENTES | 34 |
| III.2.1. Base, Ácido e Sal | 34 |
| III.2.2. Tampões NBS | 34 |
| III.2.3. Aminoácido e Proteínas | 35 |
| III.2.4. Soluções de Uréia (NH ₂ CONH ₂) | 36 |
| III.3. PROCEDIMENTOS | 39 |
| III.3.1. Titulações da Proteína em KCl 0,10 M | 39 |
| III.3.2. Titulações da Proteína Desnaturada em Solução de Uréia | 40 |
| III.3.2.1. Equilíbrio Ácido-Base em Soluções de Uréia | 41 |

| | |
|---|-----|
| III.3.2.2. Calibração dos Eletrodos em Solução de Uréia | 43 |
| III.3.2.2.1. Determinação do Volume de Equivalência | 44 |
| III.3.2.2.2. Determinação da Constante de Dissociação da Uréia Protonada (K_{UH^+}) | 47 |
| III.3.2.2.3. Relação entre Concentração do Íon Hidrogênio e F.E.M. | 48 |
| III.3.2.2.4. Determinação do Produto Iônico de Água (K_w) | 60 |
| III.3.2.2.5. Determinação de pH | 62 |
| III.4. DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA E pK_a DOS GRUPOS TITULÁVEIS DE PROTEÍNAS | 63 |
| IV. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA HISTIDINA EM URÉIA 8,00 M | 73 |
| IV.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 74 |
| V. LISOZIMA DESNATURADA EM URÉIA 9,30 M | 81 |
| V.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS | 81 |
| V.2. COMPORTAMENTO ÁCIDO-BASE DA LISOZIMA NATIVA .. | 82 |
| V.3. INVESTIGAÇÕES ANTERIORES SOBRE A LISOZIMA DESNATURADA | 84 |
| V.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 87 |
| VI. OVALBUMINA DESNATURADA EM URÉIA 8,00 M | 100 |
| VI.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS | 100 |
| VI.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 103 |

| | |
|--|-----|
| VII. TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS DA PROTEÍNA DE BENCE JONES (JJO) DESNATURADA EM ÁCIDO E EM URÉIA 9,10 M | 113 |
| VII.1. ESTRUTURA DAS IMUNOGLOBULINAS | 113 |
| VII.2. PROTEÍNAS DE BENCE JONES | 116 |
| VII.3. DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE BENCE JONES .. | 117 |
| VII.4. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE UMA PROTEÍNA DE BENCE JONES | 118 |
| VII.5. PROTEÍNA DE BENCE JONES (JJO) | 119 |
| VII.6. RESULTADOS | 122 |
| VII.6.1. Titulação Potenciométrica da Proteína de Bence Jones (JJO) Desnaturada em Ácido | 122 |
| VII.6.2. Titulação Potenciométrica da Proteína de Bence Jones (JJO) Desnaturada em Uréia 9,10 M | 129 |
| VII.7. DISCUSSÃO | 135 |
| VIII. CONCLUSÕES | 140 |
| IX. REFERÊNCIAS | 145 |
| ANEXO. LISTAGEM DO PROGRAMA NOVUREIA | 153 |

I. INTRODUÇÃO

I.1. ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS

As proteínas são formadas por cadeias polipeptídicas de α -aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas envolvendo o grupo α -carboxílico de um aminoácido e o grupo α -amino do seguinte, conforme é mostrado na Fig. 1⁽¹⁾.

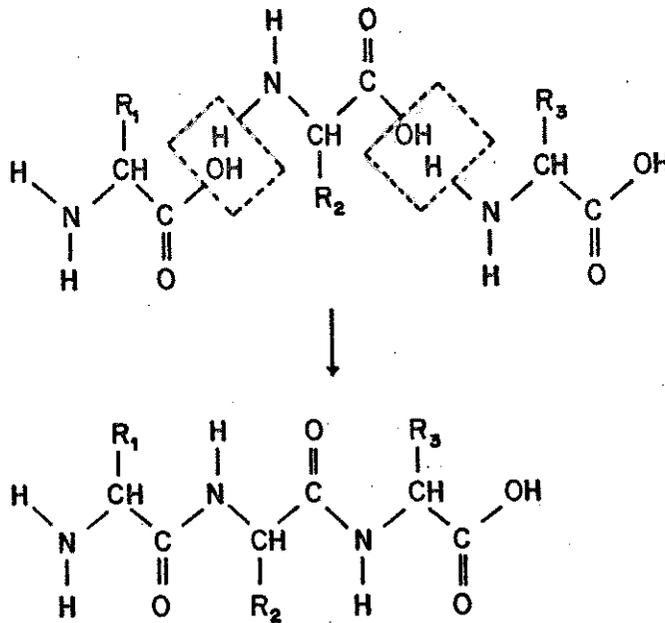


Fig. 1. Formação da ligação peptídica⁽¹⁾.

São 20 os aminoácidos encontrados com maior frequência nas proteínas e eles diferem entre si na natureza química do grupo R ligado ao átomo de carbono- α . Usando-se a polaridade do grupo R como critério de classificação, os aminoácidos po-

dem ser enquadrados nas 4 classes seguintes^(2,3):

1. Aminoácidos com grupos R não polares ou hidrofóbicos. Nesses aminoácidos, o grupo R é uma cadeia alifática (alanina, valina, leucina, isoleucina e prolina), aromática (fenilalanina e triptofano), ou uma cadeia contendo enxofre (metionina). Essas cadeias laterais são capazes de formar interações hidrofóbicas.
2. Aminoácidos com grupos R polares, mas sem carga. Esses grupos R participam da formação de pontes de hidrogênio entre si ou com a água, contribuindo para a solubilidade da proteína e incrementando as interações soluto-solvente. Tais grupos polares são: hidroxila (serina, treonina e tirosina), sulfidrila (cisteína) e amídico (asparagina e glutamina). A glicina pode ser enquadrada nesta categoria, pois o seu grupo R, um átomo de hidrogênio, é muito pequeno para interferir na polaridade dos grupos α -amino e α -carboxílico.
3. Aminoácidos com grupos R carregados positivamente (básicos). Esses grupos possuem carga líquida positiva a pH 7,0. São eles: grupo amino (lisina), grupo da guanidina (arginina), grupo imidazol (histidina).
4. Aminoácidos com grupos R carregados negativamente (ácidos). O principal grupo ácido é o carboxílico, que está presente na cadeia lateral dos dois aminoácidos dicarboxílicos: o ácido aspártico e o ácido glutâmico.

Outros aminoácidos podem ocorrer em proteínas, mas eles são minoria e aparecem somente em uma determinada proteína.

Uma molécula de proteína pode ser constituída de uma ou

mais cadeias polipeptídicas, sendo que cada cadeia pode conter centenas de aminoácidos. A união dos aminoácidos para a formação de uma cadeia polipeptídica de proteína não é casual. Cada tipo de molécula de proteína possui seqüência única de aminoácidos (estrutura primária), o que lhe confere composição química característica.

A presença na molécula de tantos grupos, de natureza tão variada, possibilita a ocorrência de vários tipos de interações químicas. As ligações peptídicas >C=O e >C-N são estabilizadas por ressonância, devido à máxima interação do par de elétrons desemparelhados do N com os elétrons π de C=O . Como conseqüência, os átomos envolvidos na ligação peptídica (O, C, N e H) situam-se num mesmo plano, como é apresentado na Fig. 2. A ligação simples C-N adquire caráter de ligação dupla e não pode girar livremente. No esqueleto da cadeia polipeptídica, só é possível haver rotação livre, nas ligações que envolvem o átomo de carbono- α .

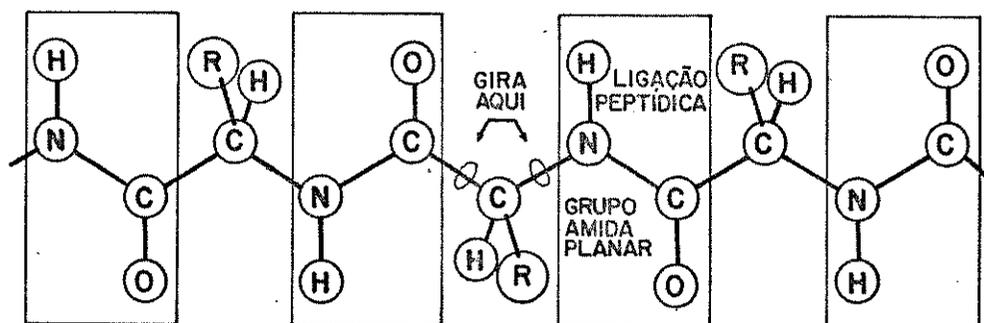


Fig. 2. Natureza planar e rotação limitada da cadeia polipeptídica⁽²⁾.

Apesar do caráter planar da ligação peptídica, interações de natureza diversa entre os grupos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, de uma mesma cadeia polipeptídica ou de diferentes cadeias, permitem à molécula proteica um enrolamento típico.

Podem-se distinguir 3 níveis de enrolamento numa molécula de proteína. Um, causado por pontes de hidrogênio entre os grupos $>C=O$ e $>NH$ das ligações peptídicas de uma mesma cadeia, faz com que a cadeia polipeptídica assuma a forma de uma α -hélice. Nessa forma, o átomo de oxigênio carbonílico interage com o átomo de hidrogênio do grupo amida do terceiro resíduo situado atrás do seu na cadeia. Quando as pontes de hidrogênio são formadas entre grupos peptídicos de cadeias diferentes, a conformação resultante é chamada folha pregueada ou estrutura β .

O outro enrolamento, que determina a estrutura terciária da proteína, envolve interações entre os grupos R das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Os grupos R hidrofóbicos de uma mesma cadeia ou de cadeias diferentes podem formar ligações hidrofóbicas, criando uma estrutura compacta em que eles ficam protegidos no interior, e a maioria dos grupos polares ou iônicos situam-se na superfície. As ligações hidrofóbicas são muito importantes na estabilização da estrutura nativa das proteínas globulares. Essas ligações também contribuem para a formação de ligações iônicas e pontes de hidrogênio entre grupos R iônicos e polares respectivamente, que não interagiriam entre si se em contato com a água, por estarem fortemente hi-

dratados, mas o fazem quando situados em regiões hidrofóbicas da molécula (4,5).

Outro tipo de interação que ocorre entre grupos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica é a ponte de dissulfeto que ajuda também na estabilização da estrutura terciária da proteína. Dois resíduos de cisteína oxidados a cistina formam uma ligação covalente de dissulfeto, unindo partes diferentes da cadeia ou diferentes cadeias.

Muitas proteínas são constituídas de mais de uma cadeia polipeptídica separada, que é agregada por interações intermoleculares semelhantes às que estabilizam a estrutura terciária. A forma resultante do ajuste das cadeias entre si para formar o agregado molecular é designada estrutura quaternária.

Entretanto é a estrutura primária, isto é, a ordem seqüencial dos resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica que governa a conformação adotada pela proteína. O tamanho, forma e polaridade dos grupos R das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e sua seqüência na cadeia permitem ou não: 1) a formação, em maior ou menor grau, de estruturas em α -hélice ou conformação β ; 2) ou interrupção dessas com dobra brusca provocada pela presença de um resíduo de prolina; 3) ou regiões de enrolamento compacto, sem estrutura definida, causadas por interações hidrofóbicas.

I.2. CURVAS DE TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DE PROTEÍNAS

Em solução, muitos dos grupos presentes nas proteínas po-

dem se envolver em equilíbrio ácido-base, o que torna possível seu estudo através da titulação potenciométrica, que pode fornecer várias informações de interesse para a química das proteínas, tais como: quais e quantos são os grupos ionizáveis na molécula; ocorrências de grupos mascarados, ou seja, de grupos escondidos no interior hidrofóbico da proteína, inacessíveis, portanto, ao solvente; e qual o efeito de outras substâncias sobre a ionização destes grupos⁽⁶⁾.

Na Fig. 3 são apresentadas as estruturas dos resíduos de aminoácidos que contêm grupos tituláveis mais frequentes em proteínas, em sua forma ácida⁽⁷⁾. O pH da solução de proteína determina o tipo de carga carregada por cada grupo. A forma ácida pode ser carregada como em $-\text{NH}_3^+$, então a forma ácida não terá carga, $-\text{NH}_2$. Pode também ocorrer de a forma básica não possuir carga, como $-\text{COOH}$, e a básica será então carregada, $-\text{COO}^-$. Todos os grupos acima, porém, comportam-se como ácidos ou bases monopróticos, de modo que, a partir do valor de pK_a de cada grupo, é possível se avaliar a região de pH em que cada um é titulado.

O valor de pK_a dos grupos tituláveis em proteínas é estimado a partir dos valores de pK_a dos mesmos grupos em compostos modelos, que são substâncias orgânicas mais simples contendo o grupo ionizável em posição semelhante ao que o grupo ocupa na cadeia lateral do resíduo de aminoácido. Em proteínas, porém, o valor do pK_a de um grupo pode não ser exatamente o mesmo que é encontrado em compostos modelos, pois esse grupo está sujeito a possuir interações eletrostáticas com outros

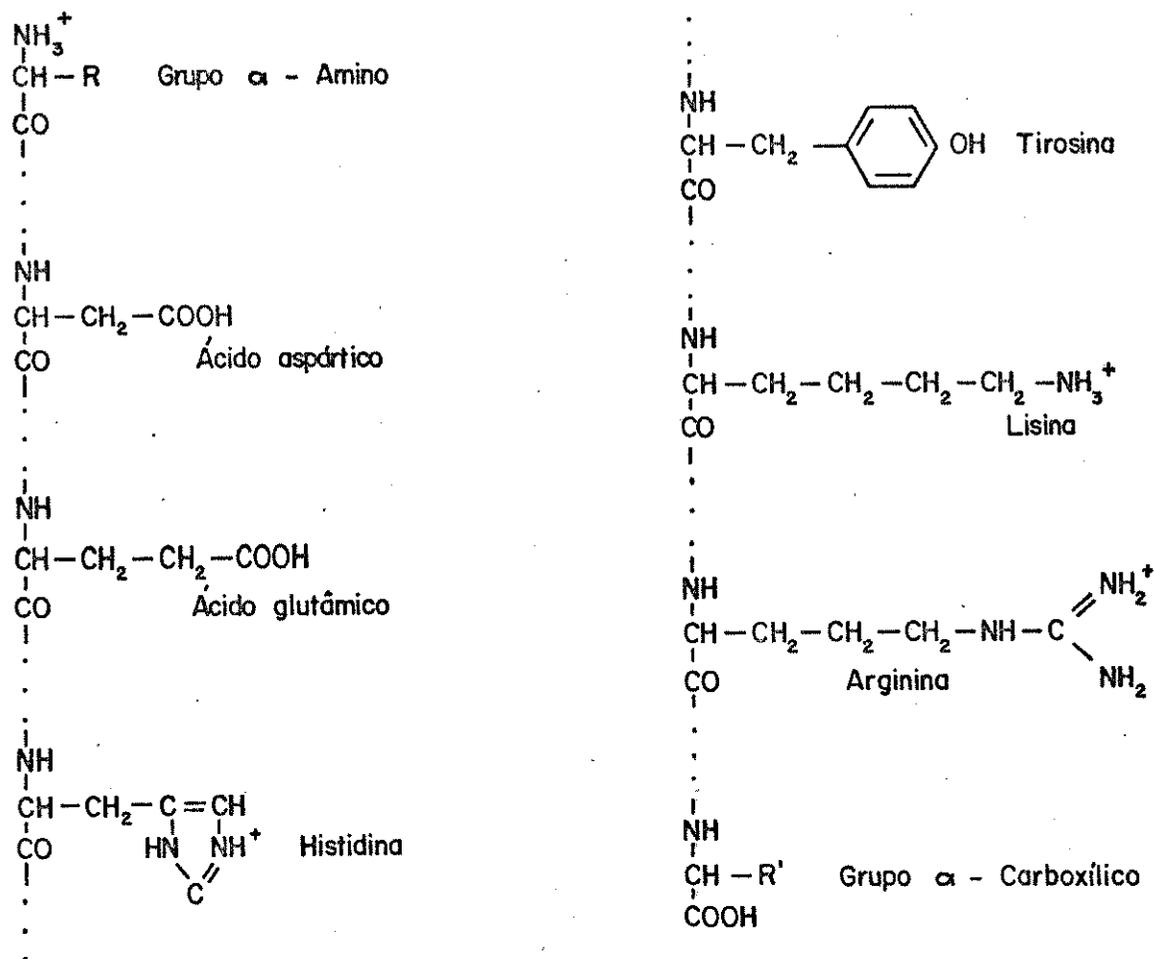


Fig. 3. Fórmulas dos grupos tituláveis mais comuns em proteínas (7).

grupos carregados da macromolécula, originando variações nos valores esperados de pK_a de até 1,5 unidade (7). Na tabela 1, são mostrados os valores de pK_a que os vários grupos tituláveis de uma proteína devem apresentar, se não houver interação eletrostática com outros grupos da molécula (pK intrínseco).

O procedimento experimental tradicional para se montar uma curva de titulação de proteínas consiste na adição de quan

Tab. 1. Valores de pK_{int} dos grupos tituláveis de proteínas a $25^{\circ}C$ (7).

| GRUPO | pK_{int} |
|-------------------------------|------------|
| α -carboxílico | 3,8 |
| Carboxílico da cadeia lateral | 4,6 |
| Imidazol | 6,3 |
| α -amino | 7,5 |
| Fenólico | 9,6 |
| Amino da cadeia lateral | 10,4 |
| Guanidínico | >12 |

tidades conhecidas de solução padrão de ácido ou de base, à solução aquosa da proteína com concentração e pH conhecidos. O pH é medido após cada adição. Numa solução semelhante à anterior, com relação a volume, pH e força iônica iniciais, mas não contendo a proteína, verifica-se qual a quantidade de reagente titulante que deve ser adicionada para se atingir os mesmos valores de pH da experiência anterior. Essa quantidade é bem menor que a consumida pela solução da proteína e dá indicação da concentração do íon (H^+ ou OH^-) livre. A diferença entre a concentração total de ácido adicionado e a concentração do íon hidrogênio livre dá a quantidade de íons hidrogênio ligados pela proteína a um certo pH. Quando se trata do íon OH^- ligado, ele é representado normalmente como íon hidrogênio dissociado da proteína. Os valores são geralmente representados como equivalentes de hidrogênio ligados por grama de pro-

teína ou por mol de proteína^(8,9).

A curva de titulação é montada, colocando-se em gráfico os equivalentes de prótons ligados por mol ou por grama de proteína versus o pH. Os valores de íons hidroxila ligados ou prótons dissociados são considerados como valores negativos de prótons ligados.

Uma curva de titulação obtida com esse procedimento é apresentada na Fig. 4. Pode-se observar que essa curva é constituída de duas curvas sigmoidais separadas por uma região mais plana e se estende por toda faixa de pH entre 2 e 12. A figura também revela a atuação da força iônica sobre a forma da curva de titulação. Observa-se que o aumento na força iônica faz com que haja um deslocamento em toda a curva na direção da região neutra, principalmente o ramo ácido. Não há, entretanto, variação nos valores do número de prótons ligados ou dissociados.

A interpretação mais antiga e também a mais simples das curvas de titulação de proteínas consiste na contagem do número de grupos titulados em cada uma das regiões de titulação em que a curva é dividida. A Fig. 4 mostra também esta divisão. Considera-se que os grupos carboxílicos são titulados na parte ácida da curva, entre pH 2 e 6. Na região neutra, pH 6-8,5, admite-se que são titulados os grupos imidazol e α -amino. Na região básica, acima de pH 8,5 até o pH máximo atingido, são titulados os grupos ϵ -amino da lisina e fenólicos da tirosina.

As críticas a esse tipo de análise são muitas. Inicialmente, a divisão da curva de titulação nas faixas correspondentes

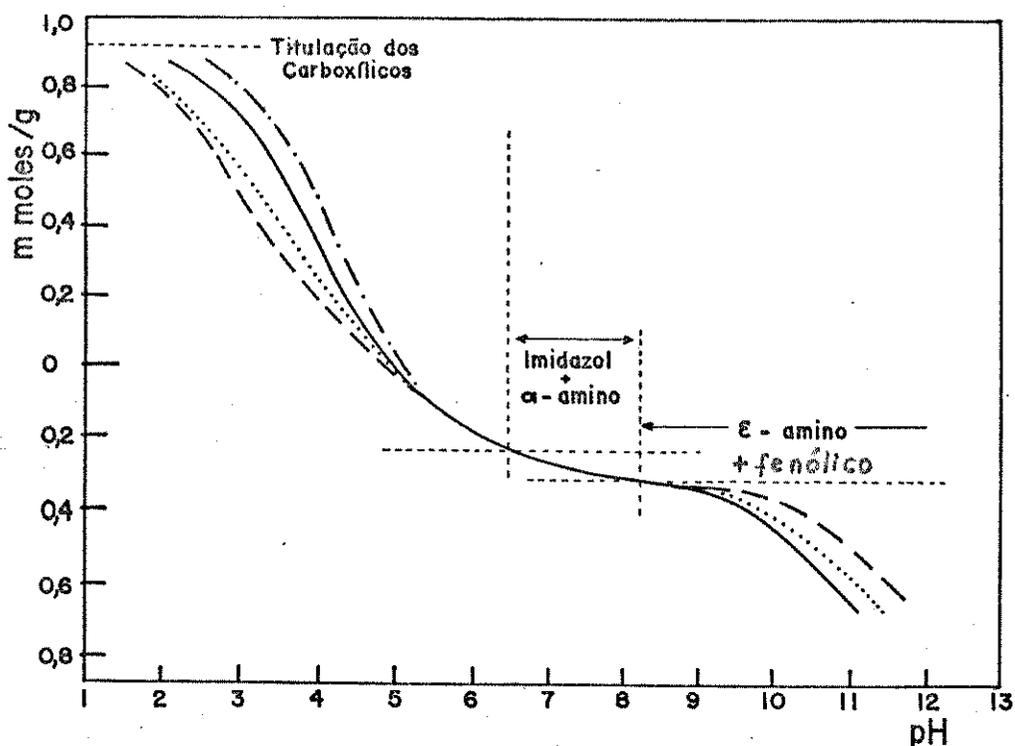


Fig. 4. Curvas de titulação da Ovalbumina a 25°C⁽⁶⁾.

(---) sem KCl; (.....); (—); (— · — · —) com KCl
0,03, 0,27 e 2,4 M respectivamente.

à titulação de cada grupo é baseada nos valores de pK de compostos modelos. Sobre esses valores é feita uma correção para o efeito eletrostático de outros grupos mas sem um fundamento teórico sólido^(6,10). Além disso, a contagem dos grupos titulados na região básica da curva não fornece o valor referente a cada grupo, mas apenas a soma dos 2 ou 3 presentes. É preciso então usar outro método para saber o valor de um ou dois deles e, por diferença, calcular o restante. Segundo Tanford⁽⁷⁾, a incerteza no número de grupos calculados por esse método é de 5% na região ácida e alcalina. Na região neutra, devido ao nú-

Aqui: e é a unidade de carga elétrica; D , a constante dielétrica do solvente; k , a constante de Boltzmann; T , a temperatura; κ , o parâmetro do Debye-Hückel; R , o raio da esfera que representa a proteína; a é a distância radial de maior aproximação do centro da esfera ao centro do íon do sal utilizado para ajustar a força iônica⁽⁷⁾.

\bar{Z} - é a carga líquida média sobre a proteína em um dado pH. Essa carga é obtida diretamente da curva de titulação, se o ponto de referência escolhido foi o ponto isoiônico da proteína. Pode também ser calculada de outra maneira, mas necessitam-se de dados sobre a ligação dos íons do sal da força iônica pela proteína.

A equação de Linderstrøm-Lang permite o cálculo de w e do pK_{int} dos grupos titulados. Por rearranjo, a Eq. (1) pode ser apresentada na seguinte forma:

$$pH - \log[X_i / (N_i - X_i)] = pK_{int}^{(i)} - 0,868 w \bar{Z} \quad (3)$$

Para os pontos situados na região onde o grupo i é titulado, o gráfico do lado esquerdo da equação versus \bar{Z} dará uma reta com intercessão a $\bar{Z} = 0$ igual ao pK_{int} do grupo e com inclinação igual a $-0,868 w$.

Diversos estudos da aplicação desse tipo de análise à titulação de várias proteínas permitiram chegar às seguintes conclusões: 1) A teoria só é válida para proteínas globulares cuja forma se assemelhe à do modelo. Mesmo para elas, porém, os

valores experimentais de w são geralmente mais baixos que o valor calculado pela equação 2. 2) Com moléculas de proteínas que sofrem mudanças conformacionais em decorrência da protonação, os valores de w não são constantes e variam através da faixa de titulação, pois dependem da carga, tornando sua determinação experimental difícil e de resultado duvidoso⁽⁹⁾. 3) Outro fato comprovado que desafia a teoria é que grupos quimicamente idênticos na proteína podem não possuir o mesmo pK_{int} . Isso aparece como um valor de w anormalmente alto, como foi observado por Tanford e Wagner⁽¹²⁾ para os grupos carboxílicos da lisozima.

Com relação aos valores de pK_{int} obtidos pela aplicação da teoria aos dados experimentais, os resultados são bem mais concordantes, pois a maior parte desses resultados foram parecidos com os valores esperados com base no pK_a de compostos modelos⁽¹³⁾. Isso confirma que a maior parte dos grupos tituláveis estão localizados na superfície da proteína. Existem grupos, contudo, que apresentam valores anormais de pK_{int} . Admitte-se que tal comportamento possa ser consequência de mudanças conformacionais que ocorram na faixa de pH em questão, tornando o grupo, antes mascarado, disponível para ser titulado numa região de pH diferente, o que resulta num pK_a anormal⁽⁹⁾. Outros grupos permanecem mascarados e não são titulados na proteína nativa. Uma razão possível para isso é que esses grupos estão escondidos na região interna hidrofóbica da proteína, inacessível ao solvente (como é o caso de todos os grupos fenólicos da ovalbumina⁽¹⁴⁾). Outra possibilidade é que esses gru-

pos estejam formando um par iônico com outro íon de carga oposta, em um ambiente parcialmente hidrofóbico da molécula. Somente uma mudança conformacional significativa como a que ocorre por desnaturação da proteína, libera esses grupos que, então, podem ser titulados normalmente.

Tanford^(7,13) discorda da teoria de Linderstrøm-Lang, quando este afirma que a carga está distribuída uniformemente na superfície da partícula. Ao contrário, Tanford acha que as falhas da teoria que foram observadas decorrem dessa simplificação. Tanford e Kirkwood⁽¹⁵⁾ elaboraram então uma teoria mais exata para as interações eletrostáticas nas proteínas. O modelo considera uma molécula esférica, impenetrável ao solvente, com distribuição não uniforme de cargas, em posições fixas não necessariamente localizadas na superfície. Nem todos os grupos com o mesmo pK_{int} são titulados simultaneamente, pois o tratamento leva em consideração as interações específicas a que cada grupo está sujeito.

A equação final de Tanford e Kirkwood é constituída por dois termos: um que independe das posições das cargas e é determinado em baixa força iônica, e outro que é dependente do conhecimento preciso da localização dos vários sítios e também da distância de maior aproximação do solvente com cada carga⁽⁸⁾. A aplicação desse tratamento à titulação de algumas proteínas mostrou que um dos parâmetros principais da teoria teve que ser modificado para conciliar a teoria com a experiência, sugerindo, como um dos próprios autores admite, não apresentar vantagens sobre o tratamento mais simples de Linderstrøm-Lang^(13,16).

As anomalias encontradas pela análise das curvas de titulação ácido-base de uma proteína são informações importantes, pois acentuam as particularidades de cada proteína. A existência de grupos mascarados ou sujeitos a interações específicas na proteína nativa é comprovada pela análise da proteína no estado desnaturado.

I.3. DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS

Entende-se por desnaturação de uma proteína o desenrolamento da estrutura nativa original, sem rompimento das ligações peptídicas. O estado conformacional ideal, atingido por desnaturação completa da proteína, é o enrolamento aleatório, em que todas as ligações internas não covalentes são rompidas, permitindo rotação livre em todas as ligações simples da molécula^(17,18). Diferentes técnicas físico-química têm sido empregadas na investigação da transição do estado nativo para o estado desnaturado, explorando variações que ocorrem em propriedades tais como: entalpia, entropia, capacidade calorífica, rotação ótica, viscosidade, ligação ácido-base, etc.

Um resumo bastante interessante de Baldwin⁽¹⁹⁾, sobre a história dos estudos de desnaturação de proteína, revela que este tem sido, desde o início, um assunto sujeito a polêmicas. Ácidos, bases, sais, aquecimento, pressão, reagentes como cloridrato de guanidina (GuHCl) e uréia são todos desnaturantes de proteínas. Numerosos estudos comparativos da ação desnaturante desses agentes sobre as proteínas conduziram a uma con-

clusão unânime: que somente em soluções concentradas de GuHCl as moléculas das proteínas alcançam o estado de enrolamento aleatório. Tal nível de desenrolamento também pode ser atingido por muitas proteínas em soluções concentradas de uréia. Para algumas, porém, a solubilidade limitada da uréia é um fator de impedimento para a transição completa. A desnaturação por aquecimento ou por sais inorgânicos, por outro lado, não é efetiva para levar a molécula a um desenrolamento completo. Um estado de enrolamento aleatório parcial, com manutenção de certo grau de estrutura ordenada da molécula, é obtido pela ação desses desnaturantes (18).

Estudos termodinâmicos mais recentes, desenvolvidos principalmente por Privalov (20,21), utilizando microcalorimetria com varredura térmica para acompanhar o processo de desnaturação de proteínas, não acusaram diferenças entre as variações de entalpia ou de capacidade calorífica associadas à desnaturação de proteínas por ácido, aquecimento ou por solução de GuHCl . Segundo Privalov, o acréscimo das propriedades óticas - observado quando uma proteína já desnaturada por aquecimento é tratada com GuHCl - não é causado por desenrolamento adicional da estrutura, mas sim por efeitos de solvatação.

O conhecimento da extensão da desnaturação de uma proteína causada por um determinado agente desnaturante auxilia bastante na definição das condições experimentais que devem ser usadas para a titulação potenciométrica do material desnaturado. Quando se usa um reagente desnaturante, como é o caso deste trabalho, é importante saber qual a concentração mínima do rea

gente e qual o tempo necessário para a desnaturação completa. Por outro lado, os resultados obtidos da análise titulométrica podem indicar se isso realmente aconteceu ou não.

Numa cadeia polipeptídica enrolada aleatoriamente, as únicas interações presentes são as eletrostáticas entre grupos próximos. Essas interações, contudo, não são suficientemente fortes para provocarem alterações no comportamento de ionização desses grupos. Logo, espera-se que todos sejam titulados, que os grupos do mesmo tipo apresentem o mesmo valor de pK_a e que não haja diferenças nesse valor para diferentes proteínas.

O GuHCl é um reagente desnaturante de proteínas um pouco mais forte que a uréia, pois suas soluções atuam eficientemente em concentrações mais baixas que as requeridas pela uréia. Por ser um eletrólito forte, as titulações potenciométricas em soluções de GuHCl estão menos sujeitas aos efeitos das interações eletrostáticas. Apesar disso, a uréia também tem sido muito utilizada, pois existem estudos que exigem um meio desnaturante não iônico, como o proporcionado pelas soluções aquosas de uréia ⁽²²⁾.

Não existe ainda uma explicação precisa da ação desnaturante que o GuHCl e a uréia exercem sobre a proteína. Em um trabalho recente deste laboratório ⁽²³⁾, foi apresentada uma exposição detalhada das várias interpretações da desnaturação dadas pelos pesquisadores. Dessas interpretações, a que parece ser a mais aceita é a que indica a ação do solvente sobre as porções hidrofóbicas da macromolécula. A maneira exata como ocorre esta interação não é conhecida, mas admite-se que ela

aumenta a solubilidade aquosa das regiões hidrofóbicas da proteína (18,22).

A grande maioria das titulações potenciométricas que compõem este trabalho utilizam soluções concentradas de uréia como meio titulante. Além dos problemas relacionados com a medida e interpretação dos valores de pH comuns em solventes não aquosos ou mistos, no caso das soluções aquosas de uréia, existe uma complicação adicional, resultante da participação do próprio solvente em equilíbrio ácido-base.

I.4. MEDIDAS DE pH EM SOLUÇÕES DE URÉIA

Em 1930, Burk e Greenberg⁽²⁴⁾ acharam que os pHs dos tampões acetato e fosfato, medidos com eletrodo de hidrogênio, eram maiores em uréia 6,66 M que em água. Posteriormente, Levy⁽²⁵⁾ calculou a constante de dissociação do ácido acético em uréia e encontrou valor maior que o valor em água e dependente da concentração da uréia. Donovan e colaboradores⁽²⁶⁾ mostraram graficamente o aumento nos valores de pK_a dos grupos carbóxicos, imidazol, fenólico e amino, de compostos modelos com o aumento da concentração da solução de uréia. Essa tendência foi também observada posteriormente por Levy e Magoulas nas constantes de dissociação de ácidos dicarboxílicos⁽²⁷⁾. Bull e colaboradores⁽²⁸⁾ constataram que o pH de uma solução de HCl em uréia 9,44 M, a 30°C é maior que o pH em água em cerca de 1,63 unidade. Tahin⁽²⁹⁾ investigou o efeito da uréia sobre os valores de pK_a de vários íons orgânicos e inorgânicos e obser-

vou aumentos significativos nos valores de pK_a dos grupos carboxílico, imidazol e fenólico entre outros. Para o grupo amino, porém, observou a quase ausência de alteração. No caso do ácido acético, Tahin mostrou que o aumento do pK_a é linear com o aumento da concentração da uréia. Schäfer⁽³⁰⁾ também relatou o aumento do pK_a do ácido acético em uréia.

Atribuir esses comportamentos somente à diferente constante dielétrica do solvente leva-nos a uma expectativa exatamente contrária à real. Como as soluções de uréia possuem maior constante dielétrica que a água⁽³¹⁾, o normal seria que os ácidos se tornassem mais fortes em uréia do que o são em água. Os resultados das medidas potenciométricas, porém, indicam que eles são menos ionizados em uréia^(25,27).

Em 1958, Levy⁽²⁵⁾ desenvolveu uma teoria para explicar o comportamento ácido-base em soluções de uréia, tomando como ponto de partida o caráter de base fraca da uréia. Ele calculou a constante de dissociação da uréia protonada (que ele designou K'_u) em concentrações de uréia de 1-8M e verificou sua diminuição com o aumento da concentração da solução. De acordo com os argumentos de Levy, essa variação é causada pela diminuição da concentração da água nas soluções mais concentradas de uréia. Escrevendo o equilíbrio de dissociação da uréia na forma ácida com diferentes níveis de hidratação para reagentes e produtos, ele desenvolveu uma equação através da qual é possível calcular o pK'_u conhecendo-se a atividade da água na solução. Um tratamento semelhante foi dado à dissociação da água e também se chegou a uma relação entre o pK_w e a atividade da

água. O valor do pK_a do ácido acético em uréia, calculado com uma equação semelhante, aproximou-se bastante do experimental, como se vê na tabela 2.

Tab. 2. Constantes de dissociação do Ácido Acético a 20°C (25).

| Uréia mol/l | $pK_{\text{exp.}}$ | $pK_{\text{calc.}} =$ $4,78 - 2,78 \log(\text{H}_2\text{O})$ |
|----------------|--------------------|---|
| 0 | 4,78 | 4,78 |
| 3,5 | 4,97 | 4,99 |
| 7,0 | 5,28 | 5,25 |

Bull e colaboradores (28) não concordam com a teoria da hidratação preferencial desenvolvida por Levy. Eles calcularam os valores de pK do ácido acético, p-nitrofenol e hidróxido de amônio a várias concentrações de uréia por potenciometria e os compararam com os valores dados por condutimetria ou colorimetria. Os resultados da potenciometria foram sempre maiores que os obtidos pelos outros métodos, como é visto na tabela 3.

Segundo Bull e colaboradores, os valores menores de pK em uréia obtidos por condutimetria e por colorimetria apoiam a tendência sugerida pela alta constante dielétrica das soluções de uréia, isto é, que os ácidos são mais dissociados em uréia que em água, se bem que a constante dielétrica não seja a propriedade determinante desse comportamento. Isso é causado pela menor atividade dos íons hidrogênio nas soluções concentra-

das de uréia, manifestada nas medidas potenciométricas, visto que o eletrodo de vidro mede a atividade do próton, independente de sua associação com uma molécula de água ou com uma molécula de uréia. Os autores, entretanto, não propuseram qualquer mecanismo para a associação entre a uréia e o próton.

Tab. 3. Valores de pK_a a 30°C de Bull e colaboradores⁽²⁸⁾.

| | Uréia 9,44 M | | | |
|---------------------|---|-------|--------|-------------------|
| | Água | Cond. | Color. | Potenc. |
| Ác. acético | 4,76 ^{a,c} | 3,88 | - | 5,55 |
| p-Nitrofenol | 7,16 ^b ; 7,06 ^a ; 7,08 ^c | 6,19 | 6,17 | 7,84 |
| Hidróxido de amônio | 4,68 ^c | 5,28 | - | 9,52 ^d |

a-dado potenciométrico; b-colorimétrico; c-condutimétrico; d-medida experimental sujeita a erros.

Uma outra interpretação do problema foi apresentada mais recentemente por Schäfer⁽³⁰⁾, resultante de um estudo do comportamento de titulação do ácido acético em uréia. No desenvolvimento de uma equação de Henderson-Hasselbalch para descrever a curva de titulação em uréia, Schäfer, assim como Levy, levou em consideração a afinidade de prótons pela uréia. A concordância entre as curvas teóricas e experimentais a várias concentrações de uréia foi boa. Como, porém, a constante de dissociação da uréia protonada não apresentou relação linear com a concentração da uréia, foi desenvolvido um tratamento matemático, ad

mitindo a dimerização da uréia. Os resultados foram considerados melhores que os anteriores pelos autores, mas o valor da constante calculado com a equação deduzida apresentou erro de no mínimo 15% em cada concentração, com relação ao valor experimental.

Neste trabalho, a basicidade da uréia em soluções ácidas foi levada em consideração, de acordo com as orientações de Levy⁽²⁵⁾ e confirmação de Schäfer⁽³⁰⁾. O procedimento de titulação potenciométrica empregado não requer o conhecimento dos valores dos coeficientes de atividade, mas que eles não variem durante a titulação.

A influência da uréia sobre os valores de pK_a de grupos tituláveis em proteínas tem sido algumas vezes desconsiderada (32,33). Mesmo Levy, que desenvolveu um estudo sério sobre o tema, não o aplicou num trabalho sobre a titulação potenciométrica da albumina do soro bovino em uréia, publicado no mesmo volume em que foi discutida a basicidade da uréia⁽³²⁾. No mesmo ano, porém, Levy publicou um outro trabalho sobre a determinação de grupos fenólicos na ribonuclease, por titulações espectrofotométrica e potenciométrica⁽³⁴⁾. Esse trabalho indica que o pK_{int} dos grupos fenólicos é 0,7 unidade maior em uréia que em água.

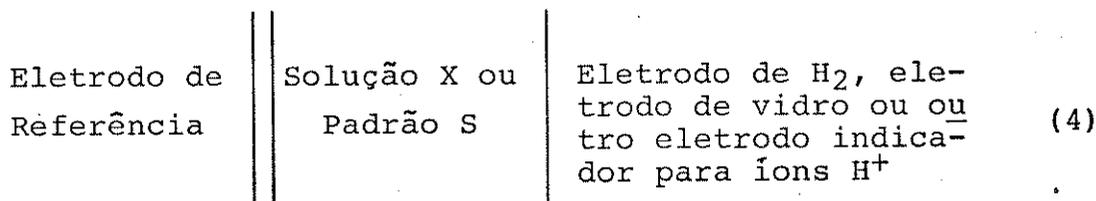
Antes disso, Foster e Sterman⁽³⁵⁾, também aplicando a teoria de Linderstrøm-Lang, calcularam valores de pK_{int} do grupo carboxílico da albumina do plasma bovino a várias concentrações de uréia em várias forças iônicas. Eles foram, contudo, muito cautelosos na apresentação dos resultados, salientando

com ênfase possíveis falhas nos cálculos. Marini e Wunsch⁽³⁶⁾ respeitaram também o efeito da uréia sobre o pK_{int} do grupo carboxílico na titulação potenciométrica do quimotripsinogênio e da α -quimotripsina em uréia 8 M. Como, porém, sua análise da curva de titulação foi baseada no critério das regiões de titulação, eles simplesmente ampliaram o limite de pH onde titulam os carboxílicos de 5,5 para 6,0.

O primeiro trabalho deste grupo que apresentou titulações potenciométricas de proteínas em soluções concentradas de uréia não considerou o efeito da uréia sobre o pH⁽³⁷⁾. No trabalho seguinte, porém, esse aspecto foi detalhadamente abordado⁽²³⁾.

I.5. pH EM SOLVENTES NÃO AQUOSOS E PARCIALMENTE AQUOSOS

A medida de pH em soluções aquosas diluídas, de acordo com as normas recomendadas pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), envolve medidas de força eletromotriz (f.e.m.) da cela:



A combinação de eletrodos mais utilizada é entre o eletrodo de calomelano saturado e o eletrodo de vidro. O procedimento envolve a padronização do medidor de pH com um ou mais tampões padrões da escala NBS (National Bureau of Standards). O

circuito do potenciômetro é ajustado de modo a indicar o pH(S) correto do tampão padrão. Posteriormente, o tampão é substituído pela solução X cujo pH se deseja medir e que é definido por (38):

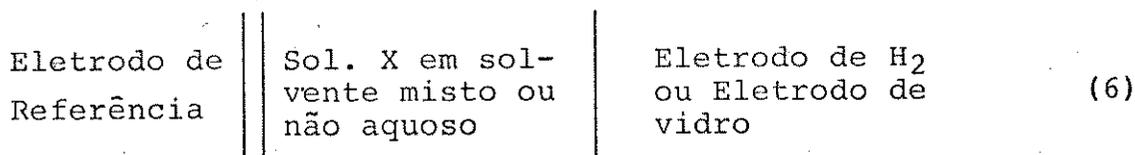
$$\text{pH}(X) = \text{pH}(S) - \frac{E_X - E_S}{2,3026 RT/F} \quad (5)$$

E_X e E_S representam a f.e.m. da cela contendo, respectivamente, a solução X ou o tampão S. Os demais termos têm o significado usual.

Sob condições ideais, ou seja, em solução aquosa com força iônica não superior a 0,1 e pH entre 3,5-10, admite-se que o potencial de junção líquida na cela (4) pode ser ignorado e o pH operacional ser relacionado com $-\log a_H$, onde a_H é a atividade do íon hidrogênio.

Existem, contudo, situações de interesse acadêmico, comercial ou industrial, em que a amostra cujo pH deve ser determinado não se enquadra nas condições acima, como é o caso das medidas de pH em água do mar ou em fluidos biológicos (que possuem composição salina constante), em solventes mistos tipo álcool-água, ou em solos, que necessitam de outra interpretação.

A cela eletroquímica normalmente utilizada com solventes não aquosos ou parcialmente aquosos é a mesma cela (4) acima usada com soluções aquosas. Os eletrodos que a compõem dão origem a medidas de f.e.m. reprodutíveis em vários solventes não aquosos ou parcialmente aquosos, o que é um claro sinal de sua conveniência para tais medidas (39).



Entretanto eles incorporam um potencial de junção líquida geralmente grande, que depende da natureza do solvente e da composição, quando se trata de um solvente misto. Os coeficientes de atividade dos íons também são afetados por mudanças na natureza ou composição do solvente, visto que essas mudanças geralmente acarretam alterações na constante dielétrica do solvente, afetando, pois, as forças interiônicas. Além disso, existe um outro efeito denominado efeito do meio, relacionado com a variação na energia livre de transferência de uma espécie do estado padrão em água para o estado padrão não aquoso ou misto^(39,40).

Para se fazer uma relação entre a atividade do próton em um solvente não aquoso e a atividade do próton em água, é necessário o conhecimento desses parâmetros. O valor do coeficiente de atividade do soluto na solução não aquosa pode ser estimado sob condições de baixa força iônica pela equação de Debye-Hückel. Porém, as várias tentativas práticas de se determinar o efeito do meio em alguns solventes parcialmente aquosos resultaram em valores muito discordantes, como pode ser visto nas tabelas 8-3 e 8-4 do tratado de Bates⁽³⁹⁾, o que demonstra a impossibilidade atual de se relacionar a atividade de um soluto em dois solventes diferentes.

O caminho seguido pelos pesquisadores tem sido o de montar escalas de pH com estados padrões característicos para cada

solvente ou para cada composição de solvente misto, com a finalidade de medir a acidez relativa, designada pH^* , em um solvente de composição fixa. Sabe-se que o potencial de junção líquida mantém-se constante, quando não há variação na composição do solvente. Sabe-se também que o efeito do meio, apesar de não poder ser estimado, é também constante a uma dada temperatura e composição do solvente. Segue-se que a diferença entre os dois dá origem a outra constante, representada por δ .

Segundo procedimento de Bates e colaboradores^(41,42), δ deve ser subtraído do pH da solução amostra lido no medidor, após calibração dos eletrodos com os tampões aquosos NBS, para obter o pH^* .

Para se chegar ao valor de δ , é necessário fazer medidas de f.e.m. do tampão no solvente em questão em celas sem junção líquida, de modo que, para tornar a utilização do procedimento mais fácil, existem valores tabelados de δ , principalmente para solventes parcialmente aquosos de metanol e etanol.

Uma outra possibilidade para medir o pH^* em soluções não aquosas é calibrar os eletrodos com tampões de pH^* conhecido, preparados no mesmo solvente da amostra. Nesse caso, admite-se que o potencial de junção líquida é eliminado, desde que as mesmas restrições que foram postas às medidas em meio aquoso sejam mantidas, quais sejam: a solução desconhecida deve se aproximar do padrão com respeito a baixa força iônica, faixa de pH^* , temperatura e composição do solvente. Somente dessa maneira o pH^* medido pode ser relacionado com $-\log a_{\text{H}^+}^*$. Valores tabelados de pH^* de vários tampões em misturas etanol ou meta-

nol-água a várias concentrações e temperaturas podem ser encontrados na literatura⁽³⁹⁾.

A cela (6) também pode ser usada para medir concentrações do íon hidrogênio. Esse tipo de aplicação é muito utilizado pelos químicos de coordenação no estudo da formação de complexos em sistema complicados. O procedimento fundamenta-se na capacidade que um sal inerte, presente em alta concentração no solvente, tem em suprimir variações nos coeficientes de atividade de íons presentes em quantidades bem menores, quando a concentração desses íons é pouco variada. Por esse motivo, esse método é chamado método do meio iônico constante.

I.6. pH EM MEIO IÔNICO CONSTANTE

Uma revisão histórica sobre o procedimento foi feita há anos atrás por Biedermann e Sillén⁽⁴³⁾. Os argumentos usados para defender esse tipo de procedimento não diferem muito dos apresentados acima.

Na medida do pH de uma solução desconhecida X em relação a uma solução de referência S, utilizando-se o eletrodo de calomelano, o eletrodo de vidro e uma ponte salina, o pH operacional é dado pela Eq. (5), admitindo-se que o potencial de junção líquida $\Delta E_j = E_j(X) - E_j(S)$ é zero. Quando se usa uma solução X com composição ou força iônica diferente da solução de referência S, o potencial de junção líquida aumentará e o pH medido não representará com exatidão a atividade do íon hidrogênio, pois inclui um erro igual a⁽³⁹⁾:

$$\Delta \bar{E}_j = \frac{E_j(X) - E_j(S)}{RT \ln 10/F} \quad (7)$$

$$\text{pH}(X) = \text{p}a_{\text{H}} + \Delta \bar{E}_j = \text{p}c_{\text{H}} + \Delta \bar{E}_j - \log \gamma_{\text{H}} \quad (8)$$

ou
$$\text{pH}(X) = \text{p}c_{\text{H}} - A \quad (9)$$

Medidas em vários sistemas ácido-base em meio iônico aquoso constante revelaram que A é uma constante típica do meio salino. Conhecendo-se seu valor, as medidas de pH podem ser convertidas em concentrações de íon hidrogênio. Geralmente o valor de A é determinado através de uma titulação de um ácido forte com base forte, num meio igual ao da amostra⁽⁴⁴⁾.

Mas existem também sistemas em que ΔE_j é uma função linear da concentração do íon hidrogênio da solução^(43,45,46). A variação de ΔE_j com a concentração do íon hidrogênio é obtida também a partir de uma titulação de solução de ácido forte com base forte^(47,48). A uma força iônica maior, a dependência é mais atenuada.

Biedermann e Sillén⁽⁴³⁾ demonstraram que a variação de um termo relacionado com A, observada quando os íons H^+ eram substituídos por cátions diversos em meio aquoso de perclorato 3 M, devia-se exclusivamente à variação no potencial de junção líquida, sem qualquer contribuição de variação no coeficiente de atividade.

Apesar do alto potencial de junção líquida que aparece na interface ponte salina aquosa | solução X em solvente não aquoso, é possível fazer medidas de concentração de íons hidrogê-

nio em tais soluções, utilizando-se o eletrodo de calomelano e o eletrodo de vidro, desde que o potencial de junção líquida seja medido com cuidado. Uma maneira de diminuí-lo é preparar a ponte salina no mesmo meio não aquoso da amostra⁽⁴⁷⁾.

Van Uitert e Haas⁽⁴⁹⁾ usaram eletrodo de vidro e eletrodo de calomelano saturado para medidas da concentração de íon hidrogênio em soluções água-dioxano. A medida (B) do medidor de pH em soluções água-dioxano a várias concentrações, contendo quantidades variadas de HCl-NaCl, foi relacionada com a concentração do íon hidrogênio por:

$$B = - \log [H^+] + \log U_H \quad (10)$$

Uma investigação cuidadosa mostrou que U_H , o fator de correção, é dependente da composição do solvente e da força iônica, mas independente da concentração de H^+ .

Rossotti e Rossotti⁽⁵⁰⁾ investigaram o comportamento do coeficiente de atividade médio do HCl em misturas parcialmente aquosas de metanol, etanol ou dioxano, contendo altas concentrações de perclorato ou nitrato (de sódio ou de lítio), utilizando celas sem junção líquida. Em quase todos os sistemas estudados pôde ser constatado que mudanças na concentração do íon hidrogênio não apresentaram qualquer efeito sobre o coeficiente de atividade do íon hidrogênio. Dessa maneira, as variações observadas em $E_j^!$ com a concentração do íon hidrogênio em celas contendo junção líquida foram atribuídas, com segurança, ao potencial de junção líquida.

Conclui-se, então, que os potenciais medidos nas titulações potenciométricas em meio iônico constante, além de representarem a variação na concentração do íon hidrogênio, podem incluir contribuições de mudanças no potencial de junção líquida, coeficiente de atividade e efeitos do meio sobre o íon hidrogênio, se ocorrer variação na composição do solvente. Apesar de esses efeitos poderem ser computados como um todo, e a concentração real do íon hidrogênio ser calculada após correção apropriada, o ideal é eliminar a causa dessas contribuições indesejáveis, o que é possível, fazendo-se com que a composição do solvente seja alterada o mínimo possível em consequência da adição do titulante.

Ohtaki e Biedermann⁽⁵¹⁾ observaram o efeito da adição de diversos sais de perclorato a soluções aquosas - também de perclorato, mas possuindo cátion de diferente tipo - sobre o potencial de celas com junção líquida, mantendo-se fixa a concentração dos íons hidrogênio e perclorato. As variações observadas foram principalmente atribuídas às variações nas constantes dielétricas dos solventes, causadas por mudança na composição do meio.

Neste trabalho, foi investigado também esse aspecto da variação da composição do solvente, com o intuito de contribuir um pouco no aprimoramento da técnica da titulação potenciométrica em soluções concentradas de uréia.

II. OBJETIVOS

Titulações potenciométricas de proteínas nativas, desnaturadas em uréia ou em GuHCl , foram já apresentadas em trabalhos anteriores, desenvolvidos neste laboratório^(23,37,52).

A constatação da capacidade de ligação de prótons que, apesar de fraca, é exercida pela uréia dirigiu os estudos de alguns membros do grupo para esse sistema. Foram desenvolvidas equações para descreverem as medidas de pH em soluções concentradas de uréia⁽²³⁾.

Nas titulações realizadas em soluções de uréia, observou-se que a variação do potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade era muito grande.

Continuou-se, pois, a investigar o sistema uréia, com a finalidade de se entender melhor a variação do potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade no decorrer da titulação. Outro objetivo seria buscar alternativas experimentais que pudessem eliminar tal variação ou, ao menos, reduzir sua relevância. Este trabalho descreve essas investigações.

Depois que se atingiu esse objetivo inicial, foram feitas titulações de proteínas que já tinham sido estudadas anteriormente pelo grupo, em condições experimentais que acusavam altos coeficientes de variação do potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade. Os resultados dessas titulações levantaram alguma dúvida quanto à eficiência dos procedimentos empregados.

Em estudo anterior realizado neste laboratório com a Ovalbumina⁽²³⁾, foram encontrados 3 grupos ionizáveis a mais

na proteína desnaturada em uréia. A realização de novas experiências, nas quais o potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade não variasse tanto, poderia revelar se o aparecimento desses grupos estava relacionado com algum erro nas equações que relacionavam o potencial medido com o pH.

Também a lisozima foi de novo titulada em uréia, pois, por ter sido a primeira proteína desnaturada em uréia estudada pelo grupo, o efeito da basicidade da uréia não foi considerado no tratamento matemático dos dados da titulação.

A proteína de Bence Jones (JJO) foi também estudada, após ser submetida à ação de dois agentes desnaturantes diferentes, com o objetivo específico de se determinar o número de grupos carboxílicos da proteína, a fim de complementar dados da composição de aminoácidos da proteína.

III. EXPERIMENTAL

III.1. APARELHAGEM

As medidas de f.e.m. ou de pH foram feitas com um pH-metro Orion 701 A ou com um pH-metro Micronal B-375 com precisão de 0,1 mV ou 0,001 pH, respectivamente. Em quase todas as titulações, foram usados um eletrodo de referência de junção dupla Orion 90-20, com ponte salina de solução saturada de KCl e um eletrodo de vidro Metrohm EA 109.

As soluções sob análise, contidas em celas de titulação de paredes duplas da Metrohm com capacidade de 40 ml, foram mantidas a $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durante toda a experiência, através da circulação de água entre as paredes. A temperatura da água foi mantida no valor desejado por um banho termostaticado Colora.

O titulante foi adicionado através de uma microbureta Metrohm E457 com unidade intercambiável de 0,5 ml e precisão de 0,2 μl . Em algumas experiências, utilizou-se a unidade de 5 ml, que possui precisão de 2 μl .

Na titulação da proteína de Bence Jones (JJO) λ , devido à quantidade limitada de material disponível, amostras iguais ou menores que 10 mg foram analisadas e, para isso, foi necessário usar equipamentos de microanálise. Usou-se então um microeletrodo combinado Metrohm EA 125 e a cela de titulação da Metrohm com capacidade total de 5 ml.

Para os cálculos, utilizou-se um microcomputador CP-500 da PROLOGICA e uma impressora P-700 do mesmo fabricante.

III.2. REAGENTES

III.2.1. Base, Ácido e Sal

Soluções de NaOH livres de $\text{CO}_2 \approx 0,1$ ou ≈ 1 M foram preparadas com o reagente PA da Grupo Química em KCl 0,10 M e padronizadas com biftalato de potássio, padrão acidimétrico da Fisher, de acordo com instruções de Kolthoff e Sandell⁽⁵³⁾. As soluções padronizadas foram mantidas em vasilhames especiais de polietileno, com dispositivos para evitar contaminação com o CO_2 atmosférico.

Soluções de HCl $\approx 0,1$ M foram feitas com o reagente concentrado RPE da Carlo Erba e padronizadas com carbonato de sódio padrão acidimétrico da Fisher.

KCl PA da Merck foi utilizado: 1) para ajustar a força iônica das soluções tituladas e do titulante; 2) em solução saturada, para formar a ponte salina das celas eletroquímicas.

III.2.2. Tampões NBS

Preparados segundo orientações de Bates⁽³⁹⁾.

- Tampão Biftalato - a partir do $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ da Fisher.
- Tampão Fosfato - preparado com KH_2PO_4 padrão primário da Fisher e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ PA da Qeel.
- Tampão Bórax - a partir do $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ RPE da Carlo Erba.

III.2.3. Aminoácido e Proteínas

- L(+) Monocloridrato de Histidina, RPE da Carlo Erba.
- Lisozima da Clara de Ovo da Aldrich Chemical Co., lote nº 12567.
- Ovalbumina grau V da Sigma Chemical Co., livre de sal, lote 108C-8135.
- Proteína de Bence Jones (JJO) λ . Isolada da urina de paciente portador de mieloma múltiplo, purificada, tipificada quimicamente e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Benedito Oliveira e sua equipe, do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Foram preparadas soluções padrões de Lisozima e Histidina. Alíquotas dessas soluções foram tomadas para análise.

Com a proteína de Bence Jones, para aproveitar ao máximo o material disponível, a quantidade de proteína requerida em cada titulação foi pesada com precisão de 0,01 mg, transferida para a cela de titulação e diluída com o volume apropriado de solução acidificada de KCl ou de uréia contendo KCl, conforme o tipo de experiência a ser realizada.

Com a Ovalbumina, devido a problemas de solubilidade, foi preparada uma solução mais concentrada que a necessária. Essa solução foi filtrada através de cadinho de vidro sinterizado, o filtrado foi então usado 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 peso

constante (6,23).

Todas as soluções foram preparadas, utilizando-se água destilada de um destilador de vidro ou água bi-destilada, se a água destilada foi obtida de um destilador metálico. Antes de preparar as soluções, a água destilada era fervida por alguns minutos para expulsar CO_2 e resfriada até temperatura ambiente em recipiente fechado. As soluções estoque foram conservadas em refrigerador.

III.2.4. Soluções de Uréia (NH_2CONH_2)

Soluções de Uréia PA da Merck foram utilizadas para desnaturar a proteína de Bence Jones. Nas demais experiências com uréia, usou-se Uréia Ultra Pura da Schwarz/Mann.

As soluções de uréia decompõem-se lentamente à temperatura ambiente, formando cianato de amônio (28,30,33). Como se trata de uma impureza titulável por ácido ou base, é costume preparar as soluções de uréia momentos antes de serem utilizadas, a fim de que sua decomposição seja mínima. Mesmo em soluções preparadas com reagentes purificados, é possível detectar sua presença em níveis superiores a 10^{-6} mol/mol de uréia (25,30).

Com o procedimento utilizado neste trabalho, nas soluções de uréia utilizadas, foram identificadas duas espécies tituláveis: uma, em menor quantidade, próxima de pH 7 e outra na região alcalina. Na tabela 4, são apresentadas as concentrações das impurezas tituláveis nas duas marcas de uréia utilizadas.

As precisões desses resultados e de todos os outros apre-

sentados neste trabalho estão representadas pelo desvio médio absoluto. Como vários resultados que serão apresentados são a média de apenas 3 determinações, seria incorreto exprimir a precisão como estimativa do desvio padrão. Para uniformizar a representação, mesmo resultados que representam a média de mais de cinco valores terão suas precisões definidas pelo desvio médio absoluto.

Tab. 4. Concentrações das Impurezas Tituláveis nas Soluções de Uréia Utilizadas

| Procedência da Uréia | mol _{impureza} /mol _{uréia} | |
|---------------------------|---|------------------------------------|
| | Impureza I | Impureza II |
| Merck ^a | $(2,5_7 \pm 0,7_5) \times 10^{-6}$ | $(3,6_1 \pm 0,4_7) \times 10^{-5}$ |
| Schwarz/Mann ^b | $(5,7 \pm 1,7) \times 10^{-6}$ | $(7,0_2 \pm 0,4_2) \times 10^{-5}$ |

a- Média de 3 determinações; b- Média de 8 determinações

Na tabela 5, são apresentados os valores de K_a (em termos de concentração) das impurezas tituláveis nas soluções de uréia, nas várias concentrações empregadas.

Os produtos finais da decomposição da uréia em solução ácida são CO_2 e NH_4^+ ⁽⁵⁴⁾. O pK_a da primeira impureza na tabela 5 (6,7-6,94) assemelha-se com o pK_a da primeira dissociação do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3$ ($\text{pK}_a=6,35$ em água)⁽⁵⁵⁾, aceitando-se a tendência quase geral de maiores pK_a s em uréia. Entretanto, Tahin⁽²⁹⁾ encontrou um valor um pouco menor em uréia 5 M (6,20 a 30°C) que em água. Além disso, o fato de não se ter conseguido

Tab. 5. Valores de K_a das Impurezas Tituláveis nas Soluções de Uréia

| [uréia] (mol/l) | Impureza I | | Impureza II | |
|---------------------|------------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| | K_a | pK_a | K_a | pK_a |
| 9,10 ^{a,c} | $(1,3_8 \pm 0,5_3) \times 10^{-7}$ | 6,86 | $(2,9_9 \pm 0,2_7) \times 10^{-10}$ | 9,52 |
| 8,00 ^{b,d} | $(1,1_5 \pm 0,1_4) \times 10^{-7}$ | 6,94 | $(3,4_2 \pm 0,1_0) \times 10^{-10}$ | 9,47 |
| 9,30 ^{b,d} | $(2,2 \pm 1,7) \times 10^{-7}$ | 6,7 | $(3,2_9 \pm 0,2_8) \times 10^{-10}$ | 9,48 |

a- Uréia Merck; b- Uréia Schwarz/Mann; c- Média de 3 determinações; d- Média de 4 determinações

neste trabalho detectar a segunda etapa da dissociação $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3$ deixa dúvidas quanto à identificação da primeira impureza.

O pK_a da segunda impureza (9,47-9,52) assemelha-se bastante com o pK do íon NH_4^+ em água (9,26)⁽⁵⁵⁾. O trabalho de Bull e colaboradores⁽²⁸⁾ sugere que o pK desse íon é maior em uréia que em água, o que reforça a identificação da segunda impureza.

Foram feitas várias tentativas para purificar a uréia, utilizando-se 3 procedimentos diferentes^(25,27,28). Nenhuma delas, porém, foi bem sucedida. Isso porque o procedimento de titulação potenciométrica utilizado neste trabalho exige excesso de ácido forte no meio, mas a decomposição da uréia é favorecida em meio ácido e a solução de uréia tem que ficar em contato com o ácido pelo menos o tempo necessário para que os eletrodos atinjam o equilíbrio, que é de mais ou menos 30 minutos. Dessa maneira, os resultados obtidos com o reagente purificado

não foram muito melhores que os com o reagente não purificado. Assim, a uréia foi utilizada sem purificação. O volume referente à titulação de cada impureza foi subtraído, na região de pH em que a mesma é titulada junto com grupos da proteína.

Conforme se vê na tabela 4, a concentração de impurezas tituláveis da uréia PA da Merck é quase duas vezes menor que a da uréia Ultra Pura da Schwarz/Mann. Infelizmente, porém, a quantidade de uréia Merck disponível no laboratório esgotou-se com as primeiras experiências, de modo que a maioria das desnaturações foram feitas com o reagente da Schwarz/Mann.

III.3. PROCEDIMENTOS

Este trabalho concentra-se mais em titulações de proteínas desnaturadas com soluções concentradas de uréia. No caso da proteína de Bence Jones (JJO), porém foram feitas titulações da proteína também em meio aquoso. Todas as titulações foram realizadas em meio iônico constante de KCl 0,10 M, com agitação a 25,0°C, sob atmosfera de nitrogênio.

III.3.1. Titulações da Proteína em KCl 0,10 M

A calibração do eletrodo combinado foi feita com tampão biftalato (pH=4,008), tampão fosfato (pH=6,865) e tampão bórax (pH=9,180) ⁽³⁹⁾. Foi adicionado à solução de proteína volume conhecido de solução padrão de HCl, para deixar todos os grupos ionizáveis na forma ácida e ainda, ficar em excesso na solu-

ção. A força iônica foi ajustada com solução de KCl e, após os eletrodos fornecerem leitura constante no medidor, a titulação foi realizada com adições de solução padrão de NaOH em KCl 0,10 M. O pH foi anotado após cada adição.

Admitindo-se que nessas condições a proteína não interfere na força iônica da solução⁽¹⁰⁾, o pH medido pode ser relacionado com a atividade do íon hidrogênio. A concentração do íon hidrogênio foi calculada, dividindo-se sua atividade pelo coeficiente de atividade dado pela equação estendida de Debye-Hückel.

III.3.2. Titulações da Proteína Desnaturada em Solução de Uréia

Exceto pela calibração dos eletrodos e pela presença da uréia, a titulação da proteína desnaturada foi realizada de maneira semelhante à descrita acima. A titulação só era iniciada após decorrido o tempo necessário para a desnaturação da proteína. A f.e.m. era anotada após cada adição do titulante.

Em algumas titulações, utilizou-se solução de NaOH=0,1 M. Na maioria delas, contudo, empregou-se solução \approx 1 M, pois um dos objetivos do trabalho era investigar a extensão da contribuição da diluição do meio parcialmente aquoso, provocada pela adição do titulante aquoso. Titulações potenciométricas em soluções concentradas de uréia, que foram realizadas neste laboratório, acusaram variações consideráveis no potencial de junção líquida, durante as titulações⁽²³⁾. Nessas titulações, soluções titulantes de NaOH 0,1 M eram normalmente empregadas.

III.3.2.1. Equilíbrio Ácido-Base em Soluções de Uréia

A Fig. 5 mostra curvas de titulação de HCl em solução de KCl 0,10 M e em solução simultaneamente 9,10 M em uréia e 0,10 M em KCl.

Em uréia, o ramo ácido da curva é acentuadamente deslocado para valores menores de f.e.m., devido à fraca basicidade da uréia. Na região alcalina, o deslocamento é bem menor e é atribuído ao efeito da uréia sobre a dissociação da água (25, 56).

Na presença de ácido clorídrico, a uréia (U) se protona, formando a espécie UH^+ , de acordo com a reação (25,30):



A constante de dissociação da espécie UH^+ (K_{UH^+}) em termos de concentração é:

$$K_{\text{UH}^+} = \frac{[\text{U}][\text{H}^+]}{[\text{UH}^+]} \quad (12)$$

A concentração analítica de HCl (C_{HCl}) na solução é dada por:

$$C_{\text{HCl}} = [\text{H}^+] + [\text{UH}^+] \quad (13)$$

Tomando-se o valor de $[\text{UH}^+]$ da equação 12 e substituindo-o em 13, chega-se à equação que relaciona a concentração do íon hidrogênio com a concentração analítica do HCl, em soluções de

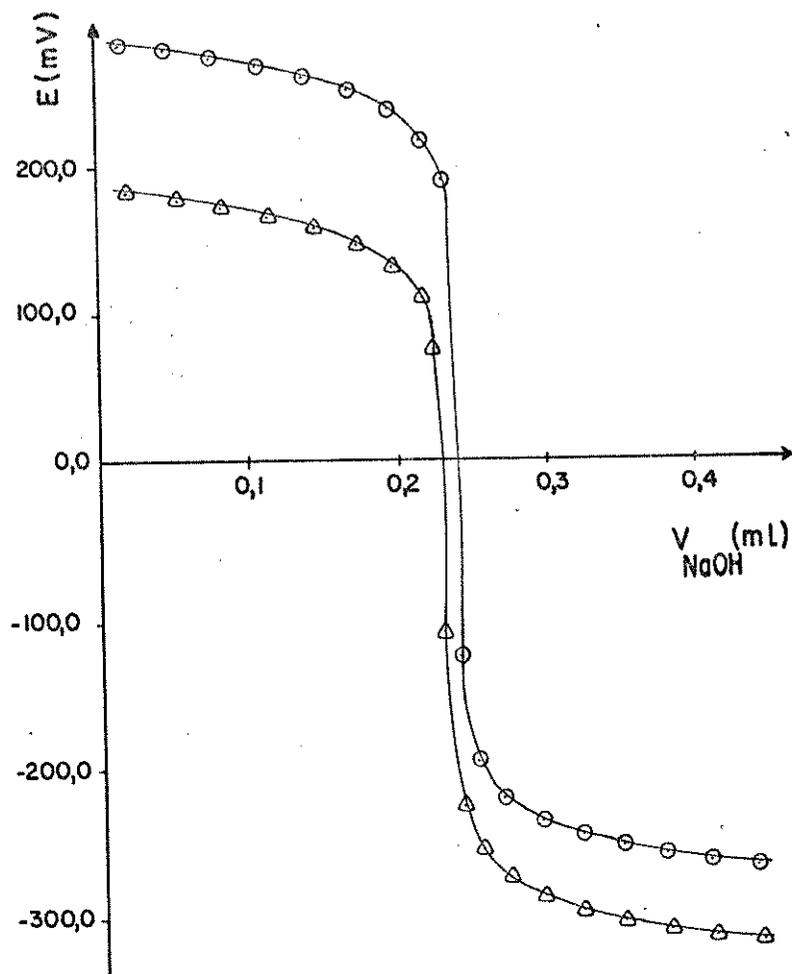


Fig. 5. Curvas de titulação de solução de $\text{HCl } 7,157 \times 10^{-3} \text{ M}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ M}$ (O) e em solução de uréia $9,10 \text{ M}$ + $\text{KCl } 0,10 \text{ M}$ (Δ), com solução de $\text{NaOH } 0,1223 \text{ M}$.

uréia⁽²³⁾:

$$[\text{H}^+] = \frac{C_{\text{HCl}}}{\left(1 + \frac{[\text{U}]}{K_{\text{UH}^+}}\right)} \quad (14)$$

ou:

$$C_{\text{HCl}} = [\text{H}^+] \left(1 + \frac{[\text{U}]}{K_{\text{UH}^+}} \right) \quad (15)$$

III.3.2.2. Calibração dos Eletrodos em Solução de Uréia

Os eletrodos foram calibrados através da titulação de uma solução de HCl de concentração analítica conhecida em solução de uréia, com solução padrão de NaOH. Essa solução apresentava a mesma concentração inicial de uréia e mesma força iônica da solução de proteína. Após cada adição do titulante, a concentração do íon hidrogênio foi calculada com a equação 18, que é deduzida da equação 14 pelas seguintes substituições:

$$C_{\text{HCl}} = \frac{(V_e - V) C_B}{V_o + V} \quad (16)$$

$$[\text{U}] \cong C_U = \frac{C_{U_o} V_o}{V_o + V} \quad (17)$$

Resultando em:

$$[\text{H}^+] = \frac{(V_e - V) C_B K_{\text{UH}^+}}{(V_o + V) K_{\text{UH}^+} + C_{U_o} V_o} \quad (18)$$

nas quais:

V_e = volume de equivalência da titulação;

V = volume de titulante adicionado;

C_{U_o} = concentração analítica inicial da solução de uréia

V_o = volume inicial da solução

C_B = concentração analítica da solução de NaOH

Antes de se chegar ao valor de $[H^+]$, é necessário que se conheçam os valores de V_e e K_{UH^+} .

III.3.2.2.1. Determinação do Volume de Equivalência

O volume de equivalência da titulação de calibração foi determinado pelo Método de Gran⁽⁵⁷⁾, utilizando-se as seguintes Funções de Gran (FG)⁽²³⁾:

Antes do Ponto de Equivalência:

$$FG = 10^{E/59,16} \quad (19)$$

Após o Ponto de Equivalência:

$$FG = (V_o + V) 10^{-E/59,16} \quad (20)$$

onde E é a f.e.m. (em mV), medida após adição de V ml do titulante, e 59,16 é o valor de $(RT \ln 10/n F)$ a 25°C.

O gráfico das Funções de Gran versus o volume do titulante são duas retas que cortam o eixo x no ponto correspondente ao Volume de Equivalência da titulação.

Nas figuras 6 e 7 são apresentadas a determinação do volume de equivalência para duas titulações de HCl em soluções de uréia 8,00 M e força iônica 0,10 M. A titulação representada na Fig. 7 foi feita com solução de NaOH com concentração aproximadamente dez vezes maior que a do titulante utilizado com a solução da Fig. 6. A utilização de solução titulante mais concentrada implica em adição de volume menores. Dessa forma, o meio de titulação é menos alterado.

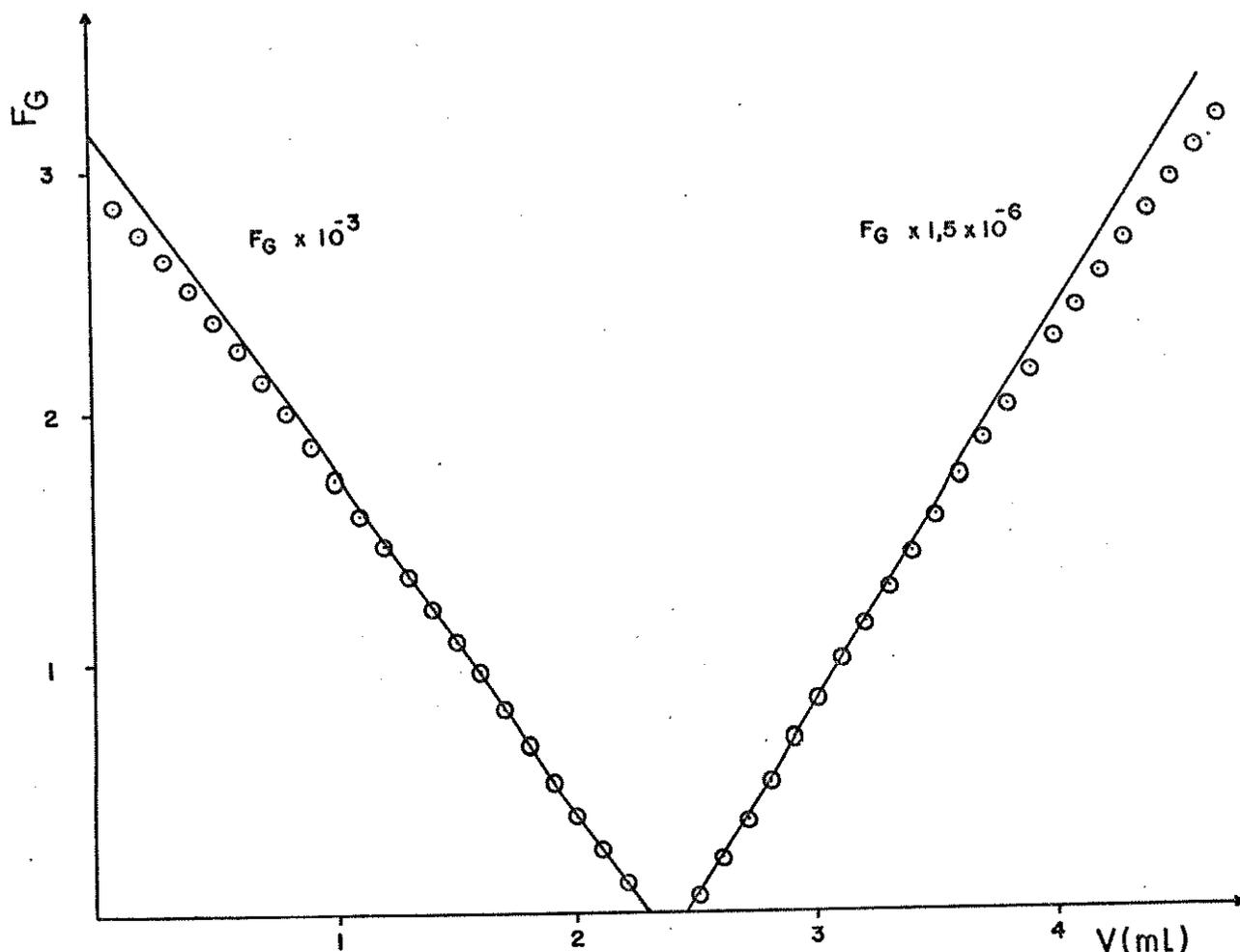


Fig. 6. Funções de Gran para a titulação de $\text{HCl } 7,256 \times 10^{-3} \text{ M}$ em uréia $8,00 \text{ M}$ e $\text{KCl } 0,10 \text{ M}$ com $\text{NaOH } 0,1181 \text{ M}$.

Na Fig. 6, observa-se que a relação entre as Funções de Gran e o volume afasta-se da linearidade, quando a concentração de H^+ ou OH^- é alta. Por isso, os volumes de equivalência são calculados (por regressão linear) com os pontos experimentais de uma região limitada da curva de titulação.

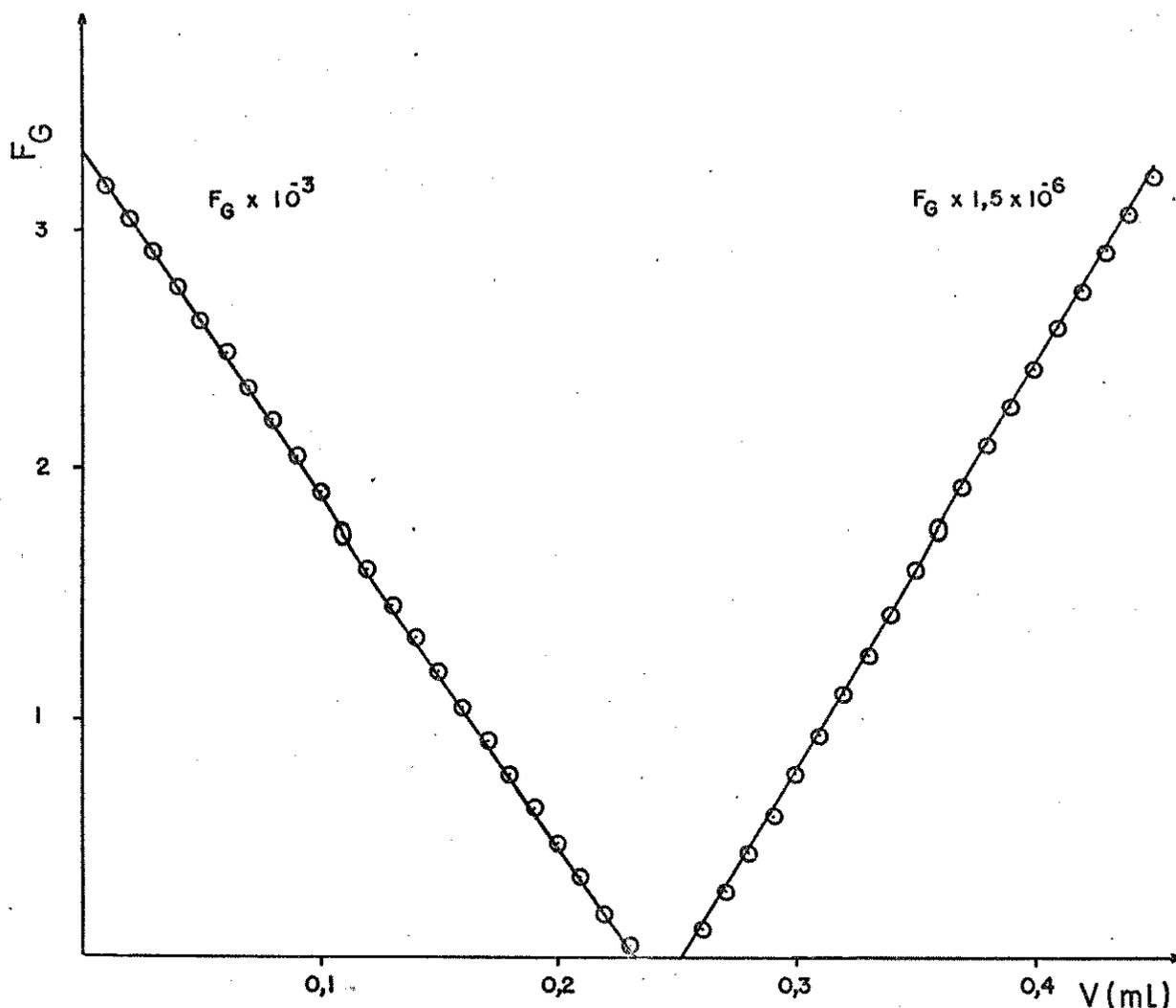


Fig. 7. Funções de Gran para a titulação de $\text{HCl } 7,256 \times 10^{-3} \text{ M}$ em uréia $8,00 \text{ M}$, força iônica $0,10 \text{ M}$, com $\text{NaOH } 1,139 \text{ M}$.

Esse problema deixa de existir com o titulante mais concentrado. As Funções de Gran mantêm relação linear com o volume do titulante em toda a faixa de titulação. Os pontos experimentais de qualquer região da titulação podem ser usados para a determinação dos volumes de equivalência, dando, portanto, mais confiança aos resultados.

Fala-se em volumes de equivalência, pois, como se vê nas Figuras 6 e 7, em soluções de uréia as duas retas não interceptam o eixo x no mesmo ponto, devido à presença das impurezas já citadas. Por isso, têm-se dois volumes de equivalência diferentes: V_{e_a} e V_{e_b} correspondentes às regiões ácida e alcalina. Tais volumes definem o encerramento da titulação do ácido forte e o início da existência de OH^- em excesso, respectivamente.

III.3.2.2.2. Determinação da Constante de Dissociação da Ureia Protonada (K_{UH^+})

O procedimento utilizado para determinar K_{UH^+} foi descrito anteriormente⁽²³⁾. O valor de K_{UH^+} para soluções de uréia 8,0 M calculado por Vasconcelos⁽²³⁾ foi também usado neste trabalho. Foi feita a determinação de K_{UH^+} para soluções de uréia 9,10 M. O mesmo valor foi usado com as soluções 9,30 M. O valor encontrado é apresentado na tabela 6, junto com outros valores da literatura.

Tab. 6. Valores de K_{UH^+}

| Ureia (mol/l) | K_{UH^+} |
|------------------|---------------------------------------|
| 7,0 | 0,24 ^a |
| 8,0 | 0,22 ^a ; 0,23 ^b |
| 9,10 | 0,21 ^c |

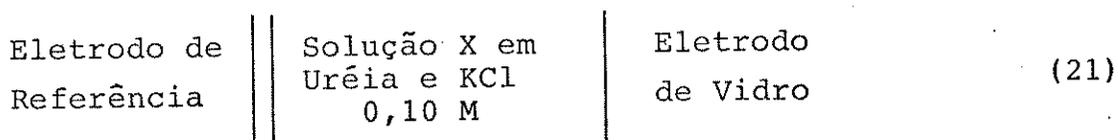
a- Valores de Levy⁽²⁵⁾ a 20°C;

b- Valor de Vasconcelos⁽²³⁾ a 25°C

c- Valor deste trabalho a 25°C

III.3.2.2.3. Relação entre Concentração do Íon Hidrogênio e F.E.M.

A cela utilizada nas titulações potenciométricas pode ser representada como:



A barra dupla representa uma ponte salina de KCl saturado.

A relação entre a força eletromotriz da cela e a concentração do íon hidrogênio, comumente empregada em titulações em meio iônico constante, é dada pela equação (43,46,48):

$$E = E'_{\text{Oa}} + 59,16 \log[\text{H}^+] + E_j \quad (22)$$

a 25°C, onde:

E'_{Oa} = constante que inclui os potenciais padrões dos eletrodos e contribuições dos coeficientes de atividade e do potencial de junção independentes da acidez.

E_j = representa a parte do potencial de junção líquida e dos coeficientes de atividade que sejam dependentes da acidez.

$$E_j = j_{\text{H}}[\text{H}^+] + j_{\text{OH}}[\text{OH}^-] \quad (23)$$

j_{H} e j_{OH} são constantes características do meio.

No ramo ácido da curva, a $[\text{OH}^-]$ pode ser ignorada e a equação 22 pode ser escrita:

$$E = E'_{\text{Oa}} + 59,16 \log[\text{H}^+] + j_{\text{H}}[\text{H}^+] \quad (24)$$

Os valores de E'_{Oa} e j_{H} são calculados com a Eq. 24 na forma:

$$E - 59,16 \log[\text{H}^+] = E'_{\text{Oa}} + j_{\text{H}}[\text{H}^+] \quad (25)$$

O gráfico do lado esquerdo da equação versus a $[\text{H}^+]$ é uma reta com intercessão a $[\text{H}^+] = 0$ em E'_{Oa} e inclinação igual a j_{H} .

Na região alcalina, a equação de Nernst assume a forma:

$$E = E'_{\text{Ob}} - 59,16 \log[\text{OH}^-] + j_{\text{OH}}[\text{OH}^-] \quad (26)$$

Para os pontos da região básica da curva, o gráfico de $E + 59,16 \log[\text{OH}^-]$ versus a $[\text{OH}^-]$ dará uma reta com intercessão a $[\text{OH}^-]=0$ igual a E'_{Ob} e inclinação igual a j_{OH} .

Foi realizada uma investigação a respeito da adequação dessas equações, quando esse procedimento é empregado para a definição da $[\text{H}^+]$ em soluções de uréia, a partir da f.e.m. medida.

Este estudo foi feito num sistema contendo solução de HCl, de concentração analítica conhecida, em solução de uréia 8,00 M e força iônica 0,10 M. Outra solução de uréia 7,00 M sob a mesma força iônica e contendo HCl na mesma concentração

analítica foi adicionada em quantidades medidas. A f.e.m. foi anotada após cada adição. Nessas condições, como C_{HCl} foi mantida constante e $[U]$ diminuída gradativamente, a consequência foi que $[\text{H}^+]$ também variou. Assim, a variação na f.e.m. pode ser atribuída à variação em $[\text{H}^+]$ em decorrência da variação em $[U]$ e também devido a outros fatores, tais como variações no potencial de junção e nos coeficientes de atividade.

Na tabela 7, são apresentados os resultados deste estudo. Os valores de $[\text{H}^+]$ da coluna A foram calculados a partir da concentração analítica do HCl, com a Eq. 14. Na coluna B, os valores de $(E'_0 + E_j)$ foram calculados com a Eq. 25. As figuras 8 e 9 apresentam a variação de $(E'_0 + E_j)$ em função da $[\text{H}^+]$ e

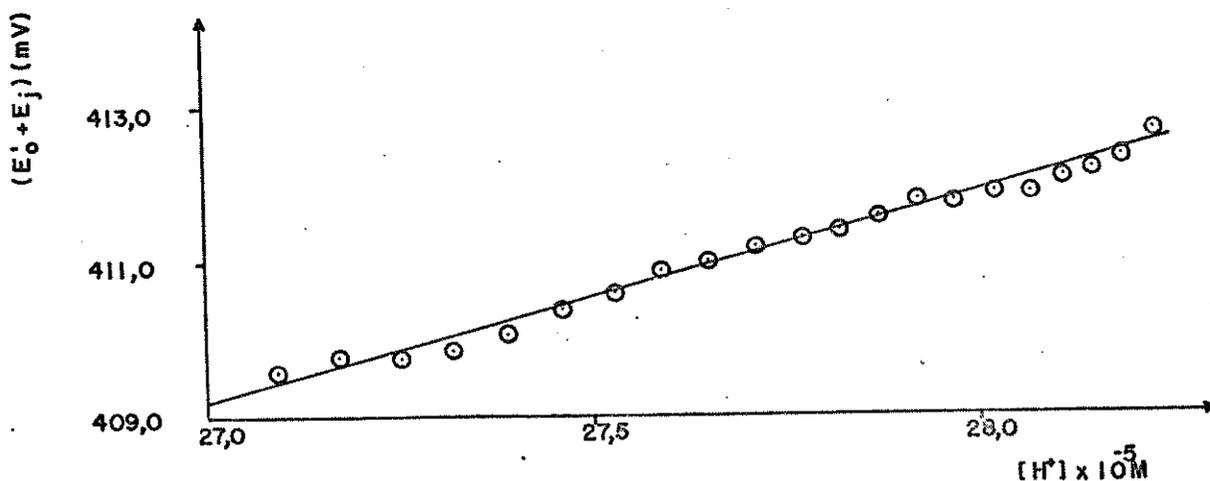


Fig. 8. Variação em $(E'_0 + E_j)$ com $[\text{H}^+]$

$[U]$ respectivamente. Nessas figuras, observa-se que a soma $(E'_0 + E_j)$ aumenta com a diluição da solução de uréia e com o aumento na $[\text{H}^+]$ causado por essa diluição.

Tab. 7. Cálculos de E'_O , j_H e $[H^+]$ em uma solução de uréia 8,00 M, contendo KCl 0,10 M e HCl $9,694 \times 10^{-3}$ M, diluída gradativamente com solução de uréia 7,00 M, contendo KCl e HCl nas mesmas concentrações acima.

A. $[H^+]$ - calculada com Eq. 14

B. $(E'_O + E'_j) = E - 59,16 \log [H^+]$

C. $E'_j = (E'_O + E'_j) - E'_O$ $E'_O = 336,2$ mV

$$\frac{E - E'_O - E'_j}{59,16}$$

D. $[H^+]_{\text{calc.}} = 10^{\frac{E - E'_O - E'_j}{59,16}}$

E. $(E''_O + E'_j) = E - 59,16 \log C_{\text{HCl}}$

F. $E'_j = (E''_O + E'_j) - E''_O$ $E''_O = 220,2$ mV

G. $[H^+]_{\text{calc.}} = 10^Y$ $(E - E''_O - 59,16 \log(1 + \frac{[U]}{K_{\text{UH}^+}})) - E'_j$

$$Y = \frac{E - E''_O - 59,16 \log(1 + \frac{[U]}{K_{\text{UH}^+}}) - E'_j}{59,16}$$

$$59,16$$

| | A | B | C | D | E | F | G | | |
|--------|--------|-----------|--------------------------|--------------------|-------------|--|---------------------|-------------|---|
| V (ml) | E (mV) | U (mol/l) | $[H^+] \times 10^{-4}$ M | $E'_O + E'_j$ (mV) | E'_j (mV) | $[H^+]_{\text{calc}} \times 10^{-4}$ M | $E''_O + E'_j$ (mV) | E'_j (mV) | $[H^+]_{\text{calc.}} \times 10^{-4}$ M |
| 0,000 | 198,6 | 8,000 | 2,709 | 409,6 | 73,4 | 2,713 | 317,7 | 97,5 | 2,709 |
| 0,100 | 198,8 | 7,976 | 2,717 | 409,6 | 73,4 | 2,734 | 317,9 | 97,7 | 2,722 |
| 0,200 | 198,9 | 7,952 | 2,725 | 409,8 | 73,6 | 2,723 | 318,0 | 97,8 | 2,728 |
| 0,300 | 199,1 | 7,930 | 2,732 | 409,9 | 73,7 | 2,734 | 318,2 | 98,0 | 2,734 |
| 0,400 | 199,4 | 7,909 | 2,739 | 410,2 | 74,0 | 2,734 | 318,5 | 98,3 | 2,740 |
| 0,500 | 199,7 | 7,889 | 2,746 | 410,4 | 74,2 | 2,745 | 318,8 | 98,6 | 2,747 |
| 0,600 | 200,0 | 7,870 | 2,753 | 410,6 | 74,4 | 2,755 | 319,1 | 98,9 | 2,753 |
| 0,700 | 200,3 | 7,851 | 2,759 | 410,9 | 74,7 | 2,755 | 319,4 | 99,2 | 2,759 |
| 0,800 | 200,5 | 7,833 | 2,765 | 411,0 | 74,8 | 2,766 | 319,6 | 99,4 | 2,766 |
| 0,900 | 200,7 | 7,816 | 2,771 | 411,2 | 75,0 | 2,766 | 319,8 | 99,6 | 2,772 |
| 1,000 | 200,9 | 7,800 | 2,777 | 411,3 | 75,1 | 2,777 | 320,0 | 99,8 | 2,779 |
| 1,100 | 201,1 | 7,784 | 2,782 | 411,5 | 75,3 | 2,777 | 320,2 | 100,0 | 2,785 |
| 1,201 | 201,3 | 7,769 | 2,787 | 411,6 | 75,4 | 2,788 | 320,4 | 100,2 | 2,791 |
| 1,300 | 201,5 | 7,755 | 2,792 | 411,8 | 75,6 | 2,788 | 320,6 | 100,4 | 2,791 |
| 1,400 | 201,6 | 7,741 | 2,797 | 411,8 | 75,6 | 2,798 | 320,7 | 100,5 | 2,798 |
| 1,500 | 201,7 | 7,727 | 2,802 | 411,9 | 75,7 | 2,798 | 320,8 | 100,6 | 2,804 |
| 1,600 | 201,8 | 7,714 | 2,807 | 411,9 | 75,7 | 2,809 | 320,9 | 100,7 | 2,811 |
| 1,701 | 202,0 | 7,702 | 2,811 | 412,1 | 75,9 | 2,809 | 321,1 | 100,9 | 2,811 |
| 1,800 | 202,2 | 7,690 | 2,815 | 412,2 | 76,0 | 2,820 | 321,3 | 101,1 | 2,817 |
| 1,901 | 202,4 | 7,678 | 2,819 | 412,4 | 76,2 | 2,820 | 321,5 | 101,3 | 2,824 |
| 2,000 | 202,7 | 7,667 | 2,823 | 412,7 | 76,5 | 2,820 | 321,8 | 101,6 | 2,824 |

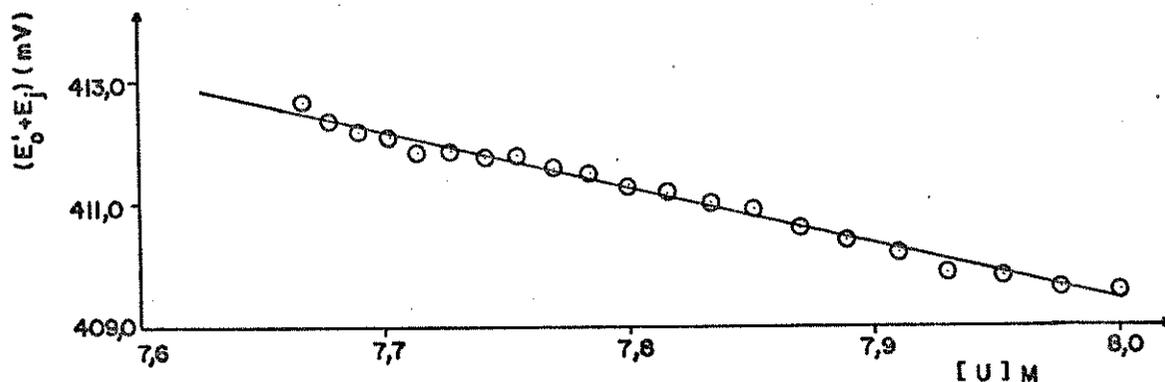


Fig. 9. Variação em $(E'_O + E_j)$ com $[U]$

Aplicando-se regressão linear aos dados da Fig. 8, a reta obtida possui inclinação (j_H) de $27,03 \times 10^4$ mV/M e intercessão com a ordenada (E'_{Oa}) igual a 336,2 mV. Esse valor foi usado para calcular E_j (coluna C). Finalmente, a $[H^+]_{calc.}$ foi determinada com a Eq. 27.

$$[H^+] = 10^{(E - E'_O - E_j) / 59,16} \quad (27)$$

A concordância entre os valores das colunas A e D é muito boa na grande maioria dos pontos. Somente um dos resultados (segunda linha) apresentou desvio absoluto de $1,7 \times 10^{-6}$ M. Com os demais valores, o desvio absoluto foi sempre $\leq 0,5 \times 10^{-6}$ M.

Uma experiência semelhante foi feita, partindo-se de solução de uréia 9,00 M e diluindo-a com uréia 7,00 M, mantendo-se a concentração analítica do HCl e a força iônica constantes.

O valor de E'_o obtido com a solução 9,00 M foi maior que o da solução 8,00 M. Isso indica que E'_o é dependente da concentração da uréia.

Quando a $[H^+]$ do termo logarítmico da Eq. 24 é substituída pela Eq. 14, a Eq. 24 toma a forma seguinte:

$$E = E'_{oa} + 59,16 \log \frac{C_{HCl}}{1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}}} + j_H [H^+] \quad (28)$$

ou,

$$E = E'_{oa} - 59,16 \log \left(1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}}\right) + 59,16 \log C_{HCl} + j_H [H^+] \quad (29)$$

Fazendo-se:

$$E'_{oa} - 59,16 \log \left(1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}}\right) = E''_{oa} \quad (30)$$

pretende-se corrigir as variações em E'_o causadas por mudanças na concentração da uréia. Em conseqüência, a equação 28 assume a forma:

$$E = E''_{oa} + 59,16 \log C_{HCl} + j'_H [H^+] \quad (31)$$

Construindo-se o gráfico de $E - 59,16 \log C_{HCl}$ versus $[H^+]$, obtém-se uma reta com intercessão a $[H^+]=0$ igual a E''_{oa} e inclinação igual a j'_H . A coluna E da tabela 7 apresenta os valores de $E - 59,16 \log C_{HCl} = E''_{oa} + E'_j$. Esses valores são colocados em função da $[H^+]$ na Fig. 10.

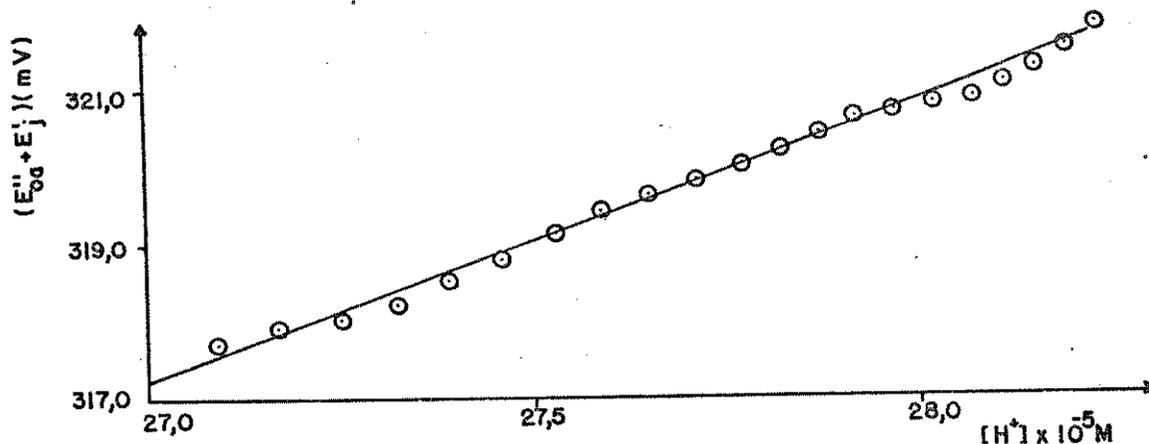


Fig. 10. Variação de $(E''_{Oa} + E'_j)$ com $[H^+]$

j'_H ($35,94 \times 10^4$ mV/M) é maior que j_H e conseqüentemente E'_j é maior que E_j .

O valor de E''_{Oa} (220,2 mV) foi utilizado para calcular os valores de E'_j (coluna F). Posteriormente, a $[H^+]$ foi calculada com a equação:

$$E = E''_{Oa} + 59,16 \log\left(1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}}\right) + 59,16 \log [H^+] + E'_j \quad (32)$$

rearranjada para:

$$[H^+] = 10^{(E - E''_{Oa} - 59,16 \log(1 + ([U]/K_{UH^+})) - E'_j) / 59,16} \quad (33)$$

Na equação 32, $E''_{Oa} + 59,16 \log(1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}})$ é igual a E'_{Oa} . A equação é semelhante à equação 22 com a diferença que esse E'_{Oa} não é constante, como foi considerado nos cálculos das colunas

B, C e D. A equação 32 permite variações em E'_{Oa} de acordo com variações em $[U]$. Os valores de $[H^+]_{calc.}$ obtidos com a equação 33 (coluna G), são melhores que os obtidos com a equação em que E'_{Oa} é considerado constante. Nenhum dos desvios absolutos foi superior a $0,5 \times 10^{-6}$ M.

Baseados nesses resultados, todos os cálculos de $[H^+]$ em uréia foram feitos com a Eq. 33, utilizando E''_{Oa} e j'_H calculados da maneira acima descrita.

Voltando ao exemplo das titulações de calibração que estavam sendo discutidas no item anterior, as figuras 11 e 12 apresentam as curvas obtidas pela representação gráfica de $E - 59,16 \log C_{HCl}$ versus $[H^+]$ (parte superior) e $E + 59,16 \log [OH^-]$ versus $[OH^-]$ (parte inferior) da titulação de HCl em solução de uréia 8,00 M e 9,00 M respectivamente, sob força iônica 0,10 M, com solução padrão de NaOH $\approx 0,1$ ou 1 M, sob a mesma força iônica.

Nas titulações feitas com titulantes $\approx 0,1$ M (círculos claros), $(E''_{Oa} + E_j)$ aumenta e $(E'_{Ob} + E_j)$ diminui acentuadamente com a diminuição nas concentrações de H^+ e OH^- respectivamente. Nessas titulações, o efeito em $(E''_{Oa} + E_j)$ mostra-se exatamente o contrário do observado com a experiência de diluição de uréia recém-discutida, em que $(E''_{Oa} + E_j)$ ou $(E'_{Oa} + E_j)$ diminui com a diminuição em $[H^+]$ - apesar da pequena variação em $[H^+]$, a variação em $(E''_{Oa} + E'_j)$ é considerável - e aumenta com a diluição da uréia (figuras 8-10). Nas titulações das figuras 11 e 12 a diminuição em $[H^+]$ é muito mais acentuada. Mas mesmo assim, $(E''_{Oa} + E'_j)$ comporta-se diferentemente. Ocorre que essas titulações são também acompanhadas por diluição das soluções de

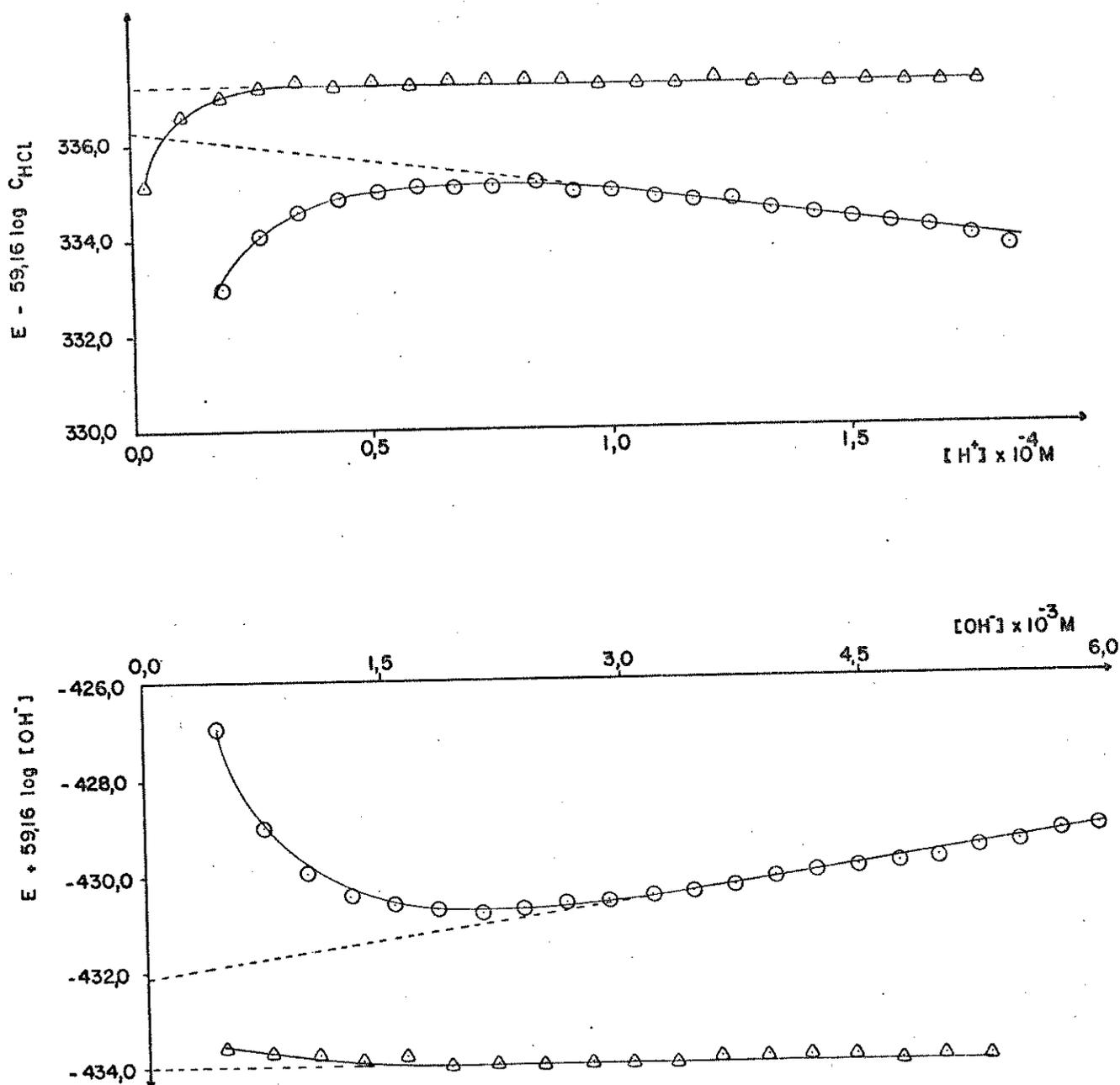


Fig. 11. Determinação de E''_{Oa} e j'_H (curvas superiores) e E'_{Ob} e j_{OH} (curvas inferiores), de titulações de HCl $7,256 \times 10^{-3} M$ em uréia $8,00 M$ e força iônica $0,10 M$ com solução de NaOH sob a mesma força iônica, com concentração:

- (○) - $0,1181 M$ ($E''_{Oa} = 336,3 mV$; $j'_H = -12,98 \times 10^3 mV/M$;
 $E'_{Ob} = -432,1 mV$; $j_{OH} = 487,1 mV/M$)
 (△) - $1,139 M$ ($E''_{Oa} = 337,2 mV$; $j'_H = 0,0 mV/M$, $E'_{Ob} = -434,0 mV$;
 $j_{OH} = 0,0 mV/M$)

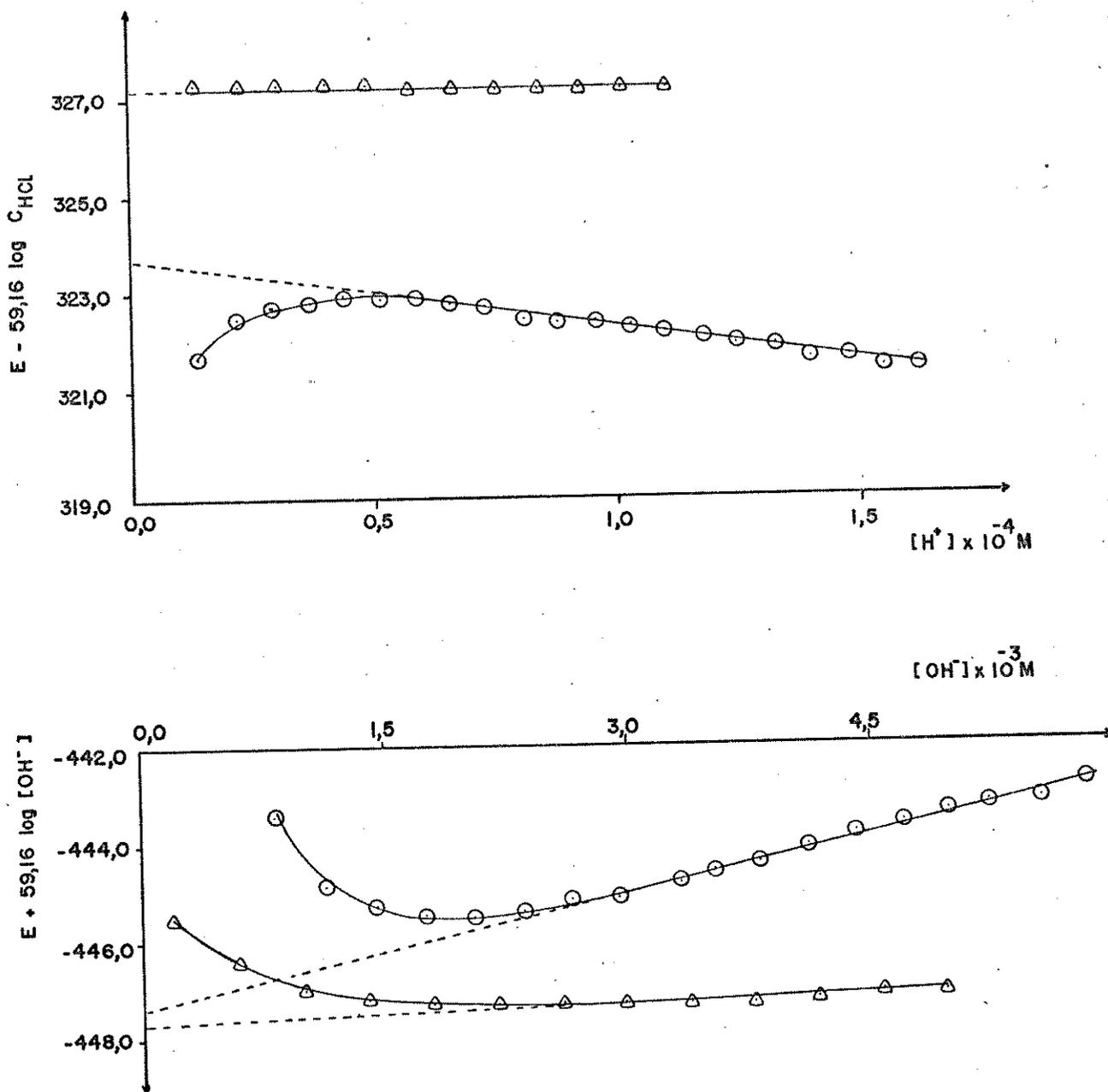


Fig. 12. Determinação de E''_{Oa} e j^H (curvas superiores) e E'_{Ob} e j_{OH} (curvas inferiores), de titulações de HCl em soluções de uréia à força iônica 0,10 M, com soluções de NaOH sob a mesma força iônica.

(\circ) - HCl $7,277 \times 10^{-3} M$ em uréia 9,10 M, titulado com NaOH 0,1312 M. ($E''_{Oa} = 323,7$ mV; $j^H = -13,75 \times 10^3$ mV/M, $E'_{Ob} = -447,4$ mV; $j_{OH} = 783,4$ mV/M).

(Δ) - HCl $6,463 \times 10^{-3} M$ em uréia 9,30 M titulado com NaOH 1,200 M. ($E''_{Oa} = 327,2$ mV; $j^H = 0,0$ mV/M; $E'_{Ob} = -447,7$ mV; $j_{OH} = 123,1$ mV/M).

uréia. Observando-se também por esse lado, a coincidência de comportamentos indica que é a variação na concentração da uréia a responsável pelos altos valores de j_H .

Na titulação de HCl com NaOH $\approx 0,1$ M apresentada na figura 11, a solução de uréia inicialmente 8,00 M passa a ser 7,56 M no ponto de equivalência do HCl e diminui ainda mais na sequência da titulação. A variação de E_j pode ser conseqüência: 1) de variações nos coeficientes de atividade dos íons H^+ e OH^- ; 2) de variações na energia livre de transferência dos íons; 3) de variações no potencial de junção líquida na interface da solução de uréia/KCl saturado, pois todos esses fatores são dependentes da composição do solvente⁽⁴⁹⁾. Identificar a causa da variação de E_j não foi uma das propostas deste trabalho. Neste tipo de investigação importante é saber que E_j' está bem definido pela equação:

$$E_j' = j_H'[H^+] + j_{OH}[OH^-] \quad (34)$$

Quando se comparam as curvas da parte superior ou da parte inferior das figuras 11 ou 12 entre si, confirma-se mais uma vez a importância da variação da concentração da uréia. Com efeito, nas titulações em que foram utilizadas soluções de NaOH ≈ 1 M, $(E_o + E_j)$ não varia com a concentração de H^+ ou OH^- , apesar das variações das concentrações de H^+ e OH^- serem as mesmas das titulações com NaOH $\approx 0,1$ M. A diferença é que, nessas condições, a concentração da uréia é alterada em menor extensão pela adição do titulante, e os fatores que constituem E_j

permanecem praticamente constantes.

Na titulação da Fig. 11 que foi feita com $\text{NaOH} \approx 1 \text{ M}$, a concentração inicial da uréia é $8,00 \text{ M}$, no ponto de equivalência do ácido é $7,95 \text{ M}$. No fim da titulação, quando a $[\text{OH}^-]$ na solução já é superior a $5,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, a concentração da uréia é ainda $7,91 \text{ M}$, ou seja, a diluição da uréia é de apenas 1%. Observa-se, porém, que com solução de $\text{NaOH} \approx 0,1 \text{ M}$, nas mesmas condições iniciais, a diluição é de 10% até atingir o mesmo nível de $[\text{OH}^-]$.

Na titulação feita com $\text{NaOH} \approx 1 \text{ M}$, que está apresentada na Fig. 12, ocorreu variação em $(E'_o + E_j)$ na região alcalina. Essa variação, contudo, foi muito pequena ($j_{\text{OH}} = 123,1 \text{ mV/M}$), quando comparada com o valor da outra titulação no mesmo gráfico ($j_{\text{OH}} \approx 783,4 \text{ mV/M}$). Além do mais, essa variação foi observada em apenas duas das doze titulações feitas com $\text{NaOH} \approx 1 \text{ M}$.

São perfeitamente viáveis as titulações potenciométricas em soluções concentradas de uréia, com soluções de $\text{NaOH} \approx 0,1 \text{ M}$, como as anteriormente feitas neste laboratório, desde que a variação do potencial de junção líquida - que geralmente aparece nessas condições - seja corretamente calculada pelas equações desenvolvidas para tal fim. Mas, para eliminar realmente as causas do aparecimento dessa variação, uma maneira simples e eficaz é utilizar o titulante em concentração dez vezes maior. É claro que surgem algumas desvantagens de ordem prática, tais como maior desgaste do material de vidro, especificamente a micro bureta, e maior dificuldade de manipulação com uma solução de $\text{NaOH} \approx 1 \text{ M}$. Esses problemas, porém, são compensados pela ob-

tenção de uma titulação potenciométrica em uréia, num meio praticamente constante.

III.3.2.2.4. Determinação do Produto Iônico da Água (K_w)

As concentrações dos íons H^+ e OH^- são dadas pelas equações 32 e 26, respectivamente. Como $K_w = [H^+][OH^-]$, a equação 26 pode ser modificada para:

$$E = E'_{ob} - 59,16 \log K_w + 59,16 \log [H^+] + E'_j \quad (35)$$

fazendo-se $[OH^-] = K_w/[H^+]$. Assim as equações 32 e 35 podem ser usadas com a mesma finalidade.

$$E''_{oa} + 59,16 \log \left(1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}}\right) + \log [H^+] + E'_j = E'_{ob} - 59,16 \log K_w + 59,16 \log [H^+] + E'_j \quad (36)$$

O rearranjo dessa equação fornece:

$$pK_w = \frac{E''_{oa} - E'_{ob}}{59,16} + \log \left(1 + \frac{[U]}{K_{UH^+}}\right) \quad (37)$$

O segundo termo do lado direito da equação define a dependência de K_w com a concentração da uréia.

Os valores de K_w determinados dessa maneira para uréia 8,00, 9,10 e 9,30 M são apresentados na tabela 8.

O valor de pK_w em uréia 8,00 M é concordante com os valo-

res calculados por Vasconcelos⁽²³⁾ (14,52-14,58) a essa concentração.

Pôde ser feita uma confirmação definitiva da validade do procedimento empregado para calcular K_w , comparando-se o pK_w obtido da maneira descrita com o valor calculado com o procedimento apresentado por Levy⁽²⁵⁾.

Tab. 8. Valores de K_w a 25°C a Várias Concentrações de Uréia

| Uréia mol/l | K_w | pK_w |
|----------------|---|--------|
| 8,00 | $(2,61_7 \pm 0,04_4)^a \times 10^{-15}$ | 14,58 |
| 9,10 | $(2,1_6 \pm 0,1_5)^b \times 10^{-15}$ | 14,66 |
| 9,30 | $(1,75_4 \pm 0,05_5)^c \times 10^{-15}$ | 14,76 |

a- média de 8 determinações; b- média de 3 determinações; c- média de 4 determinações

Como resultado de sua ampla investigação de medidas de pH em uréia, Levy indica que o pK_w pode ser obtido pela equação:

$$pK_w = 13,90 - 3,25 \log(H_2O), \text{ a } 20^\circ\text{C} \quad (38)$$

onde (H_2O) é o peso da água por litro de solução de uréia.

O valor de pK_w obtido desse modo para uma solução 9,10 M foi 14,63, que se aproxima bastante do valor dado na tabela 8, levando-se em conta as diferentes temperaturas.

III.3.2.2.5. Determinação de pH

Todas as titulações foram realizadas em condições de força iônica constante, de modo a permitirem que o pH calculado seja relacionado com a concentração do íon hidrogênio.

$$\text{pH} = - \log [\text{H}^+] \quad (39)$$

Por sua vez, a concentração do íon hidrogênio, em qualquer ponto da titulação, foi calculada pela equação 33 da forma:

$$[\text{H}^+] = 10^{\frac{(E - E''_{\text{Oa}} - 59,16 \log(1 + ([\text{U}]/K_{\text{UH}^+})) - j_{\text{H}}[\text{H}^+] - j_{\text{OH}}[\text{OH}^-])}{59,16}} \quad (40)$$

E''_{Oa} , j_{H} e j_{OH} são calculados a partir de uma titulação de calibração de HCl em uréia nas mesmas condições da titulação da proteína. O cálculo de pH está já incluído no programa de computador que lineariza a curva de titulação da proteína, e o programa o faz por aproximações sucessivas.

A título de ilustração, os valores de f.e.m. das curvas de titulação já apresentadas na figura 5 foram transformados em pH pelo programa de computador. As curvas de titulação em termos de pH são apresentadas na figura 13. O pH da solução de HCl em uréia 9,10 M e KCl 0,10 M é cerca de 1,66 unidade maior que em solução de KCl 0,10 M.

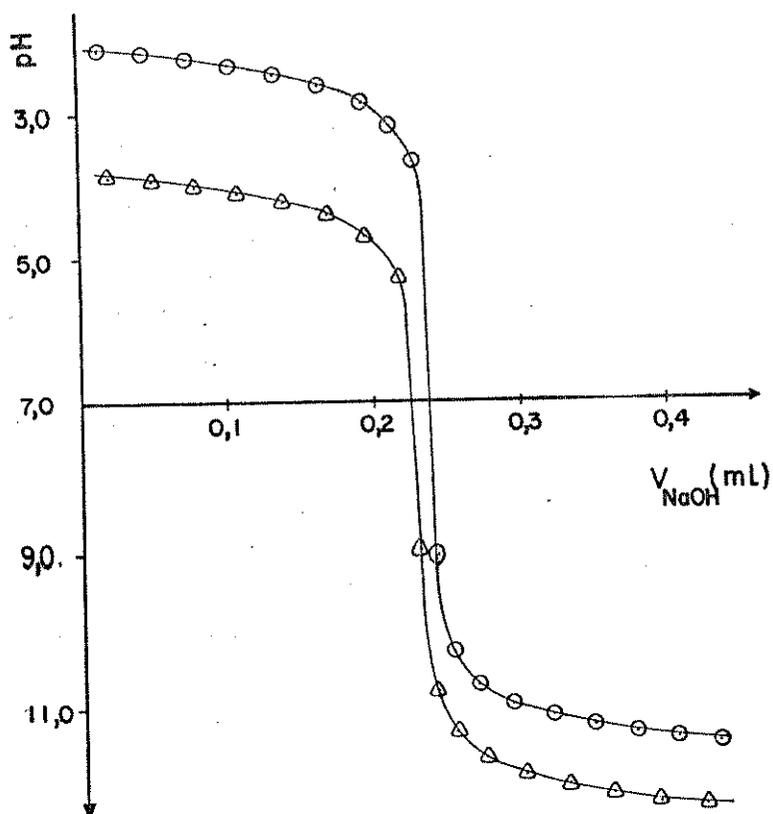


Fig. 13. Curvas de titulação de solução de HCl $7,157 \times 10^{-3}$ M em KCl 0,10 M (O) e em solução de uréia 9,10 M + KCl 0,10 M (Δ), com solução de NaOH 0,1223 M.

III.4. Determinação da Estequiometria e pK_a dos Grupos Tituláveis da Proteína

A titulação da proteína foi feita de modo tal que pode ser considerada como a titulação de uma mistura de ácidos monopróticos: um ácido forte e vários ácidos fracos. Funções de Gran modificadas foram desenvolvidas neste laboratório para

descreverem a titulação de uma mistura de um ácido forte e até cinco ácidos fracos em meio aquoso^(37,52) ou em solução de uréia⁽²³⁾. Essas Funções de Gran (F_{HCl} , F_{HA_1} , F_{HA_2} , F_{HA_3} , F_{HA_4} e F_{HA_5}) são relacionadas linearmente com o volume do titulante. O gráfico de F_{HCl} versus o volume do titulante é uma reta cuja intercessão com a abcissa dá o volume de equivalência do ácido clorídrico. Para os ácidos fracos, o gráfico da função correspondente versus V será também uma reta com inclinação $-K_a$ e intercessão em V igual ao volume de equivalência até aquele ácido.

Inicialmente, todas as titulações de proteínas apresentadas neste trabalho foram resolvidas com os programas PROTE (para titulações da proteína nativa) ou PROTE MODIFICADO (titulações da proteína desnaturada em uréia), já apresentados em trabalhos anteriores do grupo^(23,37,52). Em termos de composição estequiométrica, os resultados para a histidina e ovalbumina foram concordantes com resultados anteriores⁽²³⁾. Para a lisozima em uréia, tais resultados foram concordantes com os encontrados na literatura. Deve-se, porém, frisar que só se conseguiu separar 4 séries de grupos na ovalbumina e na lisozima.

Para a proteína de Bence Jones em uréia, não foi possível separar mais que 3 grupos com o programa PROTE MODIFICADO. O programa não é capaz de separar os grupos fenólicos e ϵ -amino.

As limitações dos programas foram atribuídas às simplificações feitas durante a dedução das Funções de Gran Modificadas, que constam dos programas. Essas simplificações afetam as equações que exprimem a titulação dos grupos mais básicos.

A dedução das funções de Gran modificadas do programa PROTE MODIFICADO foi detalhadamente apresentada no trabalho de Vasconcelos (23). Para se chegar a essas funções, admitiu-se que a hidrólise da espécie resultante da titulação de cada ácido fraco era desprezível. Foram, portanto, utilizadas as seguintes equações aproximadas:

Na obtenção de F_{HA_2}

$$[A_1^-] = C_{HA_1} = \frac{(V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B}{V_0 + V} \quad (41)$$

Na obtenção de F_{HA_3}

$$[A_2^-] = C_{HA_2} = \frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B}{V_0 + V} \quad (42)$$

Na obtenção de F_{HA_4}

$$[A_3] = C_{HA_3^+} = \frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) C_B}{V_0 + V} \quad (43)$$

e na obtenção de F_{HA_5}

$$[A_4] = C_{HA_4^+} = \frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) C_B}{V_0 + V} \quad (44)$$

A fim de se obter maior eficiência do programa na separação dos grupos tituláveis de proteínas, novas Funções de Gran foram deduzidas de tal forma que essas simplificações foram suprimidas. As equações aproximadas 41-44 foram substituídas pelas equações completas correspondentes:

Para F_{HA_2}

$$[A_1^-] = C_{HA_1} - [HA_1] = \frac{(V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B}{V_0 + V} \frac{K_{HA_1}}{K_{HA_1} + [H^+]} \quad (45)$$

Para $F_{HA_3^+}$

$$[A_2^-] = C_{HA_2} - [HA_2] = \frac{(V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B}{V_0 + V} \frac{K_{HA_2}}{K_{HA_2} + [H^+]} \quad (46)$$

Para $F_{HA_4^+}$

$$[A_3] = C_{HA_3^+} - [HA_3^+] = \frac{(V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) C_B}{V_0 + V} \frac{K_{HA_3^+}}{K_{HA_3^+} + [H^+]} \quad (47)$$

Para $F_{HA_5^+}$

$$[A_4] = C_{HA_4^+} - [HA_4^+] = \frac{(V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) C_B}{V_0 + V} \frac{K_{HA_4^+}}{K_{HA_4^+} + [H^+]} \quad (48)$$

As demais expressões de balanceamento de massa e de carga seguem as orientações de Vasconcelos (23).

As modificações introduzidas pelas equações 45-48 alteram as Funções de Gran: F_{HA_2} , $F_{HA_3^+}$, $F_{HA_4^+}$ e $F_{HA_5^+}$ enquanto que F_{HCl} e F_{HA_1} permanecem na mesma forma anterior. Todas são apresentadas abaixo para as titulações feitas em solução concentrada de uréia.

Para HCl

$$([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) + C_{U_0} V_0 [H^+] / K_{UH^+} - (V_{HA_1} - V_{HCl}) C_B$$

$$\begin{aligned}
& \times \frac{K_{HA_1}}{K_{HA_1} + [H^+]} - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) C_B \frac{K_{HA_2}}{K_{HA_2} + [H^+]} - (V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) C_B \\
& \times \frac{K_{HA_3^+}}{K_{HA_3^+} + [H^+]} - (V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) C_B \frac{K_{HA_4^+}}{K_{HA_4^+} + [H^+]} - (V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+}) C_B \\
& \times \frac{K_{HA_5^+}}{K_{HA_5^+} + [H^+]} = V_{HCl} C_B - V C_B \quad (49)
\end{aligned}$$

pode ser representada mais simplesmente por:

$$F_{HCl} = V_{HCl} C_B - V C_B \quad (50)$$

Para HA_1

$$\begin{aligned}
& ([H^+] - [OH^-]) (V_o + V) (K_{HA_1} + [H^+]) / C_B + \\
& C_{U_o} V_o [H^+] (K_{HA_1} + [H^+]) / K_{UH^+} C_B + (V - V_{HCl}) [H^+] \\
& - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) \frac{K_{HA_2}}{K_{HA_2} + [H^+]} (K_{HA_1} + [H^+]) - \\
& (V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) \frac{K_{HA_3^+}}{K_{HA_3^+} + [H^+]} (K_{HA_1} + [H^+]) - (V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) \\
& \times \frac{K_{HA_4^+}}{K_{HA_4^+} + [H^+]} (K_{HA_1} + [H^+]) - (V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+}) \frac{K_{HA_5^+}}{K_{HA_5^+} + [H^+]} \\
& \times (K_{HA_1} + [H^+]) = V_{HA_1} K_{HA_1} - V K_{HA_1} \quad (51)
\end{aligned}$$

ou simplement:

$$F_{HA_1} = V_{HA_1} K_{HA_1} - V K_{HA_1} \quad (52)$$

Para HA_2

$$\begin{aligned} & ([H^+] - [OH^-]) (V_0 + V) (K_{HA_2} + [H^+]) / C_B + \\ & + C_U V_0 [H^+] (K_{HA_2} + [H^+]) / K_{UH^+} C_B + (V - V_{HCl}) [H^+] + \\ & (V_{HA_1} - V_{HCl}) K_{HA_2} - (V_{HA_1} - V_{HCl}) \frac{K_{HA_1}}{K_{HA_1} + [H^+]} (K_{HA_2} + [H^+]) \\ & - (V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) \frac{K_{HA_3^+}}{K_{HA_3^+} + [H^+]} (K_{HA_2} + [H^+]) - (V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) \\ & \times \frac{K_{HA_4^+}}{K_{HA_4^+} + [H^+]} (K_{HA_2} + [H^+]) - (V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+}) \frac{K_{HA_5^+}}{K_{HA_5^+} + [H^+]} \\ & \times (K_{HA_2} + [H^+]) = V_{HA_2} K_{HA_2} - V K_{HA_2} \quad (53) \end{aligned}$$

ou

$$F_{HA_2} = V_{HA_2} K_{HA_2} - V K_{HA_2} \quad (54)$$

Para HA_3^+

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

$$\begin{aligned}
& C_{UO} V_O [H^+] (K_{HA_3^+} + [H^+]) / K_{UH^+} C_B + (V - V_{HCl}) [H^+] + \\
& (V_{HA_2} - V_{HCl}) K_{HA_3^+} - (V_{HA_1} - V_{HCl}) \frac{K_{HA_1}}{K_{HA_1} + [H^+]} \\
& \times (K_{HA_3^+} + [H^+]) - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) \frac{K_{HA_2}}{K_{HA_2} + [H^+]} (K_{HA_3^+} + [H^+]) - \\
& (V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) \frac{K_{HA_4^+}}{K_{HA_4^+} + [H^+]} (K_{HA_3^+} + [H^+]) - (V_{HA_5^+} - V_{HA_4^+}) \\
& \times \frac{K_{HA_5^+}}{K_{HA_5^+} + [H^+]} (K_{HA_3^+} + [H^+]) = V_{HA_3^+} K_{HA_3^+} - V K_{HA_3^+} \quad (55)
\end{aligned}$$

$$\text{ou} \quad F_{HA_3} = V_{HA_3^+} K_{HA_3^+} - V K_{HA_3^+} \quad (56)$$

Para HA_4^+

$$\begin{aligned}
& ([H^+] - [OH^-]) (V_O + V) (K_{HA_4^+} + [H^+]) / C_B + \\
& C_{UO} V_O [H^+] (K_{HA_4^+} + [H^+]) / K_{UH^+} C_B + (V - V_{HCl}) [H^+] + \\
& (V_{HA_3^+} - V_{HCl}) K_{HA_4^+} - (V_{HA_1} - V_{HCl}) \frac{K_{HA_1}}{K_{HA_1} + [H^+]} (K_{HA_4^+} + [H^+]) \\
& - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) \frac{K_{HA_2}}{K_{HA_2} + [H^+]} (K_{HA_4^+} + [H^+]) - (V_{HA_3^+} - V_{HA_2})
\end{aligned}$$

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

$$\times (K_{HA_4^+} + [H^+]) = V_{HA_4^+} K_{HA_4^+} - V K_{HA_4^+} \quad (57)$$

ou

$$F_{HA_4^+} = V_{HA_4^+} K_{HA_4^+} - V K_{HA_4^+} \quad (58)$$

Para HA_5^+

$$\begin{aligned} & ([H^+] - [OH^-]) (V_o + V) (K_{HA_5^+} + [H^+]) / C_B + \\ & C_{U_o} V_o [H^+] (K_{HA} + [H^+]) / K_{UH^+} C_B + (V - V_{HCl}) [H^+] + \\ & (V_{HA_4^+} - V_{HCl}) K_{HA_5^+} + (V_{HA_1} - V_{HCl}) \frac{K_{HA_1}}{K_{HA_1} + [H^+]} \\ & \times (K_{HA_5^+} + [H^+]) - (V_{HA_2} - V_{HA_1}) \frac{K_{HA_2}}{K_{HA_2} + [H^+]} (K_{HA_5^+} + [H^+]) \\ & - (V_{HA_3^+} - V_{HA_2}) \frac{K_{HA_3^+}}{K_{HA_3^+} + [H^+]} (K_{HA_5^+} + [H^+]) - (V_{HA_4^+} - V_{HA_3^+}) \\ & \times \frac{K_{HA_4^+}}{K_{HA_4^+} + [H^+]} (K_{HA_5^+} + [H^+]) = V_{HA_5^+} K_{HA_5^+} - V K_{HA_5^+} \quad (59) \end{aligned}$$

ou

$$F_{HA_5^+} = V_{HA_5^+} K_{HA_5^+} - V K_{HA_5^+} \quad (60)$$

Os programas anteriores foram adaptados às novas Funções de Gran e todas as titulações de proteínas e aminoácidos foram recalculadas. Para as titulações da proteína em meio aquoso, fornece-se ao programa os valores de V_0 , C_B , valores aproximados de K_{HA_1} , ..., K_{HA_5} , além dos pares de dados $V(N)$, $pH(N)$, onde N é o número total de pares. Com as titulações em uréia, os dados requeridos pelo programa são: V_0 , C_B , K_w , E''_{oa} , j'_H , j'_{OH} , valores aproximados das constantes de dissociação dos ácidos fracos e os pares de dados $V(N)$, $E(N)$.

Os valores iniciais de V e E são usados para calcular um valor aproximado de V_{HCl} , utilizando-se apenas os dois primeiros termos de F_{HCl} (Eq. 49). São utilizados então os 4 ou 5 pontos seguintes ao $(V_{HCl})_{aprox.}$ nos 3 primeiros termos de F_{HA_1} (Eq. 51) para a obtenção por regressão linear de $(V_{HA_1})_{aprox.}$ e $(-K_{HA_1})_{aprox.}$. Quatro ou 5 pontos seguintes a $(V_{HA_1})_{aprox.}$ são usados nos 5 primeiros termos de F_{HA_2} (Eq. 53), para se chegar aos valores de $(V_{HA_2})_{aprox.}$ e $(-K_{HA_2})_{aprox.}$ por regressão linear. O mesmo esquema é seguido para os demais ácidos. Esses valores aproximados são utilizados nas equações completas para calcular Funções de Gran mais exatas para cada ácido. Assim por exemplo para o HCl, utilizando-se os pontos na região $0 < V < V_{HCl}$, os valores aproximados são usados na Eq. 49 para se obter valores mais refinados de F_{HCl} . Um valor mais refinado de V_{HCl} é obtido por regressão linear. Esse novo valor de V_{HCl} é usado para se chegar a valores mais refinados de F_{HA_1} , utilizando-se a equação 51 e os pontos na região $V_{HCl} < V < V_{HA_1}$. Por regressão linear, chega-se também a um valor mais re

finado de V_{HA_1} e K_{HA_1} . O mesmo é feito para as demais Funções de Gran.

O processo iterativo prossegue até que, para cada ácido, os valores do parâmetro V_{HA_n} calculados em duas interações consecutivas sejam menores ou iguais a 1×10^{-5} .

Quando isso é alcançado, o computador manda imprimir, para cada ácido, $V(N)$, $pH(N)$, F_G refinada e F_G ajustada (ajustada por regressão linear), além do valor do volume de equivalência e da constante de dissociação, no caso dos ácidos fracos, dados pela regressão linear.

A composição da proteína em termos de número do grupo por mol de proteína é calculada a partir de cálculos estequiométricos simples, envolvendo o peso da proteína, peso molecular, volume do titulante requerido para a titulação do grupo e a concentração molar do titulante.

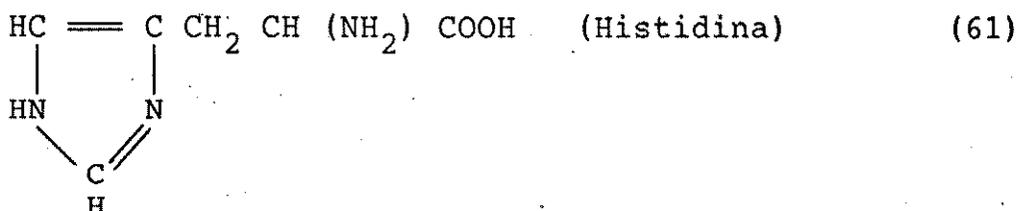
A utilização dessas equações completas trouxe muitas diferenças aos resultados. Em todas as titulações de proteínas, foi possível separar 5 grupos, além do ácido forte, indicando que o programa realmente atingiu o nível de separação desejado. Em decorrência disso, o tempo requerido pelo microcomputador CP 500 para realizar um cálculo completo também aumentou muito em alguns casos.

IV. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA HISTIDINA EM URÉIA 8,00 M

Geralmente o comportamento ácido-base dos grupos ionizáveis de uma proteína não é muito diferente do comportamento desses mesmos grupos quando presentes em compostos modelos. Por esse motivo, é possível identificar os grupos ionizantes das proteínas, comparando os valores de suas constantes de dissociação com valores determinados nessas substâncias mais simples. Isso demonstra a importância de estudos desses sistemas menos complexos para que se complementem os conhecimentos sobre as proteínas.

Com base nessas evidências, a avaliação das modificações introduzidas nos programas pelas equações completas foi feita através da titulação do aminoácido Histidina. Em titulações de aminoácidos, não aparecem diferenças nas constantes de dissociação dos grupos titulados que possam ser atribuídos a ocorrência de grupos mascarados ou sujeitos a interações eletrostáticas com outros grupos. Assim, se o programa não estiver correto, aparecerão diferenças na composição dos grupos titulados do aminoácido ou nas constantes de dissociação dos mesmos.

Como se pode ver na estrutura da Histidina⁽⁵⁸⁾, dada abaixo, são 3 os grupos tituláveis por mol do aminoácido: um grupo carboxílico, um grupo imidazol e um grupo amino, cujas constan



tes de dissociação aparentes são dadas na tabela 9.

Tabela 9. Constantes de dissociação aparentes dos grupos ionizáveis da Histidina a 25°C, encontradas na literatura

| Referências | pK'_{COOH} | $pK'_{\text{Im.}}$ | $pK'_{\text{NH}_3^+}$ |
|-------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| 58, 59 | 1,82 | 6,00 | 9,17 |
| 8, 60 | 1,78 | 5,97 | 8,97 |

IV.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a histidina utilizada nas titulações estava na forma do sal ácido hidratado, L(+)-Monocloridrato de histidina, cuja fórmula é $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, peso molecular 209,63.

Soluções do aminoácido com concentrações da ordem de $(5,109-5,134) \times 10^{-3}$ M em soluções de uréia 8,00 M e KCl 0,10 M e em excesso de HCl foram tituladas com solução de NaOH 1,207 M, contendo também KCl 0,10 M.

A tabela 10 apresenta os dados de uma das titulações feitas. Na tabela 11, estão os dados da curva linearizada da mesma titulação. As curvas de titulação normal e linearizada são mostradas na figura 14. Os resultados expressos como número de grupos/mol, como também as constantes de dissociação, encontram-se na tabela 12.

Foram titulados dois grupos que, pelos valores de pK_a , foram identificados como sendo o grupo imidazol e o grupo amino.

Tab. 10. Dados da titulação de 0,03229 g de Monocloridrato de Histidina em 30,00 ml de uréia 8,00 M, contendo KCl 0,10 M e adição de 0,232 milimol de HCl, com solução de NaOH 1,207 M à mesma força iônica. ($E''_{Oa}=340,1$ mV; $E'_{Ob}=-431,3$ mV; $j_H=-14,08 \times 10^2$ mV/M; $j_{OH}=0,0$ mV/M).

| V (ml) | E (mV) | pH |
|--------|--------|--------|
| 0.0100 | 208.3 | 3.780 |
| 0.0200 | 206.7 | 3.808 |
| 0.0301 | 204.9 | 3.838 |
| 0.0400 | 203.0 | 3.870 |
| 0.0501 | 201.0 | 3.904 |
| 0.0600 | 198.8 | 3.942 |
| 0.0700 | 196.5 | 3.981 |
| 0.0800 | 194.0 | 4.023 |
| 0.0900 | 191.2 | 4.070 |
| 0.1000 | 188.0 | 4.125 |
| 0.1101 | 184.4 | 4.185 |
| 0.1200 | 180.2 | 4.257 |
| 0.1300 | 175.2 | 4.341 |
| 0.1400 | 169.0 | 4.446 |
| 0.1500 | 161.0 | 4.581 |
| 0.1600 | 149.7 | 4.769 |
| 0.1700 | 133.8 | 5.041 |
| 0.1800 | 113.5 | 5.384 |
| 0.1900 | 96.3 | 5.675 |
| 0.2000 | 83.6 | 5.890 |
| 0.2101 | 73.4 | 6.062 |
| 0.2200 | 64.6 | 6.210 |
| 0.2300 | 56.5 | 6.347 |
| 0.2400 | 48.7 | 6.479 |
| 0.2500 | 41.0 | 6.609 |
| 0.2601 | 32.7 | 6.749 |
| 0.2700 | 23.7 | 6.901 |
| 0.2800 | 12.9 | 7.084 |
| 0.2950 | -10.2 | 7.474 |
| 0.3000 | -22.4 | 7.680 |
| 0.3026 | -30.3 | 7.813 |
| 0.3126 | -61.0 | 8.332 |
| 0.3150 | -66.7 | 8.429 |
| 0.3200 | -76.7 | 8.598 |
| 0.3250 | -84.4 | 8.728 |
| 0.3300 | -90.8 | 8.836 |
| 0.3400 | -101.2 | 9.011 |
| 0.3500 | -110.0 | 9.160 |
| 0.3600 | -117.8 | 9.292 |
| 0.3700 | -124.9 | 9.412 |
| 0.3800 | -131.7 | 9.526 |
| 0.3900 | -138.6 | 9.643 |
| 0.4000 | -145.7 | 9.763 |
| 0.4100 | -153.4 | 9.893 |
| 0.4200 | -162.0 | 10.038 |
| 0.4300 | -172.4 | 10.214 |
| 0.4400 | -185.9 | 10.442 |
| 0.4451 | -194.8 | 10.592 |
| 0.4503 | -205.6 | 10.775 |
| 0.4551 | -216.6 | 10.960 |
| 0.4600 | -227.6 | 11.146 |
| 0.4670 | -239.9 | 11.354 |
| 0.4700 | -244.2 | 11.427 |
| 0.4750 | -250.2 | 11.528 |

Tab. 11. Dados da curva de titulação linearizada do Monocloridrato de Histidina, cujos parâmetros foram dados na tabela 10.

| FUNÇÕES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL | | | |
|--|--------|-------------|-------------|
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.0100 | 3.760 | 1.776E-01 | 1.972E-01 |
| 0.0200 | 3.808 | 1.668E-01 | 1.851E-01 |
| 0.0301 | 3.838 | 1.555E-01 | 1.729E-01 |
| 0.0400 | 3.870 | 1.443E-01 | 1.610E-01 |
| 0.0501 | 3.904 | 1.334E-01 | 1.488E-01 |
| 0.0600 | 3.942 | 1.223E-01 | 1.368E-01 |
| 0.0700 | 3.981 | 1.117E-01 | 1.248E-01 |
| 0.0800 | 4.023 | 1.013E-01 | 1.127E-01 |
| 0.0900 | 4.070 | 9.067E-02 | 1.006E-01 |
| 0.1000 | 4.125 | 7.987E-02 | 8.856E-02 |
| 0.1101 | 4.185 | 6.921E-02 | 7.637E-02 |
| 0.1200 | 4.257 | 5.849E-02 | 6.442E-02 |
| 0.1300 | 4.341 | 4.775E-02 | 5.235E-02 |
| 0.1400 | 4.446 | 3.693E-02 | 4.028E-02 |
| 0.1500 | 4.581 | 2.610E-02 | 2.821E-02 |
| 0.1600 | 4.769 | 1.513E-02 | 1.614E-02 |
| 0.1700 | 5.041 | 3.979E-03 | 4.075E-03 |
| 0.1800 | 5.384 | -7.781E-03 | -7.995E-03 |
| 0.1900 | 5.675 | -1.996E-02 | -2.007E-02 |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .173376 | | | |
| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999941 | | | |
| PARA ACIDO HA1 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.2000 | 5.890 | 3.615E-08 | 3.604E-08 |
| 0.2101 | 6.062 | 3.272E-08 | 3.258E-08 |
| 0.2200 | 6.210 | 2.917E-08 | 2.919E-08 |
| 0.2300 | 6.347 | 2.569E-08 | 2.577E-08 |
| 0.2400 | 6.479 | 2.222E-08 | 2.235E-08 |
| 0.2500 | 6.609 | 1.888E-08 | 1.893E-08 |
| 0.2601 | 6.749 | 1.541E-08 | 1.547E-08 |
| 0.2700 | 6.901 | 1.202E-08 | 1.208E-08 |
| 0.2800 | 7.084 | 8.599E-09 | 8.659E-09 |
| 0.2950 | 7.474 | 3.603E-09 | 3.525E-09 |
| 0.3000 | 7.680 | 1.890E-09 | 1.813E-09 |
| 0.3026 | 7.813 | 9.738E-10 | 9.233E-10 |
| 0.3126 | 8.332 | -2.471E-09 | -2.499E-09 |
| 0.3150 | 8.429 | -3.298E-09 | -3.321E-09 |
| 0.3200 | 8.598 | -5.065E-09 | -5.032E-09 |
| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999984 | | | |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= .305298 | | | |
| CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO P/HA1= 3.42272E-07 | | | |
| PARA ACIDO HA2 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.3400 | 9.011 | 3.420E-11 | 3.407E-11 |
| 0.3500 | 9.160 | 3.110E-11 | 3.109E-11 |
| 0.3600 | 9.292 | 2.800E-11 | 2.811E-11 |
| 0.3700 | 9.412 | 2.507E-11 | 2.513E-11 |
| 0.3800 | 9.526 | 2.217E-11 | 2.215E-11 |
| 0.3900 | 9.643 | 1.917E-11 | 1.918E-11 |
| 0.4000 | 9.763 | 1.621E-11 | 1.620E-11 |
| 0.4100 | 9.893 | 1.321E-11 | 1.322E-11 |
| 0.4200 | 10.038 | 1.025E-11 | 1.024E-11 |
| 0.4300 | 10.214 | 7.252E-12 | 7.266E-12 |
| 0.4400 | 10.442 | 4.277E-12 | 4.288E-12 |
| 0.4451 | 10.592 | 2.758E-12 | 2.770E-12 |
| 0.4503 | 10.795 | 1.222E-12 | 1.221E-12 |
| 0.4551 | 10.960 | -1.898E-13 | -2.079E-13 |
| 0.4600 | 11.146 | -1.671E-12 | -1.667E-12 |
| 0.4670 | 11.354 | -3.727E-12 | -3.751E-12 |
| 0.4700 | 11.427 | -4.624E-12 | -4.645E-12 |
| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=-.999994 | | | |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= .454402 | | | |
| CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO PARA HA2= 2.97773E-10 | | | |

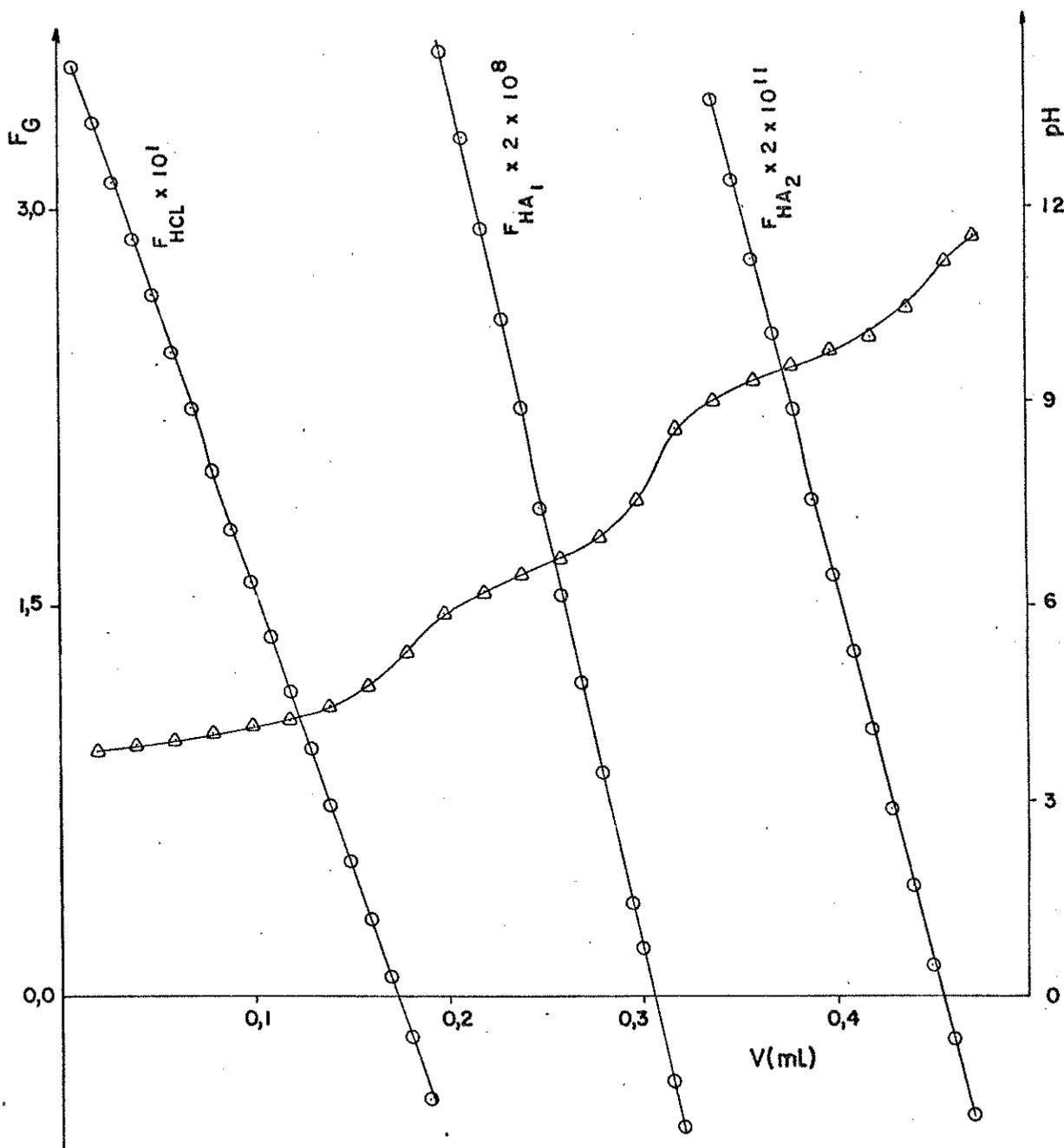


Fig. 14. Curvas da titulação potenciométrica do Monocloridrato de Histidina, cujos dados foram apresentados nas tabelas 10 e 11.

(Δ) - curva normal (ordenada à direita)

(\circ) - curva linearizada (ordenada à esquerda)

Tab. 12. Resultados da titulação potenciométrica do Monocloridrato de Histidina em uréia 8,00 M e força iônica 0,10 M

| Grupo | nº de grupos/mol | K_a^* | pK_a |
|----------|------------------|-----------------------------------|--------|
| Imidazol | $0,99 \pm 0,02$ | $(3,35 \pm 0,03) \times 10^{-7}$ | 6,47 |
| Amino | $1,07 \pm 0,01$ | $(3,05 \pm 0,08) \times 10^{-10}$ | 9,52 |

* - média de 3 determinações

O grupo carboxílico, por ter um valor de pK_a muito baixo, não pôde ser titulado separadamente do HCl.

A variação do pK dos grupos imidazol e amino, entre outros, em função das concentrações de uréia, KCl e GuHCl, foi representada graficamente por Donovan e colaboradores⁽²⁶⁾. Do seu gráfico, pode-se calcular que o pK do grupo imidazol é 0,45 unidade maior em uréia 8 M que em água. A diferença nos valores de pK encontrada por Tahin⁽²⁹⁾ para o grupo imidazol da histidina em uréia 5 M e em água (0,28 unidade de pK) coincide com o valor obtido do gráfico de Donovan e colaboradores a esta concentração.

Usando-se os valores de pK' do grupo imidazol em água, dados na tabela 9, a diferença encontrada neste trabalho para o pK_a do grupo imidazol da histidina, em uréia 8,00 M com relação ao valor em água, é de 0,47 ou 0,50 unidade de pK_a , que é razoavelmente concordante com os resultados da literatura acima citados.

Para o grupo amino da histidina, a diferença entre o pK_a

em uréia 8,00 M e em água (dados da tabela 9) pode ser de 0,35 a 0,55 unidade de pK_a . Pelo gráfico de referência 26, a diferença calculada é de 0,27 unidade de pK para o grupo amino da n-butilamina. Tahin⁽²⁹⁾ encontrou uma diferença de apenas 0,09 unidade de pK_a entre os valores em uréia 5 M e em água do grupo amino da histamina. Pelo gráfico da referência 26, a diferença em relação à concentração de uréia 5 M seria de cerca de 0,16 unidade.

A diferença entre os valores de pK_a do grupo amino da histidina em uréia 8,00 M e em água, encontrada neste trabalho não coincide com as quantidades semelhantes calculadas para o grupo amino em outros compostos orgânicos. Provavelmente, a diferente vizinhança do grupo amino na histidina, histamina e n-butilamina influencia a titulação do mesmo diferentemente.

Observando-se, porém, a diferença entre os valores de pK' dos grupos amino e imidazol da histidina em água (3,17 ou 3,00 unidades de pK'), com a mesma diferença em uréia 8,00 M (3,05 unidades de pK_a), nota-se que a diferença existente na água é a mesma da encontrada na uréia. Isso foi considerado como um bom indício em relação à exatidão dos valores de pK_a aqui determinados.

Com relação à composição dos grupos titulados, o resultado coincide perfeitamente com o esperado.

Com o objetivo de testar o programa PROTE MODIFICADO, um estudo semelhante a este foi feito anteriormente por Vasconcelos⁽²³⁾, usando titulante 0,1 M. A estequiometria dos grupos ionizáveis da histidina calculada por Vasconcelos foi quase

igual à obtida neste trabalho (0,98 grupo imidazol e 1,07 grupos amino). Quanto aos valores de pK_a desses grupos, os valores encontrados neste trabalho são um pouco maiores que os obtidos com o programa PROTE MODIFICADO ($pK_{Im}=6,39$; $pK_{NH_3^+}=9,43$).

Assim sendo, os resultados apresentados na tabela 12 demonstram que o programa se mostrou adequado para a determinação da composição e pK_a dos grupos ionizáveis do composto modelo histidina. Dessa forma, foi o programa considerado apropriado para o estudo de sistemas mais complexos, como é o caso das proteínas.

V. LISOZIMA DESNATURADA EM URÉIA 9,30 M

V.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As lisozimas são enzimas carbohidrato hidrolases que são encontradas na clara de ovos de aves, no leite, na urina e em outros tecidos e secreções humanos. Elas diferem um pouco entre si no posicionamento de alguns grupos da seqüência de aminoácidos; no peso molecular e na atividade enzimática.

A que é isolada da clara de ovo da galinha é a que tem sido mais investigada e, por isso, é melhor caracterizada que as demais. Em consequência, geralmente o nome lisozima é imediatamente associado à lisozima da clara do ovo da galinha⁽⁶¹⁾.

A estrutura tridimensional completa da lisozima foi determinada em 1965 por Blake e colaboradores⁽⁶²⁾, utilizando difração de raios-X. A forma da molécula da proteína assemelha-se à de uma elipse, contendo, em um dos lados, uma fenda que separa a molécula em duas partes: uma contém as duas extremidades da cadeia, enrolada em torno de um núcleo de resíduos hidrofóbicos; outra, mais estendida, contém a parte central da cadeia⁽⁶¹⁾.

A molécula é constituída de uma só cadeia polipeptídica, enrolada na forma citada acima e contém 4 pontes -S-S, unindo partes diferentes da cadeia (pontes entre os resíduos: 64-80; 76-94; 6-127 e 30-115)⁽⁶³⁾. Muitos pesquisadores acreditam que a alta estabilidade da lisozima frente a altas temperaturas, variações no pH e reagentes desnaturantes deve-se exatamente

à presença do alto conteúdo de pontes de dissulfeto numa molécula de proteína relativamente pequena⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾.

A determinação completa da estrutura primária da lisozima foi feita independentemente por Canfield⁽⁶⁸⁾ e Jolles e colaboradores⁽⁶⁹⁾. As duas sequências divergiram na identificação de alguns grupos amida. Investigações posteriores⁽⁷⁰⁾ porém, confirmaram os resultados de Canfield.

De acordo com a sequência de aminoácidos de Canfield, a lisozima possui 22 grupos tituláveis: 1 α -COOH; 8 Asp; 2 Glu; 1 His; 1 α -NH₂; 3 Tyr e 6 Lys.

Somente em 1972 foi descoberto que o resíduo 103, inicialmente identificado como ácido aspártico, é na realidade asparagina⁽⁶¹⁾. Uma investigação recente confirma essa descoberta⁽⁷¹⁾. Esse fato é de muita importância para os estudos de titulação potenciométrica da lisozima, pois indica que, se existem 7 resíduos de Asp na molécula da enzima o número máximo de carboxílicos tituláveis deve ser 10 e não 11, como se considerava até então.

V.2. COMPORTAMENTO ÁCIDO-BASE DA LISOZIMA NATIVA

As pesquisas sobre o comportamento ácido-base da lisozima foram iniciadas bem antes de ter sido descoberta sua sequência completa de aminoácidos. Tanford e Wagner⁽¹²⁾, em 1954, foram os pioneiros e interpretaram a curva de titulação da lisozima, utilizando a teoria de Linderstrøm-Lang. Foram determinados 10,5 grupos carboxílicos, 1 imidazol, 1 α -amino, 5 ou 6 ϵ -ami-

no, 3 fenólicos e 11 ou 12 guanidinos por mol de proteína. Apareceram, entretanto, algumas anormalidades com os grupos carboxílicos e fenólicos. A anormalidade nos carboxílicos foi atribuída à presença de grupos com valores de pK muito diferentes.

Posteriormente, Beychok e Warner⁽⁶⁵⁾ analisaram a mesma curva de titulação e concluíram que 6 grupos carboxílicos possuíam $pK_{int} = 3,53$ e os outros 4,5 grupos, $pK_{int} = 5,08$.

Donovan e colaboradores^(26,72) titularam lisozima do mesmo lote utilizado por Tanford e Wagner e encontraram o mesmo número de grupos carboxílicos. Porém, na titulação de um outro lote de proteína do mesmo fabricante, foi encontrado 1,5 grupo a menos.

Sakakibara e Hamaguchi⁽⁷³⁾ realizaram também a titulação da proteína nativa e encontraram 8 grupos carboxílicos, um com $pK_{int} = 3,5$, outro com $pK_{int} = 6,0$ e seis com $pK_{int} = 4,3$. A anormalidade observada anteriormente nos grupos fenólicos foi também confirmada. Segundo os autores, os três grupos fenólicos têm comportamento bem distinto um dos outros frente à titulação. Dois grupos ionizam-se reversivelmente, só que um tem pK' de 9,95 e outro de 11,6; o terceiro ioniza-se irreversivelmente com $pK' = 12,6$.

Uma tentativa de interpretar a curva de titulação de lisozima pela teoria de Tanford e Kirkwood foi feita por Tanford e Roxby⁽¹³⁾, mas sem sucesso.

Godinho e colaboradores⁽⁷⁴⁾ encontraram que os grupos carboxílicos da lisozima nativa pertenciam a duas classes: a primeira, contendo cerca de 5 grupos com $pK_a = 3,77$; a segunda,

constituída por 5,6 grupos com $pK_a = 5,03$. A estequiometria total dos grupos carboxílicos foi comparável à encontrada por Tanford e Wagner.

V.3. INVESTIGAÇÕES ANTERIORES SOBRE A LISOZIMA DESNATURADA

Como foi afirmado anteriormente, a lisozima é uma proteína muito estável. Tal constatação decorre de estudos onde a desnaturação da lisozima provocada por elevações na temperatura, variações no pH ou pela ação de reagentes desnaturantes foi acompanhada por observação da variação de várias propriedades físico-químicas da enzima.

Dados de viscosidade indicam que, em solução sob baixa força iônica, a molécula da lisozima é simétrica⁽⁶⁴⁾. Nessas condições e a pH neutro, não ocorrem mudanças conformacionais por elevação da temperatura até 77°C. Mantendo-se a temperatura num valor moderado, não foram observadas mudanças nas propriedades óticas da enzima na faixa de pH 1,2-11,3⁽⁶¹⁾.

Mesmo os reagentes desnaturantes GuHCl e uréia só atuam efetivamente a altas concentrações. Soluções de GuHCl com concentrações de, no mínimo 5 M, são necessárias para levarem a lisozima ao estado de desenrolamento total, limitado apenas pela manutenção das pontes de dissulfeto⁽⁶⁷⁾. Com soluções de uréia, a concentração requerida é ainda maior. A polêmica quanto ao nível de desenrolamento atingido pela lisozima nessas soluções ainda existe.

Em 1956, Leónis⁽⁶⁴⁾ fez um estudo do comportamento da li-

sozima em soluções de uréia, por medidas de viscosidade, rotação ótica, atividade enzimática. Concluiu que a desnaturação da proteína só ocorre em concentrações de uréia acima de 7 M. Contudo, mesmo em soluções de uréia 10 M, a lisozima não alcança o estado de enrolamento aleatório característico de completa desnaturação. Foi mostrado posteriormente que, em uréia 9 M, a lisozima só é desnaturada completamente a extremos de pH ou a temperaturas elevadas^(66,75). Essas conclusões foram confirmadas por outros pesquisadores^(22,76).

Entretanto, para outros grupos de pesquisa, a interpretação dos resultados de estudos comparativos da desnaturação da lisozima em uréia e em GuHCl leva à conclusão de que a extensão do desenrolamento provocado pelos dois desnaturantes é a mesma. O GuHCl é mais efetivo, pois age a concentrações mais baixas. A sua capacidade relativa como desnaturante, porém, depende da proteína, mais precisamente da polaridade da cadeia polipeptídica, que permanece escondida. No caso da lisozima, o GuHCl é 1,7 vez mais efetivo que a uréia^(77,78).

Como consequência dessa predominância do GuHCl sobre a uréia, a maioria dos trabalhos sobre titulação potenciométrica da lisozima desnaturada foram feitos, utilizando-se o GuHCl como desnaturante.

Donovan e colaboradores^(26,72) acharam que, na lisozima desnaturada, 3 grupos carboxílicos são titulados, além dos encontrados por titulação da proteína nativa. Na proteína desnaturada, todos os grupos carboxílicos são normais. Os grupos fenólicos só apresentam comportamento normal em soluções de

GuHCl. Em uréia 9 M, mesmo com aquecimento a 50°C, a curva de titulação espectrofotométrica dos fenólicos é semelhante à curva obtida com a proteína nativa.

Sakakibara e Hamaguchi⁽⁷³⁾ também encontraram 3 grupos carboxílicos a mais por titulação da lisozima desnaturada em um solvente misto de GuHCl 5 M e uréia 1,2 M.

Esses resultados, que apontam para um total de 13,5, 12 e 11 grupos carboxílicos, não concordam com a contagem dada pela sequência de aminoácidos. Todavia, a titulação da proteína em GuHCl 6M; feita por Roxby e Tanford⁽⁷⁹⁾ em 1973, já indicava o número correto de grupos carboxílicos: 10. Esses autores sugeriram a existência de 2 grupos mascarados na lisozima nativa e não observaram comportamento anormal nos grupos fenólicos da proteína desnaturada.

Recentemente, Kuramitsu e Hamaguchi⁽¹⁶⁾ fizeram uma reinvestigação dos dados de titulações da lisozima apresentadas anteriormente por outros pesquisadores. Esses autores utilizaram a teoria de Linderstrøm-Lang e valores de pK' determinados anteriormente para cada grupo titulável da proteína. Dos 21 grupos normalmente tituláveis da enzima, 17 tiveram seus valores de pK' determinados experimentalmente. Nos 4 restantes, foram utilizados valores estimados de pK' . Utilizando-se os mesmos valores de pK' , o tratamento matemático aplicado aos dados das 3 titulações não indicou a existência de grupos mascarados na lisozima nativa. Entretanto, as curvas de titulação obtidas por Tanford e Wagner⁽¹²⁾ e Donovan e colaboradores⁽⁷²⁾ não foram explicadas.

Esses problemas relacionados com a interpretação de curvas de titulação potenciométrica da lisozima mostram muito bem as dificuldades e limitações das teorias existentes para analisar o comportamento ácido-base de proteínas. Marini e Martin⁽⁸⁰⁾ apresentaram um trabalho em que discutem a questão da exatidão dos parâmetros calculados pela teoria de Linderstrøm-Lang sobre o conhecimento exato do número de grupos que são titulados numa mesma região de pH - (que normalmente não é conhecido) - e também sobre o número total de grupos ionizantes, que é determinado através da curva de titulação, sendo portanto limitado pela exatidão da mesma.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de tratamentos alternativos para interpretar os dados de titulações potenciométricas de proteínas.

O procedimento desenvolvido no grupo e utilizado neste trabalho não requer o conhecimento prévio do número de grupos que são titulados com o mesmo pK. Os dados de titulação são ajustados, por tratamento matemático rigoroso, as equações resultantes da aplicação das leis do equilíbrio químico às espécies presentes em solução. Marini e Martin⁽⁸⁰⁾ também acreditam na viabilidade da utilização de tais tratamentos.

V.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração da lisozima nas soluções analisadas variou entre $(3,263-3,295) \times 10^{-4}$ M. Devido à conhecida resistência da lisozima frente à uréia, a desnaturação da proteína foi reali-

em ureia 9,30 M durante 2 horas. Após esse período, as titulações foram efetuadas com solução de NaOH 1,200 M, contendo KCl 0,10 M.

O peso molecular utilizado nos cálculos do número de grupos/mol de lisozima foi 14307^(63,68,81).

Os dados de uma das titulações feitas são apresentados na tabela 13. Na tabela 14, estão os dados da mesma titulação após a linearização. As curvas de titulação normal e linearizada são mostrada na figura 15.

A composição da lisozima, calculada em termos de número de grupos por mol, é apresentada na tabela 15, ao lado dos números dados pela seqüência de aminoácidos. Os valores de K_a obtidos são apresentados na tabela 16.

Na interpretação dos resultados, será utilizado o conceito desenvolvido por Levy⁽³²⁾, e que devido aos problemas com a teoria de Linderstrøm-Lang tem ganhado força recentemente^(82, 83). De acordo com esses pesquisadores, a ionização dos grupos dos resíduos de aminoácidos de uma proteína não depende da carga da molécula, mas apenas das propriedades iônicas dos grupos. Grupos com propriedades iônicas semelhantes formam uma série, independente da identidade química, que possui constante de dissociação fixa.

Em uréia, espera-se que a titulação dos grupos carboxílicos seja completa até pH 6,0. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que nessa região é titulada uma série de grupos (HA_1) com $pK_{HA_1} = 5,11$. Donovan e colaboradores⁽⁷²⁾ e Sakakibara e Hamaguchi⁽⁷³⁾ encontraram, respectivamente, os valo-

Tab. 13. Dados da titulação de 0,14051 g de lisozima em 30,00 ml de solução de uréia 9,30 M contendo KCl 0,10 M e excesso de ácido (adição de 0,194 milimol de HCl), com solução de NaOH 1,200 M em KCl 0,10 M. ($E_{Oa}'' = 327,3$ mV; $E_{Ob}' = -447,3$ mV; $j_H = 0,0$ mV/M; $j_{OH} = 0,0$ mV/M).

| VOLUME | E/MV | pH | VOLUME | E/MV | pH |
|--------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 0.0050 | 177.5 | 4.188 | 0.1810 | -74.4 | 8.443 |
| 0.0100 | 174.0 | 4.213 | 0.1820 | -80.4 | 8.545 |
| 0.0150 | 174.4 | 4.240 | 0.1830 | -85.9 | 8.637 |
| 0.0201 | 172.7 | 4.269 | 0.1840 | -90.6 | 8.717 |
| 0.0250 | 170.9 | 4.299 | 0.1850 | -95.1 | 8.793 |
| 0.0300 | 169.1 | 4.329 | 0.1860 | -99.3 | 8.864 |
| 0.0350 | 167.2 | 4.361 | 0.1870 | -103.2 | 8.930 |
| 0.0400 | 165.1 | 4.397 | 0.1880 | -106.8 | 8.991 |
| 0.0450 | 163.0 | 4.432 | 0.1890 | -110.1 | 9.046 |
| 0.0500 | 160.7 | 4.471 | 0.1900 | -113.2 | 9.099 |
| 0.0550 | 158.3 | 4.512 | 0.1910 | -116.2 | 9.150 |
| 0.0600 | 155.7 | 4.555 | 0.1920 | -119.0 | 9.197 |
| 0.0650 | 153.0 | 4.601 | 0.1930 | -121.8 | 9.244 |
| 0.0700 | 150.1 | 4.650 | 0.1941 | -124.6 | 9.291 |
| 0.0750 | 147.1 | 4.701 | 0.1950 | -126.8 | 9.329 |
| 0.0800 | 143.9 | 4.755 | 0.1960 | -129.2 | 9.369 |
| 0.0850 | 140.5 | 4.812 | 0.1980 | -133.7 | 9.445 |
| 0.0900 | 136.9 | 4.873 | 0.2000 | -138.0 | 9.518 |
| 0.0950 | 133.2 | 4.935 | 0.2020 | -142.0 | 9.585 |
| 0.1000 | 129.3 | 5.001 | 0.2050 | -148.3 | 9.692 |
| 0.1026 | 127.2 | 5.037 | 0.2075 | -153.5 | 9.780 |
| 0.1050 | 125.3 | 5.069 | 0.2100 | -158.5 | 9.864 |
| 0.1075 | 123.1 | 5.106 | 0.2125 | -163.2 | 9.944 |
| 0.1100 | 121.0 | 5.141 | 0.2150 | -167.9 | 10.023 |
| 0.1125 | 118.7 | 5.180 | 0.2175 | -172.7 | 10.104 |
| 0.1150 | 116.4 | 5.219 | 0.2200 | -177.3 | 10.182 |
| 0.1175 | 114.0 | 5.259 | 0.2225 | -181.7 | 10.256 |
| 0.1200 | 111.7 | 5.298 | 0.2251 | -186.3 | 10.334 |
| 0.1225 | 109.2 | 5.341 | 0.2275 | -190.5 | 10.405 |
| 0.1250 | 106.8 | 5.381 | 0.2300 | -194.6 | 10.474 |
| 0.1275 | 104.2 | 5.425 | 0.2325 | -198.8 | 10.545 |
| 0.1300 | 101.5 | 5.471 | 0.2350 | -203.1 | 10.618 |
| 0.1325 | 98.8 | 5.516 | 0.2375 | -207.3 | 10.689 |
| 0.1350 | 95.8 | 5.567 | 0.2400 | -211.4 | 10.758 |
| 0.1375 | 92.8 | 5.618 | 0.2425 | -215.5 | 10.827 |
| 0.1400 | 89.7 | 5.670 | 0.2450 | -219.6 | 10.897 |
| 0.1425 | 86.4 | 5.726 | 0.2475 | -223.5 | 10.962 |
| 0.1450 | 82.9 | 5.785 | 0.2501 | -227.6 | 11.032 |
| 0.1475 | 79.1 | 5.849 | 0.2525 | -231.2 | 11.093 |
| 0.1500 | 75.1 | 5.917 | 0.2550 | -234.7 | 11.152 |
| 0.1525 | 70.7 | 5.991 | 0.2575 | -238.3 | 11.213 |
| 0.1550 | 65.8 | 6.074 | 0.2600 | -241.7 | 11.270 |
| 0.1575 | 60.3 | 6.167 | 0.2627 | -245.4 | 11.332 |
| 0.1601 | 54.1 | 6.271 | 0.2650 | -248.3 | 11.381 |
| 0.1625 | 47.2 | 6.388 | 0.2675 | -251.3 | 11.432 |
| 0.1650 | 38.4 | 6.537 | 0.2700 | -254.2 | 11.481 |
| 0.1660 | 34.5 | 6.603 | 0.2750 | -259.8 | 11.576 |
| 0.1670 | 30.0 | 6.679 | 0.2800 | -264.8 | 11.660 |
| 0.1680 | 25.1 | 6.761 | 0.2900 | -273.0 | 11.799 |
| 0.1690 | 19.7 | 6.853 | 0.3000 | -279.2 | 11.903 |
| 0.1700 | 13.3 | 6.961 | 0.3100 | -284.5 | 11.993 |
| 0.1710 | 6.7 | 7.072 | 0.3200 | -289.0 | 12.069 |
| 0.1730 | -9.2 | 7.341 | 0.3300 | -292.7 | 12.131 |
| 0.1740 | -17.9 | 7.488 | 0.3400 | -296.0 | 12.187 |
| 0.1750 | -27.3 | 7.647 | 0.3501 | -298.9 | 12.236 |
| 0.1760 | -36.6 | 7.804 | 0.3600 | -301.4 | 12.278 |
| 0.1770 | -44.6 | 7.939 | | | |
| 0.1780 | -52.6 | 8.075 | | | |
| 0.1790 | -60.4 | 8.207 | | | |
| 0.1800 | -67.6 | 8.328 | | | |

Tab. 14. Dados da curva de titulação linearizada da lisozima, cujos parâmetros foram apresentados na tabela 13.

FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS
PARA HCL

| VOLUME | pH | FG | REFINADA | FG | AJUSTADA |
|--------|-------|----|------------|----|------------|
| 0.0050 | 4.188 | | 7.708E-02 | | 8.202E-02 |
| 0.0100 | 4.213 | | 7.150E-02 | | 7.602E-02 |
| 0.0150 | 4.240 | | 6.583E-02 | | 7.002E-02 |
| 0.0201 | 4.269 | | 6.010E-02 | | 6.390E-02 |
| 0.0250 | 4.299 | | 5.434E-02 | | 5.802E-02 |
| 0.0300 | 4.329 | | 4.887E-02 | | 5.202E-02 |
| 0.0350 | 4.361 | | 4.339E-02 | | 4.602E-02 |
| 0.0400 | 4.397 | | 3.784E-02 | | 4.002E-02 |
| 0.0450 | 4.432 | | 3.220E-02 | | 3.402E-02 |
| 0.0500 | 4.471 | | 2.654E-02 | | 2.802E-02 |
| 0.0550 | 4.512 | | 2.094E-02 | | 2.202E-02 |
| 0.0600 | 4.555 | | 1.519E-02 | | 1.602E-02 |
| 0.0650 | 4.601 | | 9.523E-03 | | 1.002E-02 |
| 0.0700 | 4.650 | | 3.730E-03 | | 4.025E-03 |
| 0.0750 | 4.701 | | -1.984E-03 | | -1.975E-03 |
| 0.0800 | 4.755 | | -7.811E-03 | | -7.975E-03 |

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .0733538
COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999985

PARA ACIDO HA1

| VOLUME | pH | FG | REFINADA | FG | AJUSTADA |
|--------|-------|----|------------|----|------------|
| 0.0950 | 4.935 | | 4.877E-07 | | 4.834E-07 |
| 0.1000 | 5.001 | | 4.459E-07 | | 4.427E-07 |
| 0.1026 | 5.037 | | 4.240E-07 | | 4.215E-07 |
| 0.1050 | 5.069 | | 4.054E-07 | | 4.019E-07 |
| 0.1075 | 5.106 | | 3.824E-07 | | 3.815E-07 |
| 0.1100 | 5.141 | | 3.624E-07 | | 3.611E-07 |
| 0.1125 | 5.180 | | 3.397E-07 | | 3.407E-07 |
| 0.1150 | 5.219 | | 3.182E-07 | | 3.203E-07 |
| 0.1175 | 5.259 | | 2.961E-07 | | 2.999E-07 |
| 0.1200 | 5.298 | | 2.766E-07 | | 2.795E-07 |
| 0.1225 | 5.341 | | 2.552E-07 | | 2.592E-07 |
| 0.1250 | 5.381 | | 2.362E-07 | | 2.388E-07 |
| 0.1275 | 5.425 | | 2.157E-07 | | 2.184E-07 |
| 0.1300 | 5.471 | | 1.953E-07 | | 1.980E-07 |
| 0.1325 | 5.516 | | 1.759E-07 | | 1.776E-07 |
| 0.1350 | 5.567 | | 1.548E-07 | | 1.572E-07 |
| 0.1375 | 5.618 | | 1.351E-07 | | 1.368E-07 |
| 0.1400 | 5.670 | | 1.157E-07 | | 1.164E-07 |
| 0.1425 | 5.726 | | 9.610E-08 | | 9.606E-08 |
| 0.1450 | 5.785 | | 7.645E-08 | | 7.567E-08 |
| 0.1475 | 5.849 | | 5.637E-08 | | 5.528E-08 |
| 0.1500 | 5.917 | | 3.672E-08 | | 3.489E-08 |
| 0.1525 | 5.991 | | 1.665E-08 | | 1.450E-08 |
| 0.1550 | 6.074 | | -3.881E-09 | | -5.885E-09 |
| 0.1575 | 6.167 | | -2.472E-08 | | -2.627E-08 |
| 0.1601 | 6.271 | | -4.553E-08 | | -4.748E-08 |
| 0.1625 | 6.388 | | -6.574E-08 | | -6.705E-08 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999892
VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= .154278
CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 8.15526E-06

PARA ACIDO HA2

| VOLUME | pH | FG | REFINADA | FG | AJUSTADA |
|--------|-------|----|-----------|----|-----------|
| 0.1650 | 6.537 | | 6.123E-09 | | 6.069E-09 |
| 0.1660 | 6.603 | | 5.322E-09 | | 5.279E-09 |
| 0.1670 | 6.679 | | 4.477E-09 | | 4.490E-09 |
| 0.1680 | 6.761 | | 3.664E-09 | | 3.700E-09 |
| 0.1690 | 6.853 | | 2.873E-09 | | 2.911E-09 |
| 0.1700 | 6.961 | | 2.047E-09 | | 2.122E-09 |

| | | | |
|--------|-------|------------|------------|
| 0.1710 | 7.072 | 1.309E-09 | 1.332E-09 |
| 0.1730 | 7.341 | -2.156E-10 | -2.466E-10 |
| 0.1740 | 7.488 | -9.796E-10 | -1.036E-09 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999809

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= .172688

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 7.89389E-07
PARA ACIDO HA3

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|-------|-------------|-------------|
| 0.1760 | 7.804 | 4.776E-11 | 4.860E-11 |
| 0.1770 | 7.939 | 3.686E-11 | 3.638E-11 |
| 0.1780 | 8.075 | 2.474E-11 | 2.417E-11 |
| 0.1790 | 8.207 | 1.210E-11 | 1.195E-11 |
| 0.1800 | 8.328 | -1.789E-13 | -2.713E-13 |
| 0.1810 | 8.443 | -1.280E-11 | -1.249E-11 |
| 0.1820 | 8.545 | -2.486E-11 | -2.471E-11 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999831

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= .179978

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.22184E-08
PARA ACIDO HA4

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.1890 | 9.046 | 7.741E-12 | 7.710E-12 |
| 0.1900 | 9.099 | 7.475E-12 | 7.445E-12 |
| 0.1910 | 9.150 | 7.186E-12 | 7.179E-12 |
| 0.1920 | 9.197 | 6.917E-12 | 6.913E-12 |
| 0.1930 | 9.244 | 6.608E-12 | 6.647E-12 |
| 0.1941 | 9.291 | 6.320E-12 | 6.355E-12 |
| 0.1950 | 9.329 | 6.087E-12 | 6.116E-12 |
| 0.1960 | 9.369 | 5.820E-12 | 5.850E-12 |
| 0.1980 | 9.445 | 5.313E-12 | 5.318E-12 |
| 0.2000 | 9.518 | 4.803E-12 | 4.787E-12 |
| 0.2020 | 9.585 | 4.328E-12 | 4.255E-12 |
| 0.2050 | 9.692 | 3.487E-12 | 3.458E-12 |
| 0.2075 | 9.780 | 2.773E-12 | 2.793E-12 |
| 0.2100 | 9.864 | 2.089E-12 | 2.129E-12 |
| 0.2125 | 9.944 | 1.453E-12 | 1.464E-12 |
| 0.2150 | 10.023 | 8.038E-13 | 7.996E-13 |
| 0.2175 | 10.104 | 1.237E-13 | 1.351E-13 |
| 0.2200 | 10.182 | -5.325E-13 | -5.294E-13 |
| 0.2225 | 10.256 | -1.168E-12 | -1.194E-12 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999945

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= .218008

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 2.658E-10
PARA ACIDO HA5

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.2275 | 10.405 | 5.820E-13 | 5.759E-13 |
| 0.2300 | 10.474 | 5.472E-13 | 5.365E-13 |
| 0.2325 | 10.545 | 5.065E-13 | 4.970E-13 |
| 0.2350 | 10.618 | 4.615E-13 | 4.576E-13 |
| 0.2375 | 10.689 | 4.180E-13 | 4.182E-13 |
| 0.2400 | 10.758 | 3.760E-13 | 3.788E-13 |
| 0.2425 | 10.827 | 3.333E-13 | 3.394E-13 |
| 0.2450 | 10.897 | 2.905E-13 | 3.000E-13 |
| 0.2475 | 10.962 | 2.509E-13 | 2.605E-13 |
| 0.2501 | 11.032 | 2.085E-13 | 2.195E-13 |
| 0.2525 | 11.093 | 1.719E-13 | 1.817E-13 |
| 0.2550 | 11.152 | 1.368E-13 | 1.423E-13 |
| 0.2575 | 11.213 | 9.906E-14 | 1.029E-13 |
| 0.2600 | 11.270 | 6.312E-14 | 6.344E-14 |
| 0.2627 | 11.332 | 2.223E-14 | 2.087E-14 |
| 0.2650 | 11.381 | -1.047E-14 | -1.540E-14 |
| 0.2675 | 11.432 | -4.558E-14 | -5.482E-14 |
| 0.2700 | 11.481 | -8.123E-14 | -9.423E-14 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999318

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5= .264023

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA5= 1.57675E-11

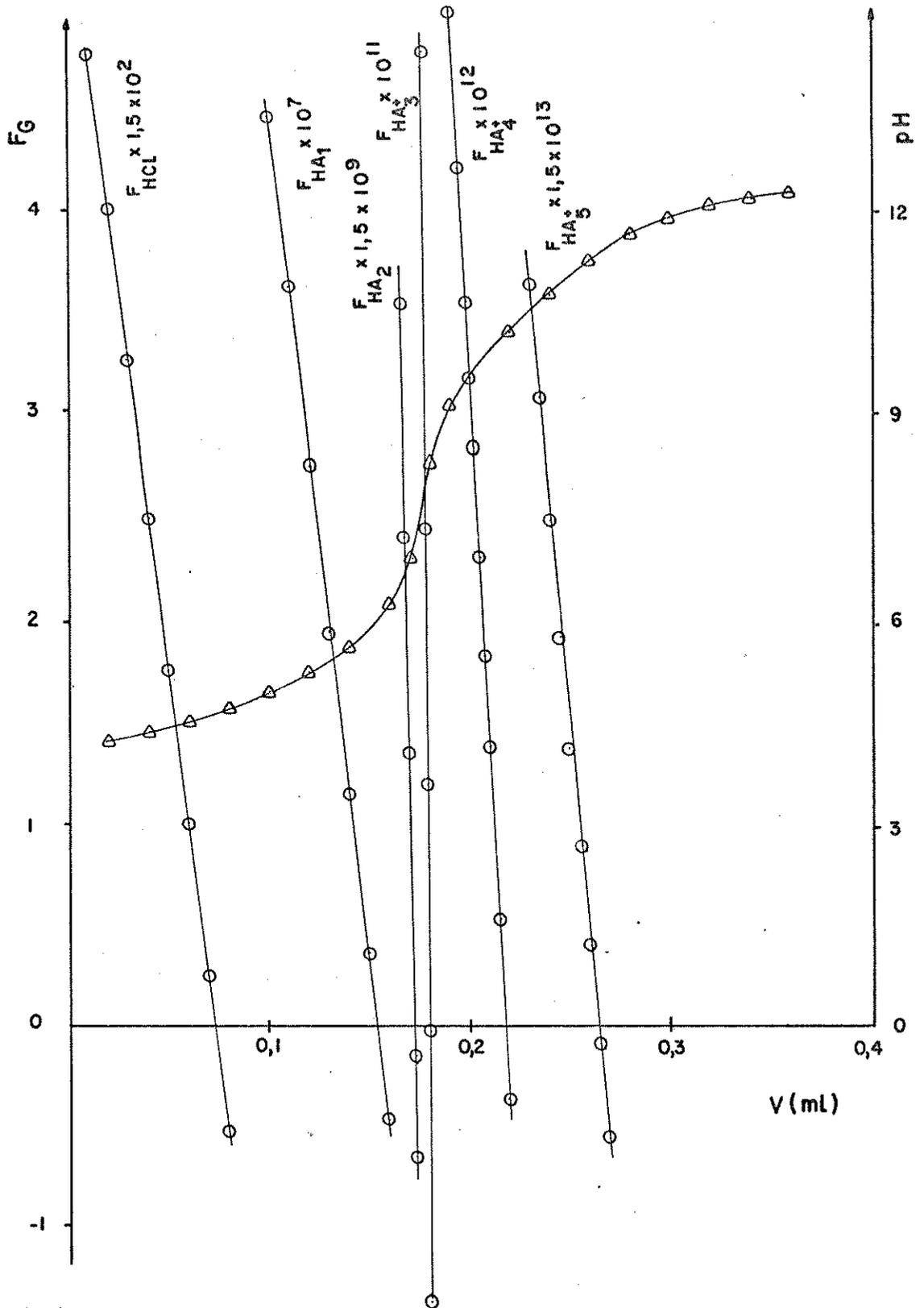


Fig. 15. Curvas de titulação da lisozima, cujos dados foram apresentados nas tabelas 13 e 14. (Δ) - curva de titulação normal (ordenada à direita); (O) - curva de titulação linearizada (ordenada à esquerda)

Tab. 15. Composição de grupos tituláveis da lisozima desnaturada em uréia 9,30 M e força iônica 0,10 M

| Série de Grupos | N ^{a,b} | Grupo | Seq. de (61) Aminoácidos |
|------------------------------|------------------------------------|----------|--------------------------|
| HA ₁ | 9,9 ₂ ±0,2 ₃ | Carbox. | 10 |
| HA ₂ | 1,9 ₂ ±0,1 ₆ | Imidazol | 1 |
| HA ₃ ⁺ | 0,65±0,08 | α-Amino | 1 |
| HA ₄ ⁺ | 2,9 ₉ ±0,3 ₇ | Fenólico | 3 |
| HA ₅ ⁺ | 5,1 ₉ ±0,2 ₇ | ε-Amino | 6 |
| | | Total | 21 |

a. - nº de grupos/mol de lisozima

b - média de 4 determinações

Tab. 16. Valores de K_a determinados para os grupos tituláveis da lisozima em uréia 9,30 M e força iônica 0,10 M

| Grupo | K _a [*] | pK _a |
|------------------------------|---|-----------------|
| HA ₁ | (7,6 ₈ ±0,2 ₄)x10 ⁻⁶ | 5,11 |
| HA ₂ | (7,6 ₈ ±0,4 ₉)x10 ⁻⁷ | 6,11 |
| HA ₃ ⁺ | (1,4 ₄ ±0,3 ₀)x10 ⁻⁸ | 7,84 |
| HA ₄ ⁺ | (2,5 ₇ ±0,3 ₀)x10 ⁻¹⁰ | 9,59 |
| HA ₅ ⁺ | (1,5 ₁ ±0,1 ₄)x10 ⁻¹¹ | 10,82 |

* - média de 4 determinações

res 4,6 e 4,4 para o pK_{int} dos grupos carboxílicos da lisozima, desnaturada numa mistura de $GuHCl$ e uréia com concentrações relativas que permitissem reproduzir o valor encontrado em KCl 0,1 M. O maior valor determinado neste trabalho é concordante com o aumento no pK dos grupos carboxílicos em uréia, observado por outros pesquisadores (29,64,72).

A estequiometria do grupo HA_1 é também concordante com o número de grupos carboxílicos dado pela seqüência de aminoácidos. Titulações anteriores da lisozima desnaturada, feitas em outros laboratórios (72,73), indicam que todos os grupos carboxílicos são titulados com valores normais de pK_{int} .

Não parece haver dúvidas de que em uréia os grupos carboxílicos são normais e apresentam $pK_a = 5,11$.

Na região neutra da curva de titulação, pH 6 - 8,5, devem ser titulados os grupos imidazol e α -amino. A lisozima possui 1 grupo de cada. Nessa região de pH , foram tituladas duas séries de grupos, HA_2 e HA_3^+ ($pK_{HA_2} = 6,11$; $pK_{HA_3^+} = 7,84$). Nesse caso, a composição das séries de grupos não confere com a seqüência da aminoácidos. O número de grupos HA_2 é 2 e um deles é certamente o grupo imidazol. O pK' do grupo imidazol na lisozima nativa encontra-se entre 5,2-5,8 (61). Como em uréia esse valor é maior, o número determinado neste trabalho indica que também o grupo imidazol é titulado normalmente em uréia.

A presença de outro grupo com $pK_a = 6,11$ é intrigante. Esse valor é muito mais baixo que o pK_{int} de um grupo α -amino, fenólico ou ϵ -amino normal. Poder-se-ia pensar que esse grupo fosse mais um carboxílico, pois na titulação da lisozima nati-

va foi detectada a presença de um grupo carboxílico com $pK' = 6-6,5$ (16,61). Constatou-se, entretanto, que esse grupo é normalizado por desnaturação. Além disso, a aceitação de um grupo carboxílico a mais vai de encontro ao resultado da seqüência de aminoácidos.

O pK_a do grupo HA_3^+ aproxima-se do valor de pK_a de um grupo α -amino normal.

Em trabalhos anteriores, não se observou a ocorrência de interações que pudessem alterar os comportamentos ionizantes dos grupos aminos da lisozima. Todavia, resultados recentes da titulação desses grupos seguida por ressonância magnética nuclear demonstram que dois grupos estão envolvidos na formação de par iônico com grupos carboxílicos e que a destruição dessa interação pode diminuir os valores de seus pK_s (84).

Os grupos fenólicos são reconhecidamente anormais na lisozima nativa (12). Esse comportamento se mantém também na lisozima desnaturada em uréia (72). A anomalia observada, porém, aponta um deslocamento da titulação dos fenólicos para regiões mais básicas.

O aparecimento desse grupo não pode ser atribuído à contribuição das impurezas da uréia, pois, apesar da primeira impureza começar a ser titulada na mesma região da série HA_2 , o volume gasto para titular a impureza foi descontado na ocasião do cálculo da composição do grupo. Mesmo que isto não tivesse sido feito, a contribuição da impureza seria apenas de $\approx 0,13$ grupo/mol de lisozima.

Dados somente da titulação potenciométrica não são sufi-

cientes para a identificação de um dos grupos que é titulado em HA_2 e do grupo que é titulado como HA_3^+ . Pode-se concluir, porém, que em uréia 9,30 M, os grupos imidazol e α -amino são titulados na faixa de pH previsível. Também se pode concluir que um grupo ϵ -amino ou fenólico é encontrado numa região de pH abaixo da normal.

Os grupos fenólicos e ϵ -amino são titulados juntos na região básica, pH 8,5-11. Para se saber a contribuição dos grupos fenólicos, faz-se geralmente uma titulação espectrofotométrica. O número de grupos ϵ -amino é achado por diferença.

As curvas de titulação obtidas neste trabalho mostraram que, nessa região, são tituladas duas séries de grupos, HA_4^+ e HA_5^+ , com valores de pK_a 9,59 e 10,82 respectivamente. O total de grupos nessas duas séries é de 8,1. Somando-se esse total à fração de grupo fenólico ou ϵ -amino que foi deslocado para a região superior, o balanço dos grupos básicos fica semelhante ao da seqüência de aminoácidos.

O total de grupos encontrados na titulação da lisozima em uréia 9,30 M ($20,67 \pm 0,2$ g) grupos/mol aproxima-se bastante dos 21 grupos/mol dados pela seqüência de aminoácidos. Isso indica que não existem grupos mascarados na lisozima em uréia 9,30 M. Como a presença de tais grupos foi detectada na lisozima nativa, pode-se concluir que soluções de uréia 9,30 M são efetivas em desnaturar a proteína. O resultado mais polêmico desta análise é a presença de um grupo ϵ -amino ou fenólico na região de titulação dos grupos imidazol e α -amino.

As precisões dos resultados da titulação da histidina (ta

bela 12) foram melhores que as precisões dos resultados da lisozima. A diminuição da precisão dos resultados da titulação da proteína já era prevista por causa da complexidade estrutural da molécula. O desvio médio absoluto no número de grupos/mol foi sempre menor que 0,4₀ unidade. O desvio médio relativo foi maior nas séries que são tituladas na zona de transição entre a região neutra e alcalina (HA_3^+ e HA_4^+ ; $\bar{d}_r \approx 12\%$). Sempre acontece menor precisão na determinação dos grupos titulados na região neutra. Existem duas causas: 1) há a sobreposição das regiões de titulação; 2) o número de grupos titulados na região é relativamente pequeno.

Foi feita uma investigação do efeito de um erro sistemático de $\pm 0,5$ mV na força eletromotriz medida sobre o número de grupos/mol e o valor de K_a de cada série de grupos determinados da lisozima. O erro relativo em cada resultado é apresentado na tabela 17.

Tab. 17. Efeito de um erro sistemático na f.e.m. sobre a determinação do número de grupos/mol (N) e K_a da lisozima desnaturada em uréia 9,30 M. $\Delta E = \pm 0,5$ mV.

| Série de Grupos | Erro, % na determinação de: | |
|-----------------|-----------------------------|-------|
| | N | K_a |
| HA_1 | 1,0 | 1,1 |
| HA_2 | 2,8 | 0,3 |
| HA_3^+ | 1,5 | 1,8 |
| HA_4^+ | 0,6 | 1,7 |
| HA_5^+ | 1,0 | 0,6 |

A influência de um erro sistemático na f.e.m. medida é maior nos grupos da região central da curva de titulação.

Com o objetivo de ilustrar a dependência da interpretação dos dados de curvas de titulação de proteínas sobre resultados obtidos de estudos de outra natureza, foi feita uma outra interpretação dos resultados das tabelas 15 e 16, tomando como base a seqüência de aminoácidos de Canfield⁽⁶⁸⁾. Como foi citado anteriormente, a única diferença na contagem dos grupos tituláveis é a presença de mais um grupo carboxílico, elevando o resultado a 11 carboxílicos.

Considerando-se que os grupos são titulados nas mesmas faixas de pH citadas antes, concluiríamos que cerca de 10 grupos carboxílicos são titulados na região ácida com $pK_a = 5,11$, como a série HA_1 . Na região neutra, os quase 3 grupos encontrados nas duas séries HA_2 e HA_3^+ poderiam ser identificados como sendo 1 grupo imidazol normal com $pK_a = 6,11$ e um grupo carboxílico anormal com o mesmo pK_a . Isso fecharia o balanço dos grupos carboxílicos e também mostraria que a desnaturação em uréia, mesmo em concentração tão alta, não normaliza o comportamento desse grupo, ao contrário do que foi observado em GuHCl.

O outro grupo com $pK_a = 7,68$ seria com certeza o grupo α -amino.

Na região alcalina, os quase 8 grupos determinados nas séries HA_4^+ e HA_5^+ corresponderiam à soma de 2 grupos fenólicos e 6 grupos ϵ -amino. A existência de um grupo fenólico que permanece mascarado em uréia 9,30 M seria facilmente explicável.

Donovan e colaboradores⁽⁷²⁾ relataram que, frente titulação espectrofotométrica, o comportamento dos grupos fenólicos da lisozima em uréia 9 M, com aquecimento a 50°C é igual ao comportamento desses grupos na lisozima nativa. Várias determinações espectrofotométricas dos grupos fenólicos da lisozima nativa concluíram que um dos grupos só é titulado a pH > 12, não sendo, portanto, detectável por titulação potenciométrica^(61,63,75,85). Aí ficaria demonstrado mais uma vez a desnaturação incompleta da lisozima em uréia 9,30 M.

Com esta interpretação, baseada na seqüência de aminoácidos de Canfield, a explicação dos comportamentos das séries de grupos frente à titulação é mais coerente com o comportamento normal. Os resultados são também perfeitamente explicáveis e confirmados por trabalhos anteriores. Diante disso, a polêmica quanto à existência de 10 ou 11 grupos carboxílicos na lisozima não parece ser um assunto encerrado.

VI. OVALBUMINA DESNATURADA EM URÉIA 8,00 M

VI.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A primeira publicação sobre curvas de titulação de proteínas apareceu em 1898 e tratava da ovalbumina⁽⁷⁾. Foi ela também a proteína cuja curva de titulação foi analisada pela primeira vez com a teoria de Linderstrøm-Lang^(10,86). Também foi na ovalbumina que se revelou pela primeira vez a existência de grupos fenólicos mascarados em proteínas nativas⁽¹⁴⁾.

Apesar de vir sendo objeto de estudos já por muito anos, a sua seqüência completa de aminoácidos só foi desvendada recentemente⁽⁸⁷⁾. A ovalbumina é constituída por uma só cadeia polipeptídica, contendo 385 resíduos de aminoácidos. A forma da molécula é elipsoidal. Possui ainda uma ponte de dissulfeto, uma cadeia lateral de carboidratos, resíduos de fosfato e 4 grupos sulfidrílicos livres.

As preparações de ovalbumina são heterogêneas e constituídas por 3 componentes, que contêm respectivamente 0, 1 e 2 grupos fosfato por mol de proteína⁽⁸⁸⁾.

Na análise da curva de titulação da ovalbumina nativa feita por Cannan e colaboradores⁽⁸⁶⁾, foram determinados 51 grupos carboxílicos, 4 grupos imidazol, 1 grupo fosfato, 23 grupos aminos e 14 grupos guanidínicos. Comparando-os com os números de grupos da composição de aminoácidos disponível na época, esses resultados pareciam estar corretos apenas nos núme-

ros de grupos imidazóis e guanidínicos. Os valores referentes aos grupos carboxílicos e aminos revelaram-se cerca de 50% maiores que os números da composição de aminoácidos. Todavia, se aqueles resultados forem comparados com a seqüência de aminoácidos disponível atualmente, constata-se que a maioria desses resultados estão muito próximos do valor real.

Outro resultado importante trazido por esse trabalho, que gerou pesquisas e descobertas de interesse para a química das proteínas, foi a não titulação dos grupos fenólicos da proteína nativa. A ovalbumina contém 10 grupos fenólicos. Crammer e Neuberger⁽¹⁴⁾ introduziram um método espectrofotométrico para a determinação dos grupos fenólicos de proteínas e confirmaram a não ionização desses grupos na ovalbumina, na faixa de pH 9-12. Somente após a desnaturação da proteína a pH 13, observou-se a ionização dos mesmos. Na proteína desnaturada por aquecimento ou por tratamento com uréia, a titulação dos grupos fenólicos ocorreu na faixa normal.

A liberação dos grupos fenólicos da ovalbumina em GuHCl foi registrada também por Harrington⁽⁸⁹⁾, que observou, ao mesmo tempo, o aparecimento de 8 grupos carboxílicos que poderiam estar mascarados na proteína nativa. Essa constatação contraria o que foi determinado por Cannan e colaboradores⁽⁸⁶⁾. Segundo esses autores, todos os grupos carboxílicos foram titulados na proteína nativa, com o mesmo valor de pK_{int} .

Resultados posteriores mostraram o mascaramento de alguns grupos carboxílicos na ovalbumina nativa. Um estudo da variação do volume da proteína provocada pela ionização de seus grupos indicou que 44,5 grupos carboxílicos são ionizados entre

pH 2-5,5⁽⁹⁰⁾. Notaram-se também anormalidades na ionização dos grupos imidazóis. Na titulação potenciométrica da ovalbumina nativa feita neste grupo⁽⁵²⁾, foram determinados 43,2 grupos carboxílicos, enquanto que, na titulação da proteína desnaturada em uréia 8,00 M, foram encontrados 46,94 grupos carboxílicos⁽²³⁾.

Esse resultado encontrado em uréia 8,00 M é perfeitamente concordante com a soma dos resíduos Asp e Glu presentes na ovalbumina⁽⁸⁷⁾. O total de grupos titulados na ovalbumina desnaturada em uréia, entretanto, foi superior à soma dos resíduos Asp, Glu, His, Lys e Tyr da seqüência de aminoácidos. Cerca de 3 grupos, de natureza desconhecida, foram titulados na região dos grupos imidazóis.

O aparecimento desses grupos a mais na titulação da ovalbumina desnaturada exigiu a continuação das investigações sobre o sistema, com o objetivo de se buscar a origem do erro ou a explicação do fato.

Por causa disso, foi reexaminado todo o processo de calibração dos eletrodos em soluções de uréia, conforme foi apresentado no capítulo III deste trabalho. Outras titulações da ovalbumina foram também realizadas, reproduzindo ao máximo as condições iniciais das titulações anteriores, com a diferença de se usar agora soluções titulantes de NaOH em concentrações dez vezes maiores que as das experiências anteriores.

Essas providências foram tomadas a fim de se investigar a existência de possíveis erros causados pelo procedimento de calibração dos eletrodos e pela variação do meio iônico, provoca

da pela utilização do titulante mais diluído.

VI.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos utilizados na preparação das soluções de ovalbumina e na determinação de suas concentrações foram descritos no item III.2.3.

As concentrações das soluções situaram-se na faixa $(6,556 - 8,250) \times 10^{-5}$ M. A massa molecular da proteína utilizada nos cálculos foi de 42 699⁽⁸⁷⁾.

A desnaturação da ovalbumina por soluções de uréia é um processo lento. Em uréia 8 M, o equilíbrio é alcançado após 100 minutos^(91,92). Por isso, as titulações foram iniciadas após duas horas de contato da proteína com a solução de uréia. As titulações foram feitas com soluções de NaOH 1,139 ou 1,200 M, contendo KCl 0,10 M.

A tabela 18 apresenta os dados de uma dessas titulações. Os dados da curva linearizada da mesma titulação são mostrados na tabela 19. As curvas de titulação normal e linearizada são ilustradas na figura 16.

Os resultados deste estudo, representados pela média aritmética de 5 determinações, são apresentados nas tabelas 20 e 21 e comparados com os resultados obtidos por Vasconcelos⁽²³⁾. A tabela 20 traz a estequiometria das séries de grupos titulados e a tabela 21, os valores de K_a e pK_a das respectivas séries.

As curvas de titulação linearizadas mostraram que a ioni-

Tab. 18. Dados da titulação potenciométrica de 0,11197 g de Ovalbumina em 40,00 ml de solução de uréia 8,00 M, em excesso de ácido (adição de 0,290 milimol de HCl) e em KCl 0,10 M, com solução de NaOH 1,139 M. ($E_{Oa}^0 = 337,0$ mV; $E_{Ob}^0 = -434,0$ mV; $j_H = 0,0$ mV/M; $j_{OH} = 0,0$ mV/M).

| VOLUME | E(mV) | pH | VOLUME | E(mV) | pH |
|--------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 0.0100 | 194.8 | 3.962 | 0.2550 | -64.1 | 8.336 |
| 0.0200 | 193.1 | 3.991 | 0.2575 | -74.9 | 8.518 |
| 0.0300 | 191.2 | 4.023 | 0.2600 | -74.9 | 8.518 |
| 0.0400 | 189.2 | 4.056 | 0.2625 | -83.4 | 8.682 |
| 0.0500 | 187.2 | 4.090 | 0.2650 | -90.8 | 8.787 |
| 0.0600 | 184.9 | 4.129 | 0.2675 | -96.8 | 8.888 |
| 0.0700 | 182.5 | 4.169 | 0.2700 | -102.7 | 8.988 |
| 0.0800 | 179.9 | 4.213 | 0.2725 | -107.7 | 9.072 |
| 0.0900 | 177.2 | 4.259 | 0.2750 | -112.4 | 9.152 |
| 0.1000 | 174.2 | 4.309 | 0.2775 | -116.6 | 9.223 |
| 0.1100 | 170.9 | 4.365 | 0.2800 | -120.8 | 9.294 |
| 0.1200 | 167.3 | 4.426 | 0.2825 | -124.8 | 9.361 |
| 0.1251 | 165.3 | 4.459 | 0.2850 | -128.6 | 9.426 |
| 0.1301 | 163.3 | 4.493 | 0.2875 | -132.1 | 9.485 |
| 0.1350 | 161.1 | 4.530 | 0.2900 | -135.7 | 9.546 |
| 0.1400 | 158.8 | 4.569 | 0.2925 | -139.3 | 9.606 |
| 0.1450 | 156.4 | 4.610 | 0.2950 | -142.7 | 9.664 |
| 0.1500 | 153.8 | 4.654 | 0.2975 | -146.4 | 9.726 |
| 0.1552 | 151.0 | 4.701 | 0.2996 | -149.6 | 9.780 |
| 0.1600 | 148.4 | 4.745 | 0.3001 | -153.0 | 9.838 |
| 0.1651 | 145.4 | 4.795 | 0.3026 | -156.2 | 9.892 |
| 0.1700 | 142.1 | 4.851 | 0.3050 | -159.4 | 9.946 |
| 0.1750 | 138.7 | 4.908 | 0.3075 | -162.7 | 10.002 |
| 0.1800 | 134.9 | 4.973 | 0.3100 | -166.0 | 10.058 |
| 0.1850 | 131.1 | 5.037 | 0.3125 | -169.2 | 10.112 |
| 0.1903 | 126.2 | 5.120 | 0.3150 | -172.4 | 10.166 |
| 0.1950 | 122.0 | 5.191 | 0.3175 | -175.7 | 10.221 |
| 0.1975 | 119.4 | 5.234 | 0.3200 | -178.8 | 10.274 |
| 0.2000 | 116.7 | 5.280 | 0.3225 | -182.0 | 10.328 |
| 0.2026 | 113.8 | 5.329 | 0.3250 | -185.1 | 10.380 |
| 0.2050 | 111.0 | 5.376 | 0.3276 | -188.3 | 10.434 |
| 0.2075 | 108.0 | 5.427 | 0.3300 | -191.2 | 10.483 |
| 0.2100 | 104.4 | 5.488 | 0.3327 | -194.4 | 10.537 |
| 0.2125 | 101.1 | 5.544 | 0.3352 | -197.4 | 10.588 |
| 0.2150 | 97.2 | 5.610 | 0.3375 | -200.1 | 10.634 |
| 0.2186 | 91.1 | 5.713 | 0.3400 | -203.1 | 10.684 |
| 0.2200 | 88.7 | 5.753 | 0.3425 | -205.8 | 10.730 |
| 0.2225 | 83.6 | 5.839 | 0.3450 | -208.6 | 10.777 |
| 0.2250 | 78.1 | 5.932 | 0.3475 | -211.5 | 10.826 |
| 0.2275 | 72.0 | 6.035 | 0.3502 | -214.6 | 10.879 |
| 0.2300 | 65.1 | 6.152 | 0.3526 | -217.1 | 10.921 |
| 0.2325 | 57.5 | 6.280 | 0.3550 | -219.7 | 10.965 |
| 0.2350 | 49.1 | 6.422 | 0.3576 | -223.3 | 11.026 |
| 0.2377 | 38.8 | 6.596 | 0.3600 | -224.9 | 11.053 |
| 0.2405 | 27.0 | 6.796 | 0.3625 | -227.3 | 11.093 |
| 0.2425 | 17.4 | 6.958 | 0.3650 | -229.7 | 11.134 |
| 0.2450 | 4.4 | 7.178 | 0.3675 | -232.1 | 11.174 |
| 0.2455 | 1.4 | 7.229 | 0.3700 | -234.4 | 11.213 |
| 0.2460 | -1.7 | 7.281 | 0.3725 | -236.6 | 11.250 |
| 0.2465 | -5.0 | 7.337 | 0.3750 | -238.7 | 11.286 |
| 0.2470 | -8.4 | 7.394 | 0.3775 | -240.8 | 11.321 |
| 0.2475 | -11.6 | 7.448 | 0.3800 | -242.9 | 11.357 |
| 0.2481 | -16.1 | 7.524 | 0.3825 | -244.6 | 11.391 |
| 0.2487 | -21.5 | 7.616 | 0.3850 | -246.6 | 11.419 |
| 0.2491 | -24.9 | 7.673 | 0.3900 | -250.1 | 11.478 |
| 0.2500 | -32.1 | 7.795 | 0.3950 | -253.3 | 11.532 |
| 0.2505 | -36.8 | 7.874 | 0.4000 | -256.3 | 11.583 |
| 0.2510 | -40.2 | 7.932 | 0.4101 | -261.6 | 11.672 |
| 0.2515 | -44.1 | 7.998 | 0.4200 | -266.0 | 11.747 |
| 0.2521 | -48.0 | 8.064 | 0.4300 | -269.9 | 11.813 |
| 0.2525 | -51.0 | 8.114 | 0.4400 | -273.5 | 11.873 |
| 0.2530 | -53.4 | 8.155 | 0.4500 | -276.5 | 11.924 |
| 0.2535 | -56.2 | 8.202 | 0.4600 | -279.4 | 11.973 |
| 0.2540 | -59.1 | 8.251 | 0.4702 | -281.9 | 12.015 |
| 0.2545 | -61.6 | 8.293 | 0.4803 | -284.3 | 12.055 |
| | | | 0.4900 | -286.3 | 12.089 |

Tab. 19. Dados da curva de titulação linearizada da Ovalbumina em uréia 8,00 M, cujos parâmetros foram apresentados na tabela 18.

| FUNCOES DE GRAN MODIFICADAS PARA HCL | | | |
|---|-------|-------------|-------------|
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.0100 | 3.962 | 1.429E-01 | 1.488E-01 |
| 0.0200 | 3.991 | 1.321E-01 | 1.374E-01 |
| 0.0300 | 4.023 | 1.208E-01 | 1.260E-01 |
| 0.0400 | 4.056 | 1.097E-01 | 1.146E-01 |
| 0.0500 | 4.090 | 9.923E-02 | 1.032E-01 |
| 0.0600 | 4.129 | 8.800E-02 | 9.183E-02 |
| 0.0700 | 4.169 | 7.711E-02 | 8.044E-02 |
| 0.0800 | 4.213 | 6.616E-02 | 6.905E-02 |
| 0.0900 | 4.259 | 5.564E-02 | 5.766E-02 |
| 0.1000 | 4.309 | 4.485E-02 | 4.627E-02 |
| 0.1100 | 4.365 | 3.393E-02 | 3.488E-02 |
| 0.1200 | 4.426 | 2.302E-02 | 2.349E-02 |
| 0.1251 | 4.459 | 1.735E-02 | 1.768E-02 |
| 0.1301 | 4.493 | 1.194E-02 | 1.198E-02 |
| 0.1350 | 4.530 | 6.265E-03 | 6.403E-03 |
| 0.1400 | 4.569 | 6.131E-04 | 7.084E-04 |
| 0.1450 | 4.610 | -5.000E-03 | -4.987E-03 |
| 0.1500 | 4.654 | -1.078E-02 | -1.068E-02 |
| 0.1552 | 4.701 | -1.668E-02 | -1.660E-02 |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .140622 | | | |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999978 | | | |
| PARA ACIDO HA1 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.1600 | 4.745 | 1.127E-06 | 1.120E-06 |
| 0.1651 | 4.795 | 1.039E-06 | 1.028E-06 |
| 0.1700 | 4.851 | 9.414E-07 | 9.402E-07 |
| 0.1750 | 4.908 | 8.517E-07 | 8.502E-07 |
| 0.1800 | 4.973 | 7.557E-07 | 7.602E-07 |
| 0.1850 | 5.037 | 6.705E-07 | 6.703E-07 |
| 0.1903 | 5.120 | 5.644E-07 | 5.749E-07 |
| 0.1950 | 5.191 | 4.860E-07 | 4.903E-07 |
| 0.1975 | 5.234 | 4.393E-07 | 4.453E-07 |
| 0.2000 | 5.280 | 3.937E-07 | 4.003E-07 |
| 0.2026 | 5.329 | 3.479E-07 | 3.536E-07 |
| 0.2050 | 5.376 | 3.063E-07 | 3.104E-07 |
| 0.2075 | 5.427 | 2.646E-07 | 2.654E-07 |
| 0.2100 | 5.488 | 2.168E-07 | 2.204E-07 |
| 0.2125 | 5.544 | 1.770E-07 | 1.754E-07 |
| 0.2150 | 5.610 | 1.324E-07 | 1.304E-07 |
| 0.2184 | 5.713 | 6.915E-08 | 6.565E-08 |
| 0.2200 | 5.753 | 4.628E-08 | 4.046E-08 |
| 0.2225 | 5.839 | 2.631E-10 | -4.530E-09 |
| 0.2250 | 5.932 | -4.503E-08 | -4.952E-08 |
| 0.2275 | 6.035 | -9.080E-08 | -9.450E-08 |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999896 | | | |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= .222248 | | | |
| CONSTANTE DE DISSOCIACAO F/HA1= 1.79944E-05 | | | |
| PARA ACIDO HA2 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.2300 | 6.152 | 9.987E-09 | 9.919E-09 |
| 0.2325 | 6.280 | 7.245E-09 | 7.268E-09 |
| 0.2350 | 6.422 | 4.573E-09 | 4.617E-09 |
| 0.2377 | 6.596 | 1.683E-09 | 1.754E-09 |
| 0.2405 | 6.796 | -1.197E-09 | -1.215E-09 |
| 0.2425 | 6.958 | -3.286E-09 | -3.336E-09 |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999942 | | | |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= .239354 | | | |

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|-------|-------------|-------------|
| 0.2455 | 7.229 | 4.964E-10 | 4.936E-10 |
| 0.2460 | 7.281 | 4.472E-10 | 4.443E-10 |
| 0.2465 | 7.337 | 3.964E-10 | 3.949E-10 |
| 0.2470 | 7.394 | 3.467E-10 | 3.456E-10 |
| 0.2475 | 7.448 | 3.034E-10 | 2.962E-10 |
| 0.2481 | 7.524 | 2.426E-10 | 2.370E-10 |
| 0.2487 | 7.616 | 1.713E-10 | 1.778E-10 |
| 0.2491 | 7.673 | 1.293E-10 | 1.383E-10 |
| 0.2500 | 7.795 | 4.373E-11 | 4.945E-11 |
| 0.2505 | 7.874 | -1.339E-11 | 1.013E-13 |
| 0.2510 | 7.932 | -5.379E-11 | -4.925E-11 |
| 0.2515 | 7.998 | -1.029E-10 | -9.861E-11 |
| 0.2521 | 8.064 | -1.537E-10 | -1.578E-10 |
| 0.2525 | 8.114 | -1.958E-10 | -1.973E-10 |
| 0.2530 | 8.155 | -2.299E-10 | -2.467E-10 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999528

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= .250501

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 9.87076E-08
PARA ACIDO HA4

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.2625 | 8.787 | 1.807E-11 | 1.753E-11 |
| 0.2630 | 8.888 | 1.697E-11 | 1.648E-11 |
| 0.2675 | 8.988 | 1.548E-11 | 1.543E-11 |
| 0.2700 | 9.072 | 1.432E-11 | 1.438E-11 |
| 0.2725 | 9.152 | 1.315E-11 | 1.334E-11 |
| 0.2750 | 9.223 | 1.213E-11 | 1.229E-11 |
| 0.2775 | 9.294 | 1.100E-11 | 1.124E-11 |
| 0.2800 | 9.361 | 9.903E-12 | 1.019E-11 |
| 0.2825 | 9.426 | 8.859E-12 | 9.147E-12 |
| 0.2850 | 9.485 | 7.924E-12 | 8.099E-12 |
| 0.2875 | 9.546 | 6.900E-12 | 7.052E-12 |
| 0.2900 | 9.606 | 5.852E-12 | 6.004E-12 |
| 0.2925 | 9.664 | 4.877E-12 | 4.957E-12 |
| 0.2951 | 9.726 | 3.772E-12 | 3.857E-12 |
| 0.2976 | 9.780 | 2.850E-12 | 2.820E-12 |
| 0.3001 | 9.838 | 1.828E-12 | 1.772E-12 |
| 0.3026 | 9.892 | 8.739E-13 | 7.249E-13 |
| 0.3050 | 9.946 | -1.082E-13 | -2.807E-13 |
| 0.3075 | 10.002 | -1.133E-12 | -1.328E-12 |
| 0.3100 | 10.058 | -2.174E-12 | -2.376E-12 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999275

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= .30433

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 4.1899E-10
PARA ACIDO HA5

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.3200 | 10.274 | 1.169E-12 | 1.140E-12 |
| 0.3225 | 10.328 | 1.100E-12 | 1.081E-12 |
| 0.3250 | 10.380 | 1.036E-12 | 1.022E-12 |
| 0.3276 | 10.434 | 9.683E-13 | 9.613E-13 |
| 0.3300 | 10.483 | 9.075E-13 | 9.050E-13 |
| 0.3327 | 10.537 | 8.408E-13 | 8.416E-13 |
| 0.3352 | 10.588 | 7.765E-13 | 7.829E-13 |
| 0.3375 | 10.634 | 7.194E-13 | 7.289E-13 |
| 0.3400 | 10.684 | 6.543E-13 | 6.702E-13 |
| 0.3425 | 10.730 | 6.003E-13 | 6.115E-13 |
| 0.3450 | 10.777 | 5.418E-13 | 5.529E-13 |
| 0.3475 | 10.826 | 4.794E-13 | 4.942E-13 |
| 0.3502 | 10.879 | 4.128E-13 | 4.308E-13 |
| 0.3526 | 10.921 | 3.614E-13 | 3.744E-13 |
| 0.3550 | 10.965 | 3.061E-13 | 3.181E-13 |
| 0.3576 | 11.026 | 2.212E-13 | 2.571E-13 |
| 0.3600 | 11.053 | 1.946E-13 | 2.007E-13 |
| 0.3625 | 11.093 | 1.430E-13 | 1.420E-13 |
| 0.3650 | 11.134 | 8.992E-14 | 8.335E-14 |
| 0.3675 | 11.174 | 3.513E-14 | 2.466E-14 |
| 0.3700 | 11.213 | -1.850E-14 | -3.403E-14 |
| 0.3725 | 11.250 | -7.112E-14 | -9.271E-14 |
| 0.3750 | 11.286 | -1.228E-13 | -1.514E-13 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999148

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5= .368551

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA5= 2.34752E-11

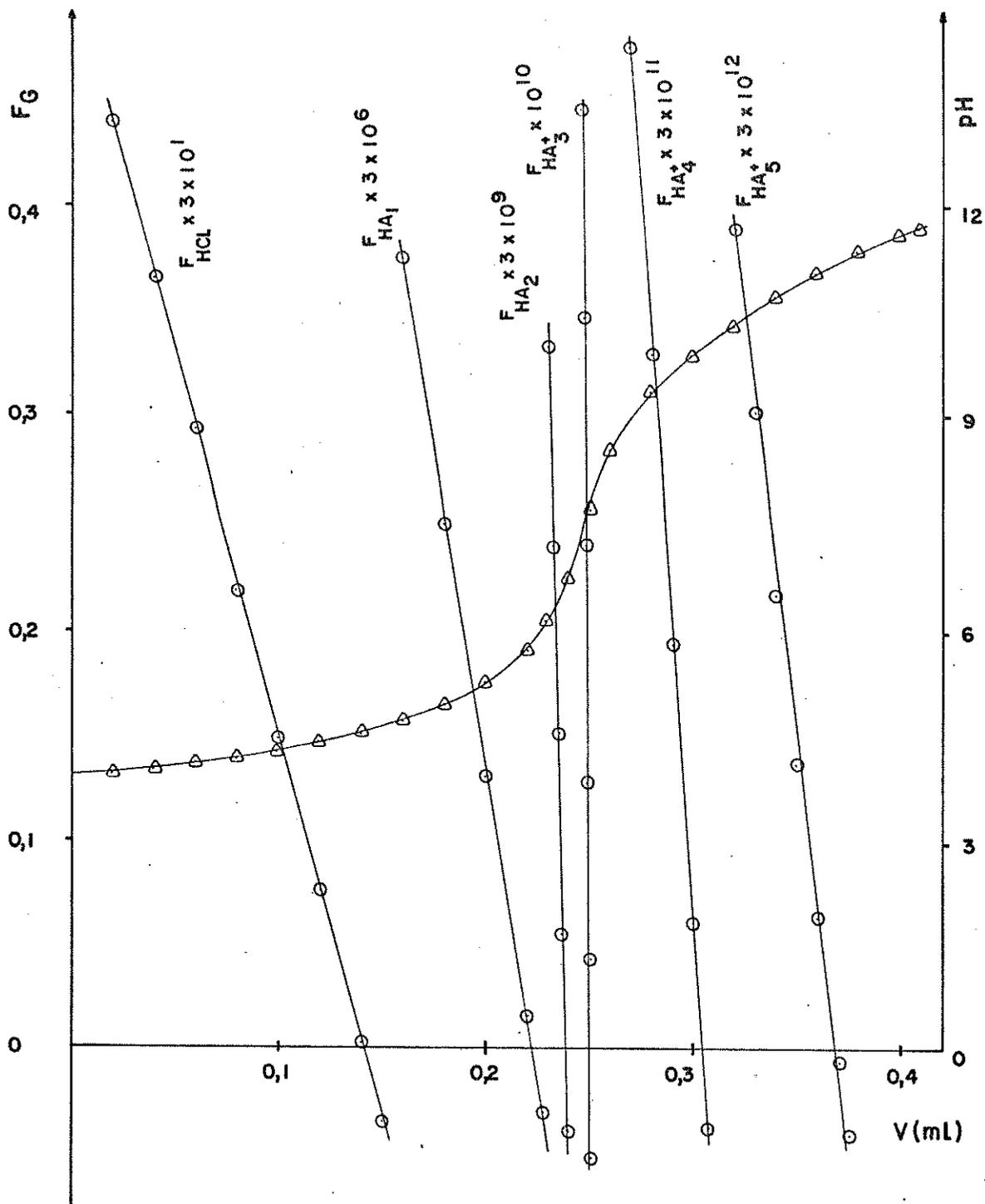


Fig. 16. Curvas de titulação da Ovalbumina em uréia 8,00 M, cujos dados foram apresentados nas tabelas 18 e 19. (Δ) - curva de titulação normal (ordenada à direita). (\circ) - curva de titulação linearizada (ordenada à esquerda).

Tab. 20. Estequiometria das séries de grupos titulados na Ovalbumina desnaturada em uréia 8,00 M e força iônica 0,10 M.

| Série de Grupos | N ^{a,b} | Ref.23 | Sequência de Aminoácidos(87) | |
|------------------------------|-------------------------------------|--------|------------------------------|----------------|
| | | | Grupo | N ^a |
| HA ₁ | 34,9 ₂ ±0,3 ₆ | 38,69 | Asp | 14 |
| HA ₂ | 7,4 ₂ ±0,1 ₅ | 8,24 | Glu | 33 |
| HA ₃ ⁺ | 4,19±0,09 | 14,88 | His | 7 |
| HA ₄ ⁺ | 16,4 ₃ ±0,7 ₉ | 27,59 | Cys | 4 |
| HA ₅ ⁺ | 25,5 ₀ ±0,3 ₅ | | Tyr | 10 |
| | | | Lys | 20 |

a - número de grupos/mol

b - média de 5 determinações

Tab. 21. Valores de K_a e pK_a determinados para as séries de grupos titulados na Ovalbumina em uréia 8,00 M e força iônica 0,10 M

| Série de Grupos | K _a [*] | pK _a | |
|------------------------------|---|-----------------|--------|
| | | | Ref.23 |
| HA ₁ | (1,73 ±0,08)×10 ⁻⁵ | 4,76 | 5,10 |
| HA ₂ | (9,4 ±1,3)×10 ⁻⁷ | 6,0 | 7,02 |
| HA ₃ ⁺ | (7,4 ±1,3)×10 ⁻⁸ | 7,1 | 9,55 |
| HA ₄ ⁺ | (4,0 ₆ ±0,2 ₀)×10 ⁻¹⁰ | 9,39 | 10,95 |
| HA ₅ ⁺ | (2,3 ₀ ±0,1 ₂)×10 ⁻¹¹ | 10,64 | |

* - média de 5 determinações

zação dos grupos carboxílicos da ovalbumina estende-se até qua se pH 8. Até o limite normal de titulação desses grupos em uréia, que foi estipulado como sendo a pH 6, cerca de 11,5 dos 47 grupos carboxílicos da ovalbumina permanecem na forma não dissociada. A titulação dos grupos carboxílicos corresponde às séries de grupos HA_1 , HA_2 e HA_3^+ das tabelas 20 e 21. A soma do número de grupos/mol nas 3 séries referidas está em bom acordo com a soma Asp+GLu da seqüência de aminoácidos. Essas três séries de grupos equivalem às séries HA_1 e HA_2 atribuídas por Vasconcelos ⁽²³⁾ para a titulação dos grupos carboxílicos em suas titulações de ovalbumina. É grande a semelhança entre o valor do total de grupos carboxílicos encontrados neste trabalho (46,5 grupos/mol) e o que foi encontrado por Vasconcelos (46,94 grupos/mol).

O fato de se ter usado, neste trabalho, equações mais exatas para seguir a ionização de cada uma das séries de grupos resultou numa descrição mais detalhada da titulação dos grupos carboxílicos. Dos 46,5 grupos carboxílicos titulados na ovalbumina desnaturada em uréia, constatou-se que: 34,9 grupos possuem $pK_a = 4,76$; 7,4 grupos possuem $pK_a = 6,0$ e os demais 4,2 grupos, $pK_a = 7,1$.

Seguindo-se a análise das curvas de titulação, a região básica é constituída por duas séries de grupos: HA_4^+ e HA_5^+ , com um total de 41,9 grupos/mol. Vasconcelos encontrou também duas séries de grupos com um total de 42,47 grupos/mol na mesma região.

A série HA_5^+ provavelmente representa a titulação de 25,5

grupos ϵ -aminos e fenólicos com $pK_a = 10,64$. Como a ovalbumina contém um total de 30 desses grupos, 4,5 grupos ϵ -aminos ou fenólicos - ou uma mistura dos dois tipos - são titulados na série HA_4^+ com $pK_a = 9,55$.

O total de grupos em HA_4^+ é 16,4. Excluindo-se os 4,5 grupos ϵ -aminos ou fenólicos, são titulados nessa série outros 11,9 grupos. Provavelmente estão incluídos aí os 7 grupos imidazóis da ovalbumina, que são titulados numa região de pH anormalmente alta. Essa tendência foi também observada na ovalbumina nativa. Rasper e Kauzmann⁽⁹⁰⁾ sugeriram que os grupos imidazóis da proteína nativa só começam a se dissociar acima de pH 6,8.

Faltam ainda ser identificados 4,9 grupos da série HA_4^+ . O grupo α -amino da ovalbumina não pode ser titulado, pois se trata de uma glicina acetilada. Os dois resíduos de fosfato da ovalbumina podem contribuir com dois grupos na região de titulação do imidazol^(86,90). Dessa forma, sobram 2,9 grupos que não foram ainda identificados, exatamente o mesmo número que foi considerado estar em excesso no trabalho anterior.

Todas as titulações de ovalbumina em uréia 8,00 M feitas neste trabalho, cujos resultados estão sendo discutidos, transcorreram sem alteração significativa do meio iônico, fato comprovado pela ausência de variação nos termos $(E'_O + E_j)$ com a concentração do íon hidrogênio ou do íon hidroxila nas experiências de calibração.

Portanto, o aparecimento desses grupos não pode ser atribuído a qualquer influência de procedimento experimental ou de

cálculos utilizados no trabalho anterior.

Sugeriu-se que as impurezas da uréia poderiam ter, de alguma maneira, contribuído para a titulação da proteína. Contudo, os resultados obtidos com as demais titulações de proteínas e com a histidina não forneceram nenhum indício de que a correção das impurezas, da maneira como foi feita, estivesse incluindo erro de tal grandeza.

Analisadas essas possibilidades, uma conclusão coerente é admitir que esses grupos fazem parte realmente da molécula da proteína.

A ovalbumina possui 4 resíduos de cisteína, que contêm grupos -SH tituláveis na região dos grupos imidazóis. Esses grupos não são detectados na proteína nativa, mas aparecem na proteína desnaturada por uréia ou por GuHCl ⁽⁹³⁾. O conteúdo de cisteína, obtido por tratamento da proteína com cada um desses reagentes, não é concordante e depende da natureza e concentração dos mesmos. O GuHCl é mais efetivo na liberação dos grupos sulfidrílicos e, por isso, admite-se que o conteúdo encontrado em GuHCl seja o mais correto ⁽⁹⁴⁾.

A liberação dos grupos sulfidrílicos da ovalbumina ocorre em soluções de uréia com concentrações de pelo menos 8 M ⁽⁹⁵⁾. O conteúdo de cisteína da ovalbumina, determinado por titulação redox dos grupos sulfidrílicos em uréia 16,6 M, corresponde a 1% dos grupos totais da proteína. Os 2,9 grupos encontrados neste trabalho, em uréia 8,00 M, constituem 0,75% dos grupos da ovalbumina.

É importante frisar que o aparecimento dos grupos sulfi-

drílicos da ovalbumina, provocado por desnaturação em uréia ou em GuHCl , não está associado com a destruição da ponte de dissulfeto da molécula⁽⁹⁵⁾.

Diante dessas evidências, não parece haver dúvidas de que, na ovalbumina desnaturada em uréia 8,00 M, são ionizados 2,9 grupos sulfidrílicos com $\text{pK}_a = 9,39$, na mesma região em que são ionizados os grupos imidazóis da proteína.

VII. TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS DA PROTEÍNA DE
BENCE JONES (JJO) DESNATURADA EM ÁCIDO E EM URÉIA 9,10 M

VII.1. ESTRUTURA DAS IMUNOGLOBULINAS

O organismo dos animais vertebrados reage ao aparecimento de qualquer substância estranha (antígeno), produzindo uma proteína que atuará especificamente sobre esse antígeno. Essas proteínas, chamadas anticorpos, são produzidas nas células linfáticas e constituem a importante classe das imunoglobulinas (3).

O isolamento das imunoglobulinas do soro do sangue de vertebrados fornece um material heterogêneo, como se consistisse de uma mistura de moléculas quimicamente diferentes.

A estrutura geral de todas as imunoglobulinas é semelhante. Elas são constituídas por dois tipos de cadeias polipeptídicas, unidas por interações não covalentes e por pontes de dissulfeto. As cadeias polipeptídicas são designadas cadeia leve e cadeia pesada, por causa da diferença em seus pesos moleculares, que são aproximadamente 23 000 e 50 000 respectivamente (96).

A causa de heterogeneidade das imunoglobulinas é muito provavelmente a origem de sua ação anticorpo reside nas diferentes seqüências de aminoácidos das cadeias leves e pesadas, encontradas até mesmo em imunoglobulinas de uma mesma classe.

São 5 as principais classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Essa classificação é baseada na estrutura da

cadeia pesada apresentada pela proteína. Cada uma dessas classes pode possuir várias subclasses, que refletem diferenças em determinados pontos da estrutura. As cadeias leves das proteínas de cada classe podem ser do tipo κ ou do tipo λ .

Indivíduos sadios produzem todas as 5 classes de imunoglobulinas, além das subclasses. Como é praticamente impossível a purificação de uma mistura homogênea que se preste à caracterização química, a determinação da seqüência de aminoácidos das imunoglobulinas normais é impossível⁽⁹⁷⁾.

Muitas informações sobre as imunoglobulinas normais são obtidas a partir de investigações em imunoglobulinas anormais e incompletas, que são liberadas respectivamente no soro do sangue e na urina de pacientes portadores de uma doença das células do plasma, chamada mieloma múltiplo⁽⁹⁸⁾. A imunoglobulina encontrada em grande quantidade no soro do sangue do enfermo é de uma só espécie e é por isso, chamada anormal. É também característica de cada indivíduo. Na verdade, a imunoglobulina incompleta ou Proteína de Bence Jones, liberada também em grande quantidade na urina do enfermo, é a cadeia leve da imunoglobulina.

Essas proteínas homogêneas não possuem atividade anticorpo, mas são estruturalmente semelhantes às imunoglobulinas normais. O fato de cada uma delas possuir seqüência de aminoácidos própria parece indicar que cada proteína anormal é uma das constituintes da população normal das imunoglobulinas⁽⁹⁶⁾.

A estrutura de uma IgG1 humana é mostrada na figura 17 e foi montada a partir de estudos de uma proteína de mieloma⁽⁹⁹⁾.

A molécula completa contém duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ponte de dissulfeto. As cadeias pesadas são ligadas entre si por duas pontes de dissulfeto vizinhas. Outras pontes de dissulfeto unem partes diferentes de uma mesma cadeia.

A comparação da sequência de aminoácidos de várias proteínas anormais mostrou que, em uma região da molécula, a sequência de aminoácidos é quase constante em todas as proteínas (região constante). Na outra região, a sequência de aminoácidos é muito diferente nas várias proteínas (região variável).

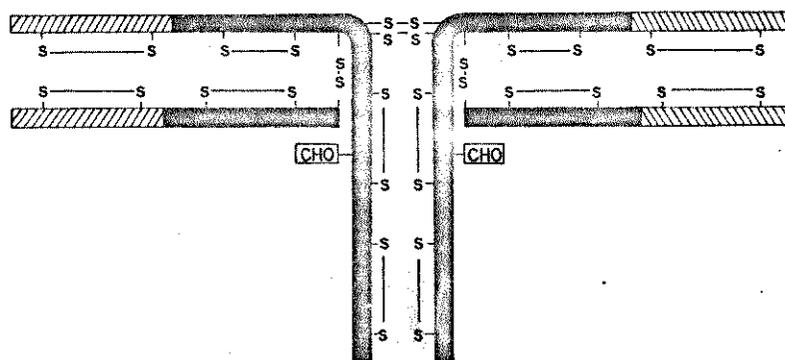


Fig. 17. Estrutura da IgG1, apresentando as pontes de dissulfeto intercadeia e intracadeia, as posições aproximadas dos resíduos de carboidrato (CHO) e as regiões constante (seção negra) e variável das cadeias leves e pesadas (99).

VII.2. PROTEÍNAS DE BENCE JONES

Estudos sobre a seqüência de aminoácidos de proteínas de Bence Jones mostraram que os dois tipos de cadeia polipeptídica κ e λ são constituídos por duas regiões: uma que compreende a metade da cadeia que contém o grupo amino-terminal, com seqüência diversa de aminoácidos nas diferentes proteínas; a outra região, que é a metade da cadeia que contém o grupo carboxílico terminal, com seqüência de aminoácidos praticamente constante em todas as proteínas⁽⁹⁶⁾.

Cada uma das regiões possui uma ponte de dissulfeto fechando um anel constituído por aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, o que dá à molécula uma forma simétrica.

Nas proteínas de Bence Jones do tipo κ , o resíduo amino-terminal é geralmente ácido aspártico ou asparagina. O resíduo carboxílico-terminal é a cisteína. Nas proteínas do tipo λ , geralmente o resíduo amino-terminal é bloqueado, e um resíduo de cisteína ocupa a penúltima posição na cadeia^(96,97), na extremidade carboxílico-terminal.

Normalmente, as proteínas de Bence Jones existem na forma dimérica, associadas por uma ponte de dissulfeto intercadeia e interações não covalentes⁽¹⁰⁰⁾. Estudos conformacionais indicam que as regiões variável e constante das proteínas de Bence Jones são enroladas independentemente⁽¹⁰¹⁾. Investigações sobre a desnaturação das proteínas também conduziram à mesma conclusão.

VII.3. DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE BENICE JONES

Proteínas de Bence Jones dos dois tipos, κ e λ , manifestaram mudanças conformacionais abaixo de pH 4⁽¹⁰²⁾. A desnaturação provocada por ácido não é um processo de 2 estados, envolve dois ou mais estágios e não leva as moléculas da proteína ao estado completamente desordenado.

A desnaturação por GuHCl de proteínas de Bence Jones⁽¹⁰³⁾ dos dois tipos começa a ocorrer a concentrações de GuHCl da ordem de 0,9 M. O estado de desnaturação total é atingido em GuHCl 3 M. A transição dá-se em dois estágios. A primeira transição se completa em GuHCl 1,5 M. A partir dessa concentração, inicia-se a segunda transição. Nas proteínas do tipo λ , a primeira transição corresponde ao desenrolamento da região constante e a segunda transição, ao desenrolamento da região variável. Com as proteínas do tipo κ , a região constante e uma porção da região variável são desnaturadas na primeira transição.

Esses fatos confirmam não só o enrolamento independente das duas regiões, como também que a região constante das proteínas de Bence Jones tipo λ é mais estável que a região variável. Mostrou-se também que a estabilidade não é igual em todas as proteínas do mesmo tipo.

Em soluções de uréia, foram também observados dois estágios de desnaturação entre uréia 2-7 M⁽¹⁰⁴⁾. Todavia um outro estudo indica que, mesmo em uréia 8 M, a transição não é completa⁽¹⁰⁵⁾.

Nas proteínas do tipo κ , a desnaturação em uréia foi seme

lhante à observada em GuHCl citada acima. Porém, duas proteínas do tipo λ apresentaram diferentes comportamentos. Numa delas, observou-se maior estabilidade da região constante em uréia. Na outra, a desnaturação foi em duas etapas, sem estados intermediários⁽¹⁰⁵⁾.

VII.4. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE UMA PROTEÍNA DE BENCE JONES

Na literatura especializada, foi encontrada apenas uma publicação sobre o equilíbrio ácido-base de uma proteína de Bence Jones⁽¹⁰⁶⁾. Ainda assim o objetivo do estudo foi uma proteína do tipo κ . Deve-se frisar, porém, que a proteína (JJ0), estudada neste trabalho é do tipo λ .

A composição de aminoácidos da proteína de Bence Jones (Ta) indicava a existência dos seguintes grupos ionizáveis por mol do dímero: 36 grupos carboxílicos, 4 grupos imidazóis, 2 grupos α -aminos, 20 grupos ϵ -aminos, 18 grupos fenólicos e 22 grupos guanidínicos.

A interpretação da curva de titulação pela teoria de Linderström-Lang revelou que as ionizações dos grupos carboxílicos e ϵ -aminos ocorreram de acordo com o previsto. Porém as ionizações dos outros grupos (imidazóis, α -aminos e fenólicos), apresentaram alguma anormalidade.

Dos 4 grupos imidazóis presentes, apenas 2 foram titulados com valor de pK_{int} normal. Os outros dois eram mascarados na proteína nativa.

Os dois grupos α -aminos foram titulados, mas com valor de

pK_{int} um pouco maior que o normal.

Dos 18 grupos fenólicos, apenas 2 ionizaram-se normalmente. Os outros 16 só o fizeram com $pK_{int} = 11,24$, depois da mudança conformacional que ocorreu na proteína acima de pH 10,2 (106).

Investigações envolvendo modificações químicas dos resíduos de tirosina de proteínas de Bence Jones dos tipos κ e λ (107) indicaram diferentes reatividades desses grupos, por acetilação com N-acetilimidazol (NAI). Na proteína monomérica foram distingüidos três tipos de resíduos de tirosina:

- 1) 1,5 resíduo que é acetilado a baixas concentrações de NAI;
- 2) 1,5 resíduo adicional é acetilado a concentrações maiores de NAI;
- 3) os demais resíduos são acetilados após desnaturação em uréia.

VII.5. PROTEÍNA DE BENCE JONES (JJO)

A proteína de Bence Jones utilizada neste estudo foi isolada da urina do paciente paraproteinêmico (JJO) e caracterizada quimicamente no grupo de pesquisas do Prof. Dr. Benedito Oliveira, do Instituto de Biologia da UNICAMP⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾. A proteína foi tipificada como sendo λ ⁽¹⁰⁸⁾.

O aminoácido da extremidade carboxílico-terminal é uma serina, tendo um resíduo de cisteína como grupo vizinho, que é uma das características das cadeias leves λ ⁽¹⁰⁸⁾. Na outra extremidade, a tirosina é o aminoácido amino-terminal.

A composição de aminoácidos da proteína de Bence Jones (JJO) foi determinada após os procedimentos de tipificação e purificação⁽¹⁰⁹⁾.

A tabela 22 apresenta os dados da composição de aminoácidos da Proteína de Bence Jones (JJO). Tais dados estão comparados com a composição de aminoácidos de outras proteínas de Bence Jones.

Apesar da semelhança geral com outras proteínas de Bence Jones, a proteína (JJO) é única, pois os aminoácidos podem ser os mesmos em todas as proteínas, apenas na região constante. Na outra região, as variações são imprevisíveis⁽¹⁰⁹⁾.

Com base nos dados da tabela 22, é possível se fazer uma estimativa dos grupos ionizáveis da proteína BJ(JJO).

O número de grupos carboxílicos dos resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico não é conhecido, pois a composição de aminoácidos fornece apenas os valores de Asx e Glx, que correspondem respectivamente às somas (Asp+Asn) e (Glu+Gln). Essa é uma das respostas buscadas: o número de grupos carboxílicos da proteína BJ(JJO).

Além dos grupos carboxílicos, devem ser encontrados 2 grupos imidazóis dos resíduos de histidina, 1 grupo α -amino, 11 grupos fenólicos dos resíduos de tirosina e 11 grupos ϵ -aminos dos resíduos de lisina, por peso molecular de 22 600, considerando-se a forma monomérica.

Tab. 22. Composição de aminoácidos (expressa como moles do resíduo/mol de proteína^a) da proteína de Bence Jones (JJO) e comparação com outras proteínas de Bence Jones (109).

| Resíduo | (JJO) | Mau | X | Ag |
|------------------------|------------------|------------------|-----|-----|
| Lys | 11 | 11 | 10 | 13 |
| His | 2 | 3 | 2 | 3 |
| Arg | 6 | 4 | 5 | 6 |
| Cya | 5 | 5 | 6 | 5 |
| Asx | 14 | 13 | 16 | 21 |
| Met (SO ₂) | 1 | - | 2 | - |
| Thr | 22 | 19 | 20 | 20 |
| Ser | 26 | 35 | 31 | 27 |
| Glx | 22 | 20 | 23 | 26 |
| Pro | 17 | 16 | 15 | 11 |
| Gly | 16 | 17 | 14 | 13 |
| Ala | 15 | 17 | 16 | 12 |
| Val | 16 | 16 | 17 | 13 |
| Ile | 5 | 7 | 5 | 9 |
| Leu | 13 | 12 | 12 | 15 |
| Tyr | 11 | 10 | 9 | 9 |
| Phe | 4 | 4 | 4 | 9 |
| Met | - | - | - | 1 |
| Trp | - | - | 4 | 2 |
| Total | 206 ^b | 209 ^b | 211 | 215 |

a- Cálculos baseados no peso molecular de 22 600.

b- Valor total normalizado (não inclui Trp).

VII.6. RESULTADOS

VII.6.1. Titulação Potenciométrica da Proteína de Bence Jones (JJO) Desnaturada em Ácido

Como o método utilizado neste trabalho exige excesso de ácido clorídrico no meio e as proteínas de Bence Jones são desnaturadas em $\text{pH} < 4$ ⁽¹⁰²⁾, as preparações que foram tituladas em KCl 0,10 M estavam certamente desnaturadas. A extensão da desnaturação por ácido é geralmente menor que a provocada por uréia ou por GuHCl ⁽¹⁷⁾. No caso de proteínas de Bence Jones, esse fato foi confirmado por observação da reatividade dos resíduos de triptofano na proteína nativa ou desnaturada por vários agentes⁽¹⁰⁷⁾. Na proteína nativa, nenhum resíduo de triptofano foi encontrado. Na proteína desnaturada por ácido, foi detectado um resíduo. Na proteína desnaturada em uréia, todos os resíduos de triptofano presentes foram expostos.

Nas soluções de proteína BJ(JJO) tituladas, a concentração da proteína situou-se na faixa $(7,433-9,833) \times 10^{-5}$ M. Além da proteína, as soluções tituladas continham KCl 0,10 M e excesso de HCl. Cerca de 0,0191 milimol de HCl foi adicionado em cada preparação. O pH inicial das soluções foi da ordem de 2,617-2,930.

A calibração dos eletrodos foi feita com os tampões NBS citados no item III.3.1.

Utilizou-se como titulante solução padrão de NaOH 0,1108 M, contendo KCl 0,10 M.

Durante as titulações, observou-se uma leve turvação das soluções, quando era atingido pH 5-6. Essa turvação, porém, desaparecia quando mais uma unidade de pH era alcançada.

Os dados de uma das titulações são apresentados na tabela 23. Os dados da curva linearizada encontram-se na tabela 24. As curvas de titulação normal e linearizada são ilustradas na figura 18.

Os resultados, expressos como número de grupo/mol de proteína das séries de grupos titulados na proteína BJ(JJO), desnaturada por ácido, são apresentados na tabela 25, junto com as quantidades de grupos ionizáveis da proteína, fornecidas pela composição de aminoácidos⁽¹⁰⁹⁾. Os valores de K_a e pK_a das séries de grupos titulados são apresentados na tabela 26. O peso molecular usado nos cálculos foi o da forma monomérica da proteína, que é 22 600⁽¹⁰⁹⁾.

A discussão desses resultados será feita adiante, junto com a dos resultados da proteína desnaturada em uréia.

Tab. 23. Dados da titulação potenciométrica de 10,00 mg de proteína de Bence Jones (JJO), em 4,50 ml de solução de KCl 0,10 M em excesso de ácido (adição de 0,0191 mili mol de HCl), com solução de NaOH 0,1108 M em KCl 0,10 M.

| V(ml) | pH | V(ml) | pH |
|--------|-------|--------|--------|
| 0.0048 | 2.967 | 0.1520 | 7.034 |
| 0.0080 | 2.990 | 0.1540 | 7.087 |
| 0.0120 | 3.022 | 0.1560 | 7.142 |
| 0.0160 | 3.056 | 0.1580 | 7.199 |
| 0.0200 | 3.090 | 0.1600 | 7.259 |
| 0.0240 | 3.128 | 0.1620 | 7.325 |
| 0.0280 | 3.168 | 0.1640 | 7.395 |
| 0.0320 | 3.212 | 0.1660 | 7.470 |
| 0.0360 | 3.259 | 0.1680 | 7.555 |
| 0.0400 | 3.310 | 0.1700 | 7.648 |
| 0.0440 | 3.365 | 0.1720 | 7.758 |
| 0.0480 | 3.425 | 0.1740 | 7.891 |
| 0.0520 | 3.492 | 0.1760 | 8.058 |
| 0.0560 | 3.563 | 0.1770 | 8.153 |
| 0.0600 | 3.641 | 0.1780 | 8.258 |
| 0.0640 | 3.728 | 0.1790 | 8.396 |
| 0.0680 | 3.823 | 0.1800 | 8.500 |
| 0.0720 | 3.924 | 0.1810 | 8.637 |
| 0.0761 | 4.039 | 0.1820 | 8.773 |
| 0.0780 | 4.077 | 0.1831 | 8.903 |
| 0.0800 | 4.158 | 0.1840 | 9.015 |
| 0.0820 | 4.222 | 0.1850 | 9.115 |
| 0.0841 | 4.295 | 0.1860 | 9.204 |
| 0.0860 | 4.365 | 0.1870 | 9.292 |
| 0.0880 | 4.443 | 0.1880 | 9.371 |
| 0.0900 | 4.518 | 0.1890 | 9.441 |
| 0.0920 | 4.603 | 0.1900 | 9.504 |
| 0.0941 | 4.697 | 0.1910 | 9.568 |
| 0.0961 | 4.790 | 0.1920 | 9.623 |
| 0.0980 | 4.889 | 0.1931 | 9.680 |
| 0.1000 | 5.000 | 0.1940 | 9.723 |
| 0.1020 | 5.118 | 0.1950 | 9.766 |
| 0.1040 | 5.239 | 0.1960 | 9.810 |
| 0.1062 | 5.385 | 0.1980 | 9.885 |
| 0.1080 | 5.511 | 0.2000 | 9.951 |
| 0.1100 | 5.648 | 0.2020 | 10.013 |
| 0.1120 | 5.770 | 0.2040 | 10.066 |
| 0.1140 | 5.888 | 0.2060 | 10.116 |
| 0.1160 | 5.990 | 0.2080 | 10.160 |
| 0.1180 | 6.077 | 0.2100 | 10.205 |
| 0.1200 | 6.155 | 0.2120 | 10.242 |
| 0.1220 | 6.227 | 0.2140 | 10.280 |
| 0.1240 | 6.294 | 0.2160 | 10.316 |
| 0.1261 | 6.360 | 0.2180 | 10.352 |
| 0.1280 | 6.417 | 0.2200 | 10.386 |
| 0.1300 | 6.474 | 0.2225 | 10.425 |
| 0.1320 | 6.529 | 0.2250 | 10.464 |
| 0.1340 | 6.581 | 0.2275 | 10.500 |
| 0.1360 | 6.633 | 0.2300 | 10.535 |
| 0.1380 | 6.684 | 0.2325 | 10.569 |
| 0.1400 | 6.734 | 0.2350 | 10.601 |
| 0.1420 | 6.783 | 0.2375 | 10.631 |
| 0.1440 | 6.833 | 0.2400 | 10.658 |
| 0.1460 | 6.883 | 0.2425 | 10.685 |
| 0.1480 | 6.935 | 0.2450 | 10.714 |
| 0.1500 | 6.983 | 0.2476 | 10.738 |

Tab. 24. Dados da curva de titulação linearizada da proteína de Bence Jones (JJO), desnaturada em ácido, cujos parâmetros foram apresentados na tabela 23.

| PARA HCL | | | |
|---|-------|-------------|-------------|
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.0048 | 2.967 | 5.617E-03 | 6.421E-03 |
| 0.0080 | 2.990 | 5.307E-03 | 6.066E-03 |
| 0.0120 | 3.022 | 4.899E-03 | 5.623E-03 |
| 0.0160 | 3.056 | 4.493E-03 | 5.180E-03 |
| 0.0200 | 3.090 | 4.115E-03 | 4.737E-03 |
| 0.0240 | 3.128 | 3.721E-03 | 4.298E-03 |
| 0.0280 | 3.168 | 3.337E-03 | 3.850E-03 |
| 0.0320 | 3.212 | 2.947E-03 | 3.407E-03 |
| 0.0360 | 3.259 | 2.564E-03 | 2.964E-03 |
| 0.0400 | 3.310 | 2.183E-03 | 2.521E-03 |
| 0.0440 | 3.365 | 1.807E-03 | 2.077E-03 |
| 0.0480 | 3.425 | 1.432E-03 | 1.634E-03 |
| 0.0520 | 3.492 | 1.049E-03 | 1.191E-03 |
| 0.0560 | 3.563 | 6.781E-04 | 7.479E-04 |
| 0.0600 | 3.641 | 3.017E-04 | 3.047E-04 |
| 0.0640 | 3.728 | -8.906E-05 | -1.385E-04 |
| 0.0680 | 3.823 | -4.908E-04 | -5.817E-04 |
| 0.0720 | 3.924 | -8.984E-04 | -1.025E-03 |
| 0.0761 | 4.039 | -1.346E-03 | -1.479E-03 |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .0627499 | | | |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999941 | | | |
| PARA ACIDO HA1 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.0841 | 4.295 | 1.598E-06 | 1.508E-06 |
| 0.0860 | 4.365 | 1.432E-06 | 1.382E-06 |
| 0.0880 | 4.443 | 1.260E-06 | 1.249E-06 |
| 0.0900 | 4.518 | 1.113E-06 | 1.116E-06 |
| 0.0920 | 4.603 | 9.554E-07 | 9.624E-07 |
| 0.0941 | 4.697 | 7.987E-07 | 8.427E-07 |
| 0.0961 | 4.790 | 6.613E-07 | 7.096E-07 |
| 0.0980 | 4.889 | 5.296E-07 | 5.832E-07 |
| 0.1000 | 5.000 | 3.997E-07 | 4.501E-07 |
| 0.1020 | 5.118 | 2.780E-07 | 3.171E-07 |
| 0.1040 | 5.239 | 1.631E-07 | 1.840E-07 |
| 0.1062 | 5.385 | 3.956E-08 | 3.761E-08 |
| 0.1080 | 5.511 | -6.867E-08 | -8.216E-08 |
| 0.1100 | 5.648 | -1.927E-07 | -2.152E-07 |
| 0.1120 | 5.770 | -3.152E-07 | -3.483E-07 |
| 0.1140 | 5.888 | -4.509E-07 | -4.814E-07 |
| 0.1160 | 5.990 | -5.855E-07 | -6.145E-07 |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.99816 | | | |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= .106765 | | | |
| CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 6.65366E-05 | | | |
| PARA ACIDO HA2 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.1420 | 6.783 | 7.000E-09 | 6.941E-09 |
| 0.1440 | 6.833 | 6.582E-09 | 6.554E-09 |
| 0.1460 | 6.893 | 6.170E-09 | 6.167E-09 |
| 0.1480 | 6.935 | 5.742E-09 | 5.779E-09 |
| 0.1500 | 6.983 | 5.280E-09 | 5.392E-09 |
| 0.1520 | 7.034 | 4.994E-09 | 5.005E-09 |

| | | | |
|--------|-------|------------|------------|
| 0.1560 | 7.142 | 4.213E-09 | 4.230E-09 |
| 0.1580 | 7.199 | 3.830E-09 | 3.843E-09 |
| 0.1600 | 7.259 | 3.446E-09 | 3.456E-09 |
| 0.1620 | 7.325 | 3.051E-09 | 3.069E-09 |
| 0.1640 | 7.395 | 2.664E-09 | 2.681E-09 |
| 0.1660 | 7.470 | 2.288E-09 | 2.294E-09 |
| 0.1680 | 7.555 | 1.903E-09 | 1.907E-09 |
| 0.1700 | 7.648 | 1.532E-09 | 1.519E-09 |
| 0.1720 | 7.758 | 1.152E-09 | 1.132E-09 |
| 0.1740 | 7.891 | 7.646E-10 | 7.449E-10 |
| 0.1760 | 8.058 | 3.665E-10 | 3.577E-10 |
| 0.1770 | 8.153 | 1.738E-10 | 1.640E-10 |
| 0.1780 | 8.258 | -1.833E-11 | -2.961E-11 |
| 0.1790 | 8.396 | -2.476E-10 | -2.232E-10 |
| 0.1800 | 8.500 | -4.072E-10 | -4.169E-10 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999959

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= .177847

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 1.93632E-07
PARA ACIDO HA3

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|-------|-------------|-------------|
| 0.1800 | 8.500 | 1.051E-11 | 1.031E-11 |
| 0.1810 | 8.637 | 4.486E-12 | 4.615E-12 |
| 0.1820 | 8.773 | -1.399E-12 | -1.082E-12 |
| 0.1831 | 8.903 | -7.102E-12 | -7.348E-12 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999371

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= .18181

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 3.69655E-09
PARA ACIDO HA4

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|-------|-------------|-------------|
| 0.1850 | 9.115 | 1.175E-12 | 1.207E-12 |
| 0.1860 | 9.204 | 8.834E-13 | 8.416E-13 |
| 0.1870 | 9.292 | 4.856E-13 | 4.757E-13 |
| 0.1880 | 9.371 | 9.821E-14 | 1.099E-13 |
| 0.1890 | 9.441 | -2.661E-13 | -2.560E-13 |
| 0.1900 | 9.504 | -6.191E-13 | -6.219E-13 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999325

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= .1883

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 3.65866E-10
PARA ACIDO HA5

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.2120 | 10.242 | 7.748E-13 | 7.870E-13 |
| 0.2140 | 10.280 | 7.229E-13 | 7.267E-13 |
| 0.2160 | 10.316 | 6.703E-13 | 6.663E-13 |
| 0.2180 | 10.352 | 6.085E-13 | 6.060E-13 |
| 0.2200 | 10.386 | 5.480E-13 | 5.456E-13 |
| 0.2225 | 10.425 | 4.789E-13 | 4.702E-13 |
| 0.2250 | 10.464 | 3.993E-13 | 3.948E-13 |
| 0.2275 | 10.500 | 3.247E-13 | 3.193E-13 |
| 0.2300 | 10.535 | 2.465E-13 | 2.439E-13 |
| 0.2325 | 10.569 | 1.653E-13 | 1.684E-13 |
| 0.2350 | 10.601 | 8.637E-14 | 9.302E-14 |
| 0.2375 | 10.631 | 1.094E-14 | 1.758E-14 |
| 0.2400 | 10.658 | -5.600E-14 | -5.785E-14 |
| 0.2425 | 10.685 | -1.267E-13 | -1.333E-13 |
| 0.2450 | 10.714 | -2.172E-13 | -2.087E-13 |
| 0.2476 | 10.738 | -2.631E-13 | -2.872E-13 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999853

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5= .238083

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA5= 3.01737E-11

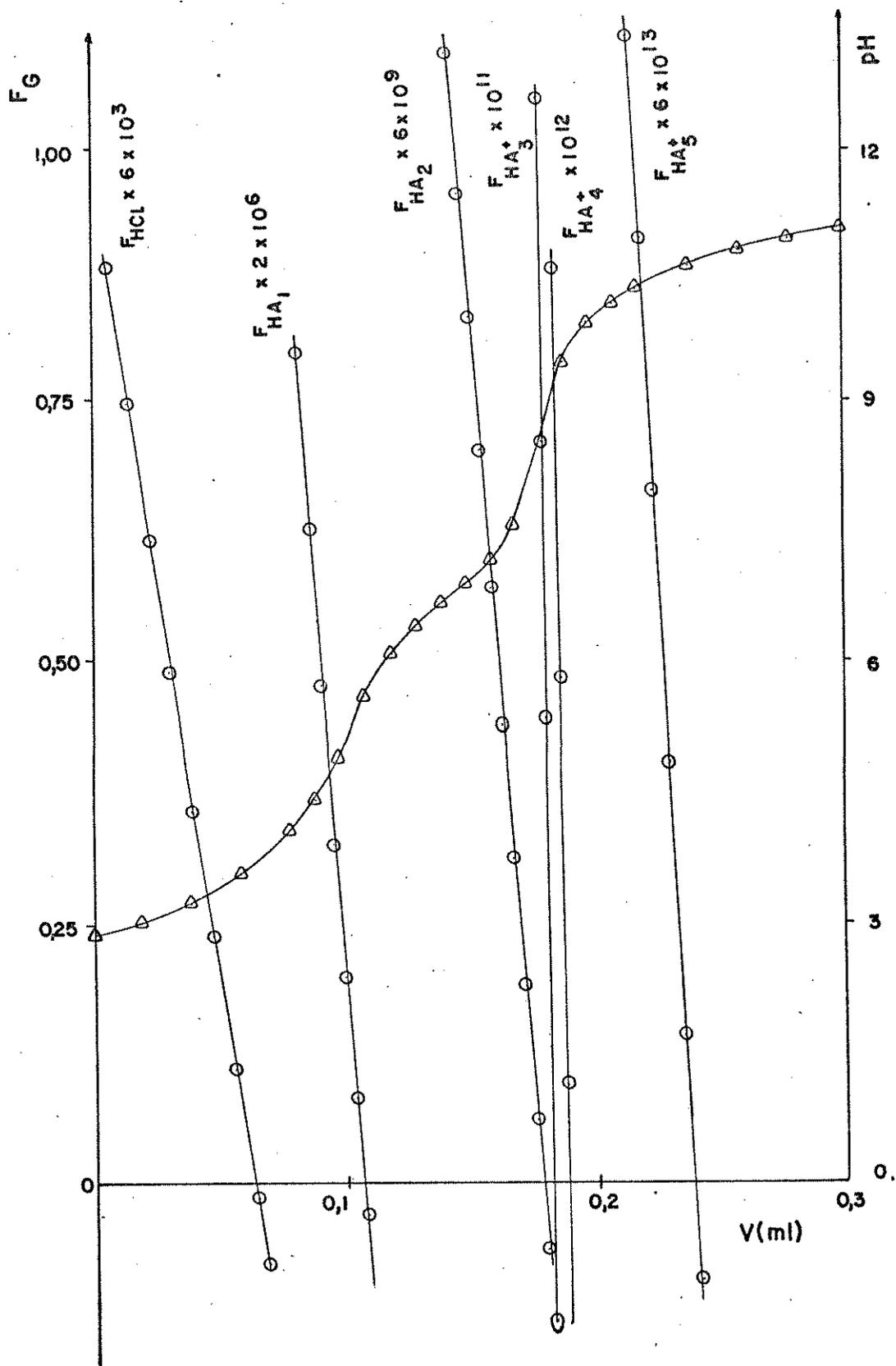


Figura 18. Curvas de titulação da proteína de Bence Jones (JJO) desnaturada por ácido, referentes aos dados das tabelas 23 e 24. (Δ) - curva normal (ordenada à direita); (\circ) - curva linearizada (ordenada à esquerda).

Tab. 25. Estequiometria das séries de grupos titulados na proteína de Bence Jones (JJO), desnaturada em ácido

| Série de Grupos | N ^{a,b} | Composição de Aminoácidos (108) | |
|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|
| | | Grupo | N ^b |
| HA ₁ | 11,2 ₄ ±0,3 ₁ | Asp | ? |
| HA ₂ | 16,2 ±1,5 | Glu | ? |
| HA ₃ ⁺ | 0,94±0,07 | His | 2 |
| HA ₄ ⁺ | 1,7 ₀ ±0,1 ₄ | α-amino | 1 |
| HA ₅ ⁺ | 12,3 ₆ ±0,8 ₈ | Tyr | 11 |
| | | Lys | 11 |

a - média de 3 determinações

b - número de grupos/mol de proteína, PM=22 600

Tab. 26. Valores de K_a e pK_a determinados para as séries de grupos titulados na proteína de Bence Jones (JJO), desnaturada por ácido

| Série de Grupos | K _a [*] | pK _a |
|------------------------------|---|-----------------|
| HA ₁ | (6,9 ₃ ±0,5 ₀)x10 ⁻⁵ | 4,16 |
| HA ₂ | (1,96±0,03)x10 ⁻⁷ | 6,71 |
| HA ₃ ⁺ | (9,3 ±3,0)x10 ⁻⁹ | 8,0 |
| HA ₄ ⁺ | (5,71±0,03)x10 ⁻¹⁰ | 9,24 |
| HA ₅ ⁺ | (3,2 ₂ ±0,1 ₅)x10 ⁻¹¹ | 10,49 |

* - média de 3 determinações

VII.6.2. Titulação Potenciométrica da Proteína de Bence Jones (JJO) Desnaturada em Uréia 9,10 M

Como as proteínas de Bence Jones exigem altas concentrações de uréia para serem desnaturadas⁽¹⁰⁵⁾, soluções de uréia 9,10 M foram utilizadas com a proteína (JJO).

Permitiu-se um contato de duas horas entre a proteína e a solução de uréia. Decorrido esse período, a titulação era iniciada.

Como essa parte do trabalho foi a primeira a ser feita e, na época, ainda não se cogitava a investigação da influência da diluição sobre a variação do meio de titulação, as experiências foram feitas com soluções titulantes de NaOH (0,1280-0,1326) M.

Foram feitas 3 titulações. A primeira delas, porém, não pôde ser aproveitada, pois foi encerrada antes de se ter concluído a titulação da última série de grupos.

As soluções de proteína BJ(JJO) com concentrações (1,164-1,617) $\times 10^{-4}$ M, em soluções de uréia 9,10 M, contendo KCl 0,10 M e adição de 0,0194 milimol de HCl, foram tituladas com soluções de NaOH (0,1280-0,1326) M, em KCl 0,10 M.

As tabelas 27 e 28 apresentam os dados da curva de titulação normal e da curva de titulação linearizada, respectivamente, de uma das experiências. Essas curvas são ilustradas na figura 19.

A estequiometria das séries de grupos titulados em uréia 9,10 M é apresentada na tabela 29. Os respectivos valores de K_a e pK_a estão na tabela 30.

Tab. 27. Dados da curva de titulação potenciométrica de 14,40 mg de proteína de Bence Jones (JJO), em 4,00 ml de uréia 9,10 M, contendo KCl 0,10 M e excesso de ácido (adição de 0,0194 milimol de HCl), com solução de NaOH 0,1312 M em KCl 0,10 M. ($E_{0a}^0=323,7$ mV; $E_{0b}^0=-447,4$ mV; $j_H^0=-13\ 559$ mV/M; $j_{OH}^0=783,4$ mV/M).

| V(ml) | E(mV) | pH | V(ml) | E(mV) | pH |
|--------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 0.0021 | 158.4 | 4.432 | 0.1400 | -37.4 | 7.736 |
| 0.0040 | 157.7 | 4.444 | 0.1420 | -44.5 | 7.855 |
| 0.0060 | 157.0 | 4.456 | 0.1440 | -52.5 | 7.990 |
| 0.0080 | 156.2 | 4.469 | 0.1460 | -61.5 | 8.142 |
| 0.0100 | 155.4 | 4.483 | 0.1480 | -71.5 | 8.311 |
| 0.0120 | 154.6 | 4.496 | 0.1500 | -82.8 | 8.502 |
| 0.0140 | 153.8 | 4.510 | 0.1510 | -88.9 | 8.605 |
| 0.0160 | 153.0 | 4.523 | 0.1520 | -94.4 | 8.698 |
| 0.0180 | 152.1 | 4.538 | 0.1530 | -99.8 | 8.789 |
| 0.0200 | 151.3 | 4.552 | 0.1540 | -104.5 | 8.868 |
| 0.0220 | 150.4 | 4.567 | 0.1550 | -108.9 | 8.943 |
| 0.0240 | 149.4 | 4.584 | 0.1560 | -113.3 | 9.017 |
| 0.0260 | 148.5 | 4.599 | 0.1570 | -117.0 | 9.079 |
| 0.0280 | 147.5 | 4.616 | 0.1580 | -120.7 | 9.142 |
| 0.0300 | 146.5 | 4.633 | 0.1590 | -123.8 | 9.194 |
| 0.0320 | 145.5 | 4.650 | 0.1600 | -127.1 | 9.250 |
| 0.0340 | 144.5 | 4.667 | 0.1625 | -134.9 | 9.381 |
| 0.0360 | 143.4 | 4.686 | 0.1650 | -141.5 | 9.493 |
| 0.0380 | 142.3 | 4.704 | 0.1675 | -147.4 | 9.592 |
| 0.0400 | 141.2 | 4.723 | 0.1700 | -152.7 | 9.682 |
| 0.0420 | 140.0 | 4.743 | 0.1725 | -157.8 | 9.768 |
| 0.0440 | 138.8 | 4.763 | 0.1750 | -162.3 | 9.843 |
| 0.0460 | 137.6 | 4.783 | 0.1775 | -166.6 | 9.914 |
| 0.0480 | 136.3 | 4.805 | 0.1800 | -170.5 | 9.982 |
| 0.0500 | 135.0 | 4.827 | 0.1825 | -174.1 | 10.042 |
| 0.0520 | 133.6 | 4.851 | 0.1850 | -177.7 | 10.103 |
| 0.0600 | 127.7 | 4.951 | 0.1875 | -181.1 | 10.160 |
| 0.0680 | 120.8 | 5.067 | 0.1900 | -184.4 | 10.216 |
| 0.0700 | 119.0 | 5.097 | 0.1925 | -187.6 | 10.270 |
| 0.0724 | 116.5 | 5.139 | 0.1950 | -190.7 | 10.322 |
| 0.0750 | 114.0 | 5.182 | 0.2000 | -196.6 | 10.421 |
| 0.0775 | 111.3 | 5.227 | 0.2025 | -199.4 | 10.468 |
| 0.0825 | 105.4 | 5.327 | 0.2050 | -202.2 | 10.516 |
| 0.0850 | 102.2 | 5.381 | 0.2075 | -204.8 | 10.559 |
| 0.0875 | 98.8 | 5.438 | 0.2100 | -207.5 | 10.605 |
| 0.0900 | 95.1 | 5.500 | 0.2125 | -210.0 | 10.647 |
| 0.0925 | 91.0 | 5.569 | 0.2150 | -212.5 | 10.689 |
| 0.0950 | 86.5 | 5.645 | 0.2175 | -215.0 | 10.731 |
| 0.0975 | 81.7 | 5.726 | 0.2200 | -217.4 | 10.772 |
| 0.1000 | 76.4 | 5.816 | 0.2225 | -219.8 | 10.812 |
| 0.1025 | 70.2 | 5.920 | 0.2250 | -222.2 | 10.853 |
| 0.1050 | 63.7 | 6.030 | 0.2275 | -224.5 | 10.892 |
| 0.1075 | 56.5 | 6.152 | 0.2300 | -226.8 | 10.930 |
| 0.1100 | 48.9 | 6.280 | 0.2325 | -229.1 | 10.969 |
| 0.1125 | 40.7 | 6.418 | 0.2350 | -231.3 | 11.006 |
| 0.1151 | 32.4 | 6.558 | 0.2385 | -234.5 | 11.061 |
| 0.1175 | 24.8 | 6.686 | 0.2400 | -235.7 | 11.081 |
| 0.1160 | 23.3 | 6.712 | 0.2425 | -237.9 | 11.118 |
| 0.1200 | 17.6 | 6.808 | 0.2450 | -240.0 | 11.154 |
| 0.1210 | 14.8 | 6.855 | 0.2475 | -242.2 | 11.191 |
| 0.1220 | 12.1 | 6.901 | 0.2501 | -244.2 | 11.225 |
| 0.1230 | 9.3 | 6.948 | 0.2525 | -246.2 | 11.259 |
| 0.1240 | 6.6 | 6.993 | 0.2550 | -248.2 | 11.292 |
| 0.1260 | 1.3 | 7.083 | 0.2575 | -250.0 | 11.324 |
| 0.1270 | -1.3 | 7.127 | 0.2600 | -251.8 | 11.354 |
| 0.1280 | -4.0 | 7.172 | 0.2625 | -253.7 | 11.387 |
| 0.1290 | -6.6 | 7.216 | 0.2650 | -255.3 | 11.414 |
| 0.1300 | -9.1 | 7.258 | 0.2675 | -256.9 | 11.441 |
| 0.1320 | -14.4 | 7.348 | 0.2700 | -258.6 | 11.470 |
| 0.1340 | -19.6 | 7.435 | 0.2725 | -260.1 | 11.496 |
| 0.1360 | -25.1 | 7.528 | 0.2750 | -261.6 | 11.522 |
| 0.1380 | -31.1 | 7.629 | 0.2775 | -263.0 | 11.545 |
| 0.1390 | -34.2 | 7.682 | 0.2800 | -264.4 | 11.570 |

Tab. 28. Dados da curva de titulação linearizada, da proteína de Bence Jones (JJO), em uréia 9,10 M, cujos parâmetros foram apresentados na tabela 23

| FUNÇÕES DE GRAM MODIFICADAS PARA HCL | | | |
|---|-------|-------------|-------------|
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.0021 | 4.432 | 4.590E-03 | 5.159E-03 |
| 0.0040 | 4.444 | 4.371E-03 | 4.910E-03 |
| 0.0060 | 4.456 | 4.156E-03 | 4.647E-03 |
| 0.0080 | 4.469 | 3.916E-03 | 4.385E-03 |
| 0.0100 | 4.483 | 3.680E-03 | 4.122E-03 |
| 0.0120 | 4.496 | 3.449E-03 | 3.860E-03 |
| 0.0140 | 4.510 | 3.223E-03 | 3.598E-03 |
| 0.0160 | 4.523 | 3.002E-03 | 3.335E-03 |
| 0.0180 | 4.538 | 2.758E-03 | 3.073E-03 |
| 0.0200 | 4.552 | 2.546E-03 | 2.810E-03 |
| 0.0220 | 4.567 | 2.312E-03 | 2.548E-03 |
| 0.0240 | 4.584 | 2.057E-03 | 2.286E-03 |
| 0.0260 | 4.599 | 1.833E-03 | 2.023E-03 |
| 0.0280 | 4.616 | 1.590E-03 | 1.761E-03 |
| 0.0300 | 4.633 | 1.352E-03 | 1.498E-03 |
| 0.0320 | 4.650 | 1.119E-03 | 1.236E-03 |
| 0.0340 | 4.667 | 8.912E-04 | 9.736E-04 |
| 0.0360 | 4.686 | 6.459E-04 | 7.112E-04 |
| 0.0380 | 4.704 | 4.062E-04 | 4.488E-04 |
| 0.0400 | 4.723 | 1.719E-04 | 1.864E-04 |
| 0.0420 | 4.743 | -7.818E-05 | -7.600E-05 |
| 0.0440 | 4.763 | -3.224E-04 | -3.384E-04 |
| 0.0460 | 4.783 | -5.610E-04 | -6.008E-04 |
| 0.0480 | 4.805 | -8.137E-04 | -8.632E-04 |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL= .0414207 | | | |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999937 | | | |
| PARA ACIDO HA1 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.0750 | 5.182 | 3.658E-07 | 3.592E-07 |
| 0.0775 | 5.227 | 3.379E-07 | 3.331E-07 |
| 0.0825 | 5.327 | 2.820E-07 | 2.811E-07 |
| 0.0850 | 5.381 | 2.547E-07 | 2.550E-07 |
| 0.0875 | 5.438 | 2.278E-07 | 2.290E-07 |
| 0.0900 | 5.500 | 2.008E-07 | 2.029E-07 |
| 0.0925 | 5.569 | 1.733E-07 | 1.769E-07 |
| 0.0950 | 5.645 | 1.461E-07 | 1.509E-07 |
| 0.0975 | 5.726 | 1.204E-07 | 1.248E-07 |
| 0.1000 | 5.816 | 9.511E-08 | 9.878E-08 |
| 0.1025 | 5.920 | 6.885E-08 | 7.274E-08 |
| 0.1050 | 6.030 | 4.468E-08 | 4.670E-08 |
| 0.1075 | 6.152 | 2.047E-08 | 2.066E-08 |
| 0.1100 | 6.280 | -3.379E-09 | -3.377E-09 |
| 0.1125 | 6.418 | -2.866E-08 | -3.142E-08 |
| 0.1151 | 6.558 | -5.500E-08 | -5.850E-08 |
| 0.1175 | 6.686 | -8.065E-08 | -8.350E-08 |
| 0.1180 | 6.712 | -8.592E-08 | -8.870E-08 |
| COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999708 | | | |
| VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1= .109484 | | | |
| CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA1= 1.04158E-05 | | | |
| PARA ACIDO HA2 | | | |
| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
| 0.1270 | 7.127 | 1.274E-09 | 1.262E-09 |
| 0.1280 | 7.172 | 1.194E-09 | 1.193E-09 |
| 0.1290 | 7.216 | 1.120E-09 | 1.123E-09 |
| 0.1300 | 7.258 | 1.052E-09 | 1.053E-09 |
| 0.1320 | 7.348 | 9.059E-10 | 9.133E-10 |
| 0.1340 | 7.435 | 7.713E-10 | 7.737E-10 |

| | | | |
|--------|-------|------------|------------|
| 0.1360 | 7.529 | 0.339E-10 | 6.341E-10 |
| 0.1380 | 7.629 | 4.917E-10 | 4.945E-10 |
| 0.1390 | 7.682 | 4.230E-10 | 4.247E-10 |
| 0.1400 | 7.736 | 3.553E-10 | 3.549E-10 |
| 0.1420 | 7.855 | 2.150E-10 | 2.153E-10 |
| 0.1440 | 7.990 | 7.464E-11 | 7.568E-11 |
| 0.1460 | 8.142 | -6.333E-11 | -6.393E-11 |
| 0.1480 | 8.311 | -1.978E-10 | -2.035E-10 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999957

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2= .145084

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2= 6.9804E-08
PARA ACIDO HA3

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|-------|-------------|-------------|
| 0.1480 | 8.311 | 3.000E-11 | 3.008E-11 |
| 0.1500 | 8.502 | 6.492E-12 | 6.168E-12 |
| 0.1510 | 8.605 | -6.140E-12 | -5.787E-12 |
| 0.1520 | 8.698 | -1.764E-11 | -1.774E-11 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999902

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3= .150516

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3= 1.19547E-08
PARA ACIDO HA4

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.1600 | 9.250 | 3.979E-12 | 3.842E-12 |
| 0.1625 | 9.381 | 3.297E-12 | 3.298E-12 |
| 0.1650 | 9.493 | 2.715E-12 | 2.754E-12 |
| 0.1675 | 9.592 | 2.155E-12 | 2.211E-12 |
| 0.1700 | 9.682 | 1.623E-12 | 1.667E-12 |
| 0.1725 | 9.768 | 1.054E-12 | 1.123E-12 |
| 0.1750 | 9.843 | 5.434E-13 | 5.797E-13 |
| 0.1775 | 9.916 | 1.739E-14 | 3.600E-14 |
| 0.1800 | 9.982 | -4.770E-13 | -5.077E-13 |
| 0.1825 | 10.042 | -9.543E-13 | -1.051E-12 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO=-.999134

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4= .177666

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA4= 2.17469E-10
PARA ACIDO HA5

| VOLUME | pH | FG REFINADA | FG AJUSTADA |
|--------|--------|-------------|-------------|
| 0.2075 | 10.559 | 8.452E-13 | 8.208E-13 |
| 0.2100 | 10.605 | 8.020E-13 | 7.851E-13 |
| 0.2125 | 10.647 | 7.648E-13 | 7.496E-13 |
| 0.2150 | 10.689 | 7.257E-13 | 7.141E-13 |
| 0.2175 | 10.731 | 6.853E-13 | 6.787E-13 |
| 0.2200 | 10.772 | 6.473E-13 | 6.432E-13 |
| 0.2225 | 10.812 | 6.082E-13 | 6.077E-13 |
| 0.2250 | 10.853 | 5.685E-13 | 5.722E-13 |
| 0.2275 | 10.892 | 5.312E-13 | 5.367E-13 |
| 0.2300 | 10.930 | 4.934E-13 | 5.012E-13 |
| 0.2325 | 10.969 | 4.552E-13 | 4.657E-13 |
| 0.2350 | 11.008 | 4.193E-13 | 4.302E-13 |
| 0.2385 | 11.061 | 3.652E-13 | 3.808E-13 |
| 0.2400 | 11.081 | 3.463E-13 | 3.593E-13 |
| 0.2425 | 11.119 | 3.092E-13 | 3.238E-13 |
| 0.2450 | 11.154 | 2.742E-13 | 2.883E-13 |
| 0.2476 | 11.191 | 2.366E-13 | 2.514E-13 |
| 0.2501 | 11.225 | 2.032E-13 | 2.159E-13 |
| 0.2525 | 11.259 | 1.684E-13 | 1.818E-13 |
| 0.2550 | 11.293 | 1.334E-13 | 1.463E-13 |
| 0.2575 | 11.324 | 1.025E-13 | 1.109E-13 |
| 0.2600 | 11.354 | 7.072E-14 | 7.537E-14 |
| 0.2625 | 11.387 | 3.563E-14 | 3.988E-14 |
| 0.2650 | 11.414 | 6.829E-15 | 4.395E-15 |
| 0.2675 | 11.441 | -2.294E-14 | -3.109E-14 |
| 0.2700 | 11.470 | -5.620E-14 | -6.658E-14 |
| 0.2725 | 11.496 | -8.558E-14 | -1.021E-13 |
| 0.2750 | 11.522 | -1.160E-13 | -1.376E-13 |
| 0.2775 | 11.548 | -1.450E-13 | -1.730E-13 |

COEFICIENTE DE CORRELACAO =-.999023

VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5= .26531

CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA5= 1.4195E-11

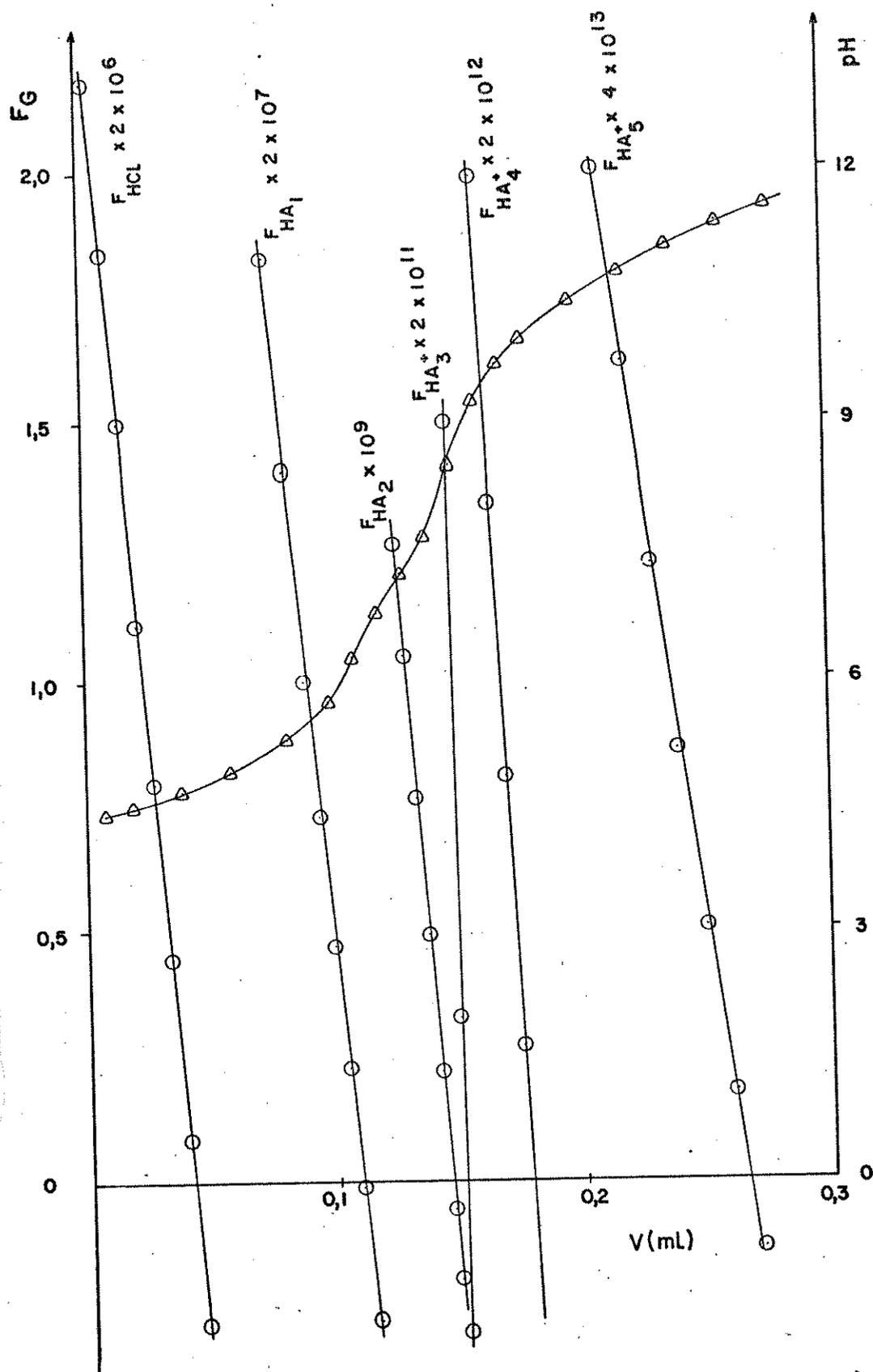


Figura 19. Curvas de titulação da proteína de Bence Jones (JJO), em uréia 9,10 M e KCl 0,10 M, referentes aos dados das tabelas 27 e 28. (Δ) - curva normal (ordenada à direita); (\circ) - curva linearizada (ordenada à esquerda).

Tab. 29. Estequiometria das séries de grupos titulados na proteína de Bence Jones (JJO), desnaturada em uréia 9,10 M`

| Série de Grupos | N ^{a,b} |
|------------------------------|------------------|
| HA ₁ | 12,9 ±1,1 |
| HA ₂ | 6,97±0,01 |
| HA ₃ ⁺ | 0,78±0,15 |
| HA ₄ ⁺ | 4,58±0,11 |
| HA ₅ ⁺ | 17,37±0,19 |

a - média de 2 determinações

b- número de grupos/mol de proteínas
PM = 22 600

Tab. 30. Valores de K_a e pK_a determinados para as séries de grupos titulados na proteína de Bence Jones (JJO), desnaturada em uréia 9,10 M

| Série de Grupos | K _a [*] | pK _a |
|------------------------------|--|-----------------|
| HA ₁ | (9,4 ₃ ±0,9 ₉)x10 ⁻⁶ | 5,0 |
| HA ₂ | (6,8 ₈ ±0,1 ₀)x10 ⁻⁸ | 7,16 |
| HA ₃ ⁺ | (1,0 ₉ ±0,1 ₁)x10 ⁻⁸ | 7,96 |
| HA ₄ ⁺ | (2,14±0,03)x10 ⁻¹⁰ | 9,67 |
| HA ₅ ⁺ | (1,47±0,05)x10 ⁻¹¹ | 10,83 |

* - média de 2 determinações

VII.7. DISCUSSÃO

O total de grupos titulados na proteína BJ(JJO), determinado pelos dois tipos de experiências, é concordante: (42,4 grupos na proteína desnaturada em ácido e 42,6 grupos na proteína desnaturada em uréia 9,10 M). Isso indica que todos os grupos ionizáveis da proteína são expostos por ação desses dois agentes desnaturantes. Entretanto, a diferente distribuição nas séries de grupos das duas experiências, comprova não ser o mesmo o estado da proteína resultante da ação dos dois desnaturantes.

Normalmente, as separações de grupos obtidos de experiências em uréia são mais coincidentes com os valores da seqüência de aminoácidos que as separações obtidas de experiências com a proteína nativa^(23,112). O desenrolamento da cadeia polipeptídica promovido por soluções de uréia elimina boa parte das interações não covalentes. Os grupos podem, então, assumir seus comportamentos normais.

Neste trabalho, observa-se também que os resultados obtidos em uréia (tabelas 29 e 30) estão mais de acordo com a expectativa, por isso, a discussão será iniciada por eles.

Devido ao desconhecimento do número de grupos carboxílicos presentes na proteína, a análise dos resultados da titulação em uréia será iniciada pelos grupos que se ionizam na região alcalina. A composição de aminoácidos sugere a presença de 22 grupos (11 fenólicos e 11 ϵ -aminos) sujeitos à ionização nessa região. Os resultados da titulação da proteína desnatura

da em uréia 9,10 M estão plenamente de acordo com o esperado. Acima de pH 8,5, 22,0 grupos foram titulados em duas séries: a série HA_4^+ com $pK_a=9,24$ constituída por 4,6 grupos/mol; a série HA_5^+ com $pK_a=10,49$, contendo 17,4 grupos/mol.

Provavelmente os grupos que constituem a série HA_4^+ correspondem aos resíduos de tirosina mais reativos, que foram observados em experiências de modificação química⁽¹⁰⁷⁾. A série HA_5^+ é formada pelos demais resíduos de tirosina e pelos 11 resíduos de lisina, todos normais.

Duas séries de grupos (HA_2 e HA_3^+) foram encontradas na região neutra das curvas de titulação (pH 6-8,5), possuindo um total de 7,8 grupos. A série HA_3^+ , contendo 0,8 grupo, possui valor de pK_a característico do grupo α -amino. Na série HA_2 , foram determinados 7 grupos com $pK_a = 7,16$. Dois desses grupos são os imidazóis dos 2 resíduos de histidina da proteína BJ (JJO), apresentando comportamento normal de ionização. Os outros 5 só podem ser grupos carboxílicos que foram titulados numa região de pH acima da normal.

Esses 5 grupos carboxílicos anormais, somados aos demais 13 grupos carboxílicos normais, que foram encontrados na série HA_1 com $pK_a = 5,0$, apontam para um total de 18 grupos carboxílicos na proteína BJ(JJO) na forma monomérica..

Um desses grupos deve ser o α -carboxílico e os outros 17 devem corresponder à soma dos resíduos (Asp+Glu) da proteína.

Proteínas de Bence Jones de indivíduos diferentes são diferentes entre si, mas a grande diferença se manifesta na distribuição dos grupos ao longo da cadeia polipeptídica, princi-

proteína em uréia 9,10 M, é concordante com a média de grupos carboxílicos presentes em outras proteínas de Bence Jones.

Ao contrário, a interpretação dos resultados da titulação da proteína desnaturada por ácido (tabela 25 e 26) não é tão simples.

Onze grupos carboxílicos normais, com $pK_a = 4,16$, constituem a série HA_1 . Entretanto, na região neutra (pH 5,5-8,0), observa-se que ocorreu a titulação de grupos de várias naturezas químicas, nas séries HA_2 e HA_3^+ . Os valores de pK_a das séries HA_2 e HA_3^+ são característicos dos grupos imidazol e α -amino, mas a contagem dos grupos nas duas séries é superior à soma dos imidazóis e α -amino da proteína (JJO).

Além dos grupos carboxílicos que não foram titulados em HA_1 , dos dois imidazóis e do grupo α -amino, outros grupos foram titulados nessa região.

A ionização de vários tipos de grupos na região neutra foi também observada na titulação potenciométrica da IgG1 (JJO) em condições semelhantes⁽³⁷⁾. O mesmo ocorre com outras proteínas que sofrem mudanças conformacionais durante a titulação⁽⁷⁾.

As proteínas de Bence Jones passam por mudanças conformacionais a pH 4 e a pH 10,2^(102,106). Tentativas de se construir as curvas de titulação inversa, após a proteína ser levada a extremos de pH, não foram bem sucedidos⁽¹⁰⁶⁾ e forneceram indícios de desnaturação irreversível por exposição a pH 2 ou 12.

É possível que os grupos acima sejam grupos fenólicos que estavam envolvidos diretamente no arranjo conformacional da es

estrutura nativa, mas que foram liberados, quando a proteína foi tratada por ácido. Quando o pH foi de novo aumentado, pela adição do titulante, a proteína não deve ter retornado à conformação nativa, mas assumindo um estado intermediário em que esses grupos não ficaram totalmente livres das interações anteriores, o que se manifestou através de seus diferentes comportamentos de ionização.

As séries encontradas na região alcalina HA_4^+ e HA_5^+ contêm um total de 14 grupos. É possível que correspondam aos 11 grupos ϵ -aminos e 3 grupos fenólicos normais.

De qualquer maneira, a titulação da proteína de Bence Jones (JJO) desnaturada por ácido também confirma a existência de 17-18 grupos carboxílicos na proteína, como se justifica a seguir.

A proteína (JJO) contém 42,4 grupos ionizáveis/mol de proteína. A titulação da proteína desnaturada em uréia confirma que esse é o total de grupos ionizáveis na mesma. A composição de aminoácidos indica que, além dos grupos carboxílicos, outros 25 grupos/mol de proteína são ionizáveis. São os seguintes: 2 imidazóis, 1 α -amino, 11 fenólicos e 11 ϵ -aminos. Subtraindo-se esse valor do total de grupos ionizáveis na proteína, encontra-se o total de grupos carboxílicos, que é de 17,4 grupos/mol.

VIII. CONCLUSÕES

As investigações empreendidas no procedimento de calibração dos eletrodos em soluções de uréia demonstraram que a utilização de soluções titulantes 0,1 M provoca considerável alteração do meio parcialmente aquoso durante a titulação. Diante de tal variação, o meio iônico formado por KCl 0,10 M não é suficiente para manter estáveis os fatores que contribuem para o potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade.

Quando se utiliza o titulante com concentração dez vezes maior, a variação na composição da solução parcialmente aquosa é dez vezes menor e assim, o potencial de junção líquida e/ou os coeficientes de atividade devem ser menos afetados. As funções de Gran, utilizadas para determinar os volumes de equivalência das titulações de calibração, não se afastam da linearidade em toda a extensão da titulação e praticamente, não se observa variação de potencial de junção líquida e/ou coeficientes de atividade.

Todavia, mesmo nas titulações em que há considerável alteração no meio parcialmente aquoso, as variações do potencial de junção líquida podem ser estimados.

De todo modo, durante a titulação é mais aconselhável a manutenção do meio parcialmente aquoso o mais próximo possível das condições iniciais.

As modificações introduzidas nos programas de cálculo PROTE (para titulações em meio aquoso) e PROTE MODIFICADO (para titulações em soluções de uréia) consistiram em abolir

aproximações que foram inseridas na dedução das equações, que descrevem as titulações dos ácidos fracos HA_2 , HA_3^+ , HA_4^+ , HA_5^+ .

As equações completas resultantes, incorporadas aos programas, permitiram que o limite superior de separação de 5 ácidos fracos fosse atingido, nas titulações de proteínas.

Nas versões anteriores desses programas, geralmente só se conseguia separar um máximo de 4 séries de grupos com os dados das titulações de proteínas. Com a proteína de Bence Jones desnaturada em uréia, o programa PROTE MODIFICADO não conseguia separar mais que 3 séries de grupos. As séries com menor teor de grupos eram incorporadas às séries vizinhas, mais ricas em grupos.

Com esse aperfeiçoamento dos programas de cálculo, a ionização dos grupos da proteína é acompanhado com maior rigor, e mais informações podem ser obtidas dos resultados.

O tratamento dos dados das curvas de titulação potenciométrica da lisozima em uréia 9,30 M, levando-se em consideração o efeito da uréia sobre o pH medido, forneceu resultados diferentes dos anteriormente obtidos de titulações semelhantes mas onde o efeito da basicidade da uréia foi desconsiderado⁽³⁷⁾.

A análise dos resultados baseada em informações mais recentes, que consideram a existência de 10 grupos carboxílicos na lisozima, sugere que todos os grupos carboxílicos, o grupo imidazol, o grupo α -amino e a maioria dos grupos fenólicos e ϵ -aminos ionizam-se, em uréia, em suas regiões normais de pH. Mas a ionização de um grupo de natureza química desconhecida, que ocorreu na mesma série do grupo imidazol, provocou sérias

ção em ácido ou em uréia.

A desnaturação em uréia 9,10 M parece levar as moléculas da proteína ao estado completamente desordenado. Essa conclusão se fundamenta na verificação de que todos os grupos ionizáveis apresentaram comportamento normal frente à titulação ácido-base.

As mudanças conformacionais pelas quais as proteínas de Bence Jones passam, na região de pH coberta pelas titulações potenciométricas, envolvem diretamente 8 grupos que foram tentativamente identificados como sendo fenólicos dos resíduos de tirosina.

As titulações potenciométricas da proteína desnaturada indicaram a existência de 42,4-42,6 grupos ionizáveis na proteína BJ(JJO) monomérica. Dezoito deles são grupos carboxílicos, sendo um grupo carboxílico-terminal e dezessete grupos carboxílicos dos resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam mais uma vez a grande eficiência do procedimento utilizado em descrever o comportamento ácido-base de grupos ionizáveis de proteínas. Por caminhos diferentes dos tradicionais e com o auxílio de informações dadas por estudos de diversos tipos, foi possível identificar a ionização de grupos relativamente raros em proteínas e grupos diretamente envolvidos no arranjo nativo de proteínas.

Essa necessidade de relacionamento de resultados de diversas fontes é essencial no estudo de sistemas tão complexos como são as proteínas. Conscientes dessa realidade, o grupo vem

tentando ampliar os estudos nessa área.

Investigações atualmente em andamento no laboratório vêm acompanhando o comportamento ácido-base das proteínas, pela observação de outras propriedades físico-químicas do sistema. Assim, estudos preliminares têm mostrado a possibilidade de se titular os grupos guanidinos das proteínas por titulação termométrica, o que não se consegue pela titulação potenciométrica.

Outro aspecto que vem sendo investigado é o de proteínas que são estáveis apenas numa estreita faixa de pH. Com o procedimento atual, não é possível estudá-las na forma nativa, devido à exigência de excesso de ácido. Um programa de cálculo que elimine esta exigência está sendo desenvolvido.

IX. REFERÊNCIAS

1. YUDKIN, M., OFFORD, R., "Comprehensible Biochemistry", Longman, London (1973).
2. LEHNINGER, A.L., "Biochemistry", 2nd Ed., Worth Publishers, New York (1972).
3. CONN, E.E., STUMPF, P.K., "Introdução à Bioquímica", Edgard Blücher, São Paulo (1980).
4. WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L., "Principles of Biochemistry", 4th Ed., MacGraw-Hill, New York (1968).
5. MAHLER, H.R., CORDES, E.H., "Biological Chemistry", Harper International, New York (1969).
6. KENCHINGTON, A.W., em "Analytical Methods in Protein Chemistry", (Alexander, P., Blake, R.J., eds.), Pergamon Press, New York, p. 353 (1960).
7. TANFORD, C., Adv. Protein Chem. 17, 69 (1962).
8. STEINHARDT, J., BEYCHOK, S., em "The Proteins", (Neurath, H., ed.), 2nd. Ed., Vol. II, Academic Press, New York, p. 139 (1964).
9. STEINHARDT, J., REYNOLDS, J.A., "Multiple Equilibria in Proteins", Academic Press, New York (1969).
10. CANNAN, R.K., Chem. Rev. 30, 395 (1942).
11. LINDERSTRØM-LANG, K., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg (Sér. chim.) 15, nº 7 (1924).
12. TANFORD, C., WAGNER, M., J. Am. Chem. Soc. 76, 3331 (1954).
13. TANFORD, C., ROXBY, R., Biochemistry 11, 2192 (1972).

30. SHÄFER, O.F., Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 80, 529 (1976).
31. WYMAN, Jr., J., J. Am. Chem. Soc. 55, 4116 (1933).
32. LEVY, M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg (Sér. Chim.)
30, 301 (1958).
33. RIEDL, B., JOLICOEUR, C., J. Phys. Chem. 88, 3348 (1984).
34. BLUMENFELD, O.O., LEVY, M., Arch. Biochem. Biophys. 76,
97 (1958).
35. FOSTER, J.F., STERMAN, M.D., J. Am. Chem. Soc. 78, 3656
(1956).
36. MARINI, M.A., WUNSCH, C., Biochemistry 2, 1454 (1963).
37. ALVES, J.P.H., "Linearização da Curva de Titulação Potenciométrica de Proteínas. Aplicação à Lisozima, β -Lactoglobulina e Imunoglobulina Humana", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1982).
38. BATES, R.G., Crit. Rev. Anal. Chem. 10, 247 (1981).
39. BATES, R.G., "Determination of pH", 2nd Ed., John Wiley, New York (1973).
40. FELDMAN, I., Anal. Chem. 28, 1859 (1956).
41. BATES, R.G., PAABO, M., ROBINSON, R.A., J. Phys. Chem. 67, 1833 (1963).
42. GELSEMA, W.J., DE LIGNY, C.L., REMIJNSE, A.G., Rec. Trav. Chim. 85, 647 (1966).
43. BIEDERMANN, G., SILLÉN, L.J., Arkiv Kem. 5, 425 (1953).
44. IRVING, H.M., MILES; M.G., PETTIT, L.D., Anal. Chim. Acta, 38, 475 (1967).
45. ROSSOTTI, F.J.C., ROSSOTTI, H., Acta Chem. Scand. 10, 957 (1956).

46. INGRI, N., LAGERSTRÖM, G., FRYDMAN, M., SILLÉN, L.G., Acta Chem. Scand. 11, 1034 (1957).
47. ROSSOTTI, F.J.C., ROSSOTTI, H., "The Determination of Stability Constants", McGraw-Hill, New York (1961).
48. PEHRSSON, L., INGMAN, F., AXEL, J., Talanta 23, 769 (1976).
49. VAN UITERT, L.G.G., HAAS, C.G., J. Am. Chem. Soc. 75, 451 (1953).
50. ROSSOTTI, F.J.C., ROSSOTTI, H., J. Phys. Chem. 68, 3773 (1964).
51. OHTAKI, H., BIEDERMANN, G., Bull. Chem. Soc. Japan 44, 1515 (1971).
52. GODINHO, O.E.S., ALEIXO, L.M., Anal. Biochem. 112, 323 (1981).
53. KOLTHOFF, I.M., SANDELL, E.B., "Textbook of Quantitative Inorganic Analysis", McMillan, New York (1967).
54. AZEVEDO, F.G., "Aplicações Ebulliométricas", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1981).
55. FISCHER, R.B., PETERS, D.G., "Chemical Equilibrium", W.B. Saunders Co., Philadelphia (1970).
56. HUSTON, D., KLOTZ, I., J. Phys. Chem. 75, 2123 (1971).
57. GRAN, G., Anal. Chem. 77, 661 (1952).
58. "Handbook of Biochemistry", (Sober, H.A., ed.), 2nd Ed., The Chemical Rubber Co., Cleveland (1970).
59. EDSALL, J.P., WYMAN, J., "Biophysical Chemistry", Vol I. Academic Press, New York (1958).
60. GREENSTEIN, J.P., "Chemistry of the Amino Acids", Vol. I,

John Wiley, New York (1961).

61. IMOTO, T., JOHNSON, L.N., NORTH, A.C.T., PHILIPS, D.C., RUPLEY, J.A., em "The Enzymes", (Boyer, P.D., ed.), 3rd Ed., Vol. 7, p. 665 Academic Press, New York (1972).
62. BLAKE, C.C.F., KOENIG, D.E., MAIR, G.A., NORTH, A.C.T., PHILIPS, D.C., SARIMA, V.R., Nature 206, 757 (1965).
63. HAMAGUCHI, K., HAYASHI, K., em "Proteins Structure and Function", (Funatsu, M., Hiromi, K., Imahori, K., Murachi, T., Narita, K., eds.), Vol. I, Kodansha Ltd., Tokyo, p. 88 (1972).
64. LEÓNIS, J., Arch. Biochem. Biophys. 65, 182 (1956).
65. BEYCHOK, S., WARNER, R.C., J. Am. Chem. Soc. 81, 1892 (1959).
66. STEINER, R.F., Biochim. Biophys. Acta 79, 51 (1964).
67. TANFORD, C., PAIN, R.H., OTCHIN, N.S., J. Mol. Biol. 15, 489 (1966).
68. CANFIELD, R.E., J. Biol. Chem. 238, 2698 (1963).
69. JOLLES, J., JAUREGUI-ADELL, J., BERNIER, I., JOLLES, P., Biochim. Biophys. Acta 78, 668 (1963).
70. RESS, A.R., OFFORD, R.E., Biochem. J. 130, 965 (1972).
71. IMOTO, T., OKAZAKI, K., YAMADA, H., FUJITA, K., YAMATO, T., J. Biochem. 90, 991 (1981).
72. DONOVAN, J.V., LASKOWSKI, Jr., M., SCHERAGA, H.A., J. Am. Chem. Soc. 82, 2154 (1960).
73. SAKAKIBARA, R., HAMAGUCHI, K., J. Biochem. 64, 613 (1968).
74. GODINHO, O.E.S., ALEIXO, L.M., HORA ALVES, J.P., Anal. Biochem. 123, 244 (1982).

75. EDELHOCH, H., STEINER, R.F., *Biochim. Biophys. Acta* 60, 365 (1962).
76. WELLS, R.L., OLSEN, K.W., *Physiol. Chem. Physics* 11, 345 (1979).
77. KUGIMIYA, M., BIGELOW, C.C., *Can. J. Biochem.* 51, 581 (1973).
78. GREENE, Jr., R.F., PACE, C.N., *J. Biol. Chem.* 249, 5388 (1974).
79. ROXBY, R., TANFORD, C., *Biochemistry* 10, 3348 (1971).
80. MARINI, M.A., MARTIN, C.J., *Anal. Letters* 13, 93 (1980).
81. PFEIL, W., PRIVALOV, P.L., *Biophys. Chem.* 4, 23 (1976).
82. KAARSHOLM, N.C., SCHACK, P., *Acta Chem. Scand. B* 38, 225 (1984).
83. MARINI, M.A., MARTIN, C.J., FORLANI, L., *Biopolymers* 20, 2243 (1981).
84. GERKEN, T.A., JENTOFT, J.E., JENTOFT, N., DEARBORN, D.G., *J. Biol. Chem.* 257, 2894 (1982).
85. ALLERHAND, A., NORTON, R.S., CHILDERS, R.F., *J. Biol. Chem.* 252, 1786 (1977).
86. CANNAN, R.K., KIBRICK, A., KIRKWOOD, J.G., LONGSWORTH, L. G., PALMER, A.H., STEINHARDT, J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 16, 241 (1941).
87. NISBET, A.D., SAUNDRY, R.H., MOIR, A.J.G., FORTHERGILL, L. A., FORTHERGILL, J.E., *Eur. J. Biochem.* 115, 335 (1984).
88. TABORSKY, G., *Adv. Protein Chem.* 28, 34 (1974).
89. HARRINGTON, W.F., *Biochim. Biophys. Acta* 18, 450 (1955).

90. RASPER, J., KAUZMANN, W., J. Am. Chem. Soc. 84, 1771
(1962).
91. SIMPSON, R.B., KAUZMANN, W., J. Am. Chem. Soc. 75, 5139
(1953).
92. WARREN, J.R., GORDON, J.A., Biochim. Biophys. Acta 229,
216 (1971).
93. GREENSTEIN, J.P., J. Biol. Chem. 128, 233 (1939).
94. TRISTAM, G.R. Adv. Protein Chem. 5, 83 (1949).
95. GREENSTEIN, J.P., J. Biol. Chem. 125, 501 (1938).
96. PUTNAM, F.W., Science 163, 633 (1969).
97. EDELMAN, G.M., Ann. Rev. Biochem. 38, 699 (1969).
98. KABAT, E.A., Adv. Protein Chem. 32, 1 (1978).
99. EDELMAN, G.M., Biochemistry 63, 78 (1969).
100. STEVENS, F.J., WESTHOLM, F.A., PANAGIOTOPOULOS, N.,
SOLOMON, A., SHIFFER, M., J. Mol. Biol. 147, 179
(1981).
101. BJÖRK, I., KARLSSON, F.A., BERGGÅRD, I. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 68, 1707 (1971).
102. AZUMA, T., HAMAGUCHI, K., MIGITA, S., J. Biochem. 71, 379
(1972).
103. AZUMA, T., HAMAGUCHI, K., MIGITA, S., J. Biochem. 72,
1457 (1972).
104. KATT, E.W., Diss. Abstr. Int. B 40, 1189 (1979).
105. AZUMA, T., HAMAGUCHI, K., MIGITA, S., J. Biochem. 73,
1259 (1973).
106. AZUMA, T., HIRAI, T., HAMAGUCHI, K., MIGITA, S., J. Bio-
chem. 67 801 (1970).

107. AZUMA, T., HAMAGUCHI, K., MIGITA, S., J. Biochem. 69, 535 (1971).
108. MARQUES, M.R.F., MARANGONI, S., OLIVEIRA; B., IRCS Med. Sci. 12, 1010 (1984).
109. MARQUES, M.R.F., MARANGONI, S., OLIVEIRA; B., IRCS Med. Sci., 1008 (1984).
110. MARQUES, M.R.F., MARANGONI, S., OLIVEIRA; B., submetido à publicação.
111. MARQUES, M.R.F., MARANGONI, S., OLIVEIRA; B., submetido à publicação.
112. RIGETTI, P.G., KRISNAMOORTHY, R., LAPOUME-ROULLIE, C., LABIE, D., J. Chromatogr. 117, 219 (1979).
113. DAYHOFF, M.O., "Atlas of Protein Sequence and Structure", National Biomedical Research Foundation, Silver Spring (1969).

ANEXO

LISTAGEM DO PROGRAMA NOVUREIA

```

1  CMD "Z", "ON"
2  PRINT TIME$
5  REM CALCULOS DE KA E VEQ SIMULTANEOS-FUNCOES DE GRAN
6  REM MODIFICADAS-LINEARIZACAO DE CURVAS DE TITULACAO
7  REM POTENCIOMETRICA
10 DIM V1(130),F(130),H(130),H1(130),V2(130),F2(130),V3(130),A1(130)
11 DIM A2(130),A3(130),Z(130),Z1(130),Z2(130),Z3(130),Z4(130)
12 DIM F3(130),F4(130),F5(130),F6(130),F7(130),H2(130),F8(130),A4(130)
13 DIM Z5(130),A5(130),I(130),T1(130),T2(130),T3(130),F1(130)
14 DIM F2(130),C1(130),C2(130),C3(130),T4(130),Z4(130),F9(130)
15 DIM D4(130),E1(130)
25 READ V,B,U,N,K2,K4,K6,K8,D2,M1
27 READ L1,L2
30 IF M1<=0.1 GOTO 90
33 READ E2,E3,W1,E4,E5,E6
35 FOR I=1 TO N
38 READ V1(I),E1(I)
39 LET H0=(LOG(1+((U*V)/((V+V1(I))*0.23)))/LOG(10))
40 LET H3=((E1(I)-E2)/59.16)-(H0)
42 IF H3>=-4 GOTO 50
45 LET H3=((E1(I)-E3)/59.16)-(H0)
47 LET E2=E3
48 LET W=W1/(1+((U*V)/((V+V1(I))*0.23)))
50 LET H4=(W*10E6)/10LH3
52 H5=((E1(I)-E2-E4*10EH3-E5*H4)/59.16)-(H0)
54 IF ABS(H5-H3)<=0.0001 GOTO 60
56 LET H3=H5
58 GOTO 50
60 LET H2(I)=(10EH5)*0.001
62 LET H1(I)=(H2(I)-W/H2(I))
64 LET P(I)=-LOG(H2(I))/LOG(10)
66 LET V2(I)=(V+V1(I))
68 NEXT I
70 IF E6=0 GOTO 140
72 PRINT
74 PRINT"   VOLUME           E/MV           pH"
76 A$="  ##.###      ###.##      ##.###"
80 PRINT
82 FOR I=1 TO N
84 PRINT USING A$;V1(I),E1(I),P(I)
86 NEXT I
88 GOTO 140
90 FOR I=1 TO N
95 READ V1(I),P(I)
100 LET H(I)=10E(-P(I))
110 LET H2(I) = H(I)/0.83
115 LET H1(I)=(H(I)/0.83-1E-14/(H(I)*0.755))
120 LET V2(I)=(V+V1(I))
125 NEXT I
140 FOR I=1 TO (L2+1)
150 LET F(I)=H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23)
155 LET F2(I)=F(I)
160 NEXT I
170 LET L=1
180 GOSUB 2000
190 LET K=X1/Y1
200 LET K1=Y-K*X
205 LET K1=K1/(-K)
210 PRINT"VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL="K1
215 IF K2=0 GOTO 395
220 LET C=K1
230 GOSUB 2350
240 LET K9=K1
250 FOR I=L TO (L+L2)
260 LET F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K2+H2(I))/B
270 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K1)*H2(I)
280 NEXT I
290 GOSUB 2000
300 LET K2=X1/Y1
310 LET K3=Y-K2*X

```

```

315 LET K3=K2/(-K2)
320 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1="K3
325 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA1="";-K4
330 IF K4=0 GOTO 355
335 LET C=K3
340 GOSUB 2350
345 FOR I=L TO (L+L2)
350 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K4+H2(I))/B
355 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K1)*H2(I)+(K3-K1)*K4-(K3-K1)*(K2/(K2+H2(I)))*(K4+H2(I))
360 NEXT I
365 GOSUB 2000
370 LET K4=X1/Y1
375 LET K5=Y-K4*X
380 LET K5=K5/(-K4)
385 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2="K5
390 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA2="";-K4
395 IF K5=0 GOTO 420
400 LET C=K5
405 GOSUB 2350
415 FOR I=L TO (L+L2)
420 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K5+H2(I))/B
425 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K1)*H2(I)+(K5-K1)*K4-(K5-K1)*(K2/(K2+H2(I)))*
      *(K5+H2(I))-(K5-K3)*(K4/(K4+H2(I)))*(K5+H2(I))
435 NEXT I
440 GOSUB 2000
445 LET K6=X1/Y1
450 LET K7=Y-K6*X
455 LET K7=K7/(-K6)
460 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3="K7
465 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO PARA HA3="";-K6
470 IF K7=0 GOTO 490
475 LET C=K7
480 GOSUB 2350
490 FOR I=L TO (L+L2)
500 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(K7+H2(I))/B
510 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K1)*H2(I)+(K7-K1)*K4-(K7-K1)*(K2/(K2+H2(I)))*
      *(K7+H2(I))-(K7-K3)*(K4/(K4+H2(I)))*(K7+H2(I))
520 NEXT I
530 GOSUB 2000
540 LET K8=X1/Y1
550 LET D1=Y-K8*X
560 LET D1=D1/(-K8)
565 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA4="D1
570 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA4="";-K8
575 IF D2=0 GOTO 600
580 LET C=D1
585 GOSUB 2350
590 FOR I=L TO (L+L2)
595 F1(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(D1+H2(I))/B
600 LET F2(I)=F1(I)+(V1(I)-K1)*H2(I)+(D1-K1)*D2-(K3-K1)*(K2/(K2+H2(I)))*
      *(D1+H2(I))-(K5-K3)*(K4/(K4+H2(I)))*(D1+H2(I))
605 NEXT I
610 GOSUB 2000
615 LET D2=X1/Y1
620 LET D3=Y-D2*X
625 LET D3=D3/(-D2)
630 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA5="D3
635 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACAO P/HA5="";-D2
640 PRINT "N1,N2,N3,N4,N5,N6,N7,N8,N9,N10,N11,N12"
650 INPUT N1,N2,N3,N4,N5,N6,N7,N8,N9,06,07,08
670 LET E=0
680 LET S=Z7
690 FOR I=1 TO N
700 LET A1(I)=-K2/(-K2+H2(I))
710 LET A2(I)=-K4/(-K4+H2(I))
720 LET A3(I)=-K6/(-K6+H2(I))
730 LET A4(I)=-K8/(-K8+H2(I))
740 LET A5(I)=-D2/(-D2+H2(I))
745 NEXT I
750 REM CALCULO DA F.GRAN MOD.REFINADA PARA HCL
760 FOR I=N1 TO (N1+N2)
770 LET F(I)=H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23)
775 IF K2<>0 GOTO 795
780 LET Z(I)=0
785 LET Z1(I)=0

```

```

730 GOTO 820
795 LET Z(1)=B*(K3-K9)*A1(I)
800 IF K4<>0 GOTO 815
805 LET Z1(I)=0
810 GOTO 820
815 LET Z1(I)=B*(K3-K9)*A2(I)
820 IF K6<>0 GOTO 840
825 LET Z2(I)=0
830 LET Z3(I)=0
835 GOTO 856
840 LET Z2(I)=B*(K7-K5)*A3(I)
845 IF K8<>0 GOTO 854
850 LET Z3(I)=0
852 GOTO 856
854 LET Z3(I)=B*(D1-K7)*A4(I)
856 IF D2<>0 GOTO 861
858 LET Z6(I)=0
860 GOTO 862
861 LET Z5(I)=B*(D3-D1)*A5(I)
862 Z4(I)=F(1)-Z(1)-Z1(I)-Z2(I)-Z3(I)-Z6(I)
863 LET F8(I)=Z4(I)
865 LET Z5(I)=(Z4(I)+V1(I)*B)/B
870 NEXT I
874 LET J=N1
875 LET J1=N2
876 GOSUB 2200
878 LET R1=R
879 LET B1=X1/Y1
900 LET Z7=Y-B1*X
905 LET Z7=Z7/(-B1)
920 LET K1=Z7
926 LET K9=Z7
930 REM CALCULO DA F GRAN MOD. REFINADA F/Ha1
940 IF K2=0 GOTO 1140
955 FOR I=N3 TO (N3+N4)
960 LET F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K2+H2(I))/B
965 LET F4(I)=(V1(I)-Z7)*H2(I)
966 IF K4<>0 GOTO 970
967 LET F5(I)=0
968 GOTO 971
970 LET F5(I)=(K5-K3)*A2(I)*(-K2+H2(I))
971 IF K6<>0 GOTO 975
972 LET F6(I)=0
973 LET F7(I)=0
974 GOTO 985
975 LET F6(I)=(K7-K5)*A3(I)*(-K2+H2(I))
977 IF K8<>0 GOTO 980
978 LET F7(I)=0
979 GOTO 985
980 LET F7(I)=(D1-K7)*A4(I)*(-K2+H2(I))
985 IF D2<>0 GOTO 988
986 LET F9(I)=0
987 GOTO 989
988 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K2+H2(I))
989 F8(I)=F3(I)+F4(I)-F5(I)-F6(I)-F7(I)-F9(I)
990 LET T(I)=F8(I)
995 NEXT I
999 LET J=N3
1000 LET J1=N4
1003 GOSUB 2200
1005 LET K2=X1/Y1
1010 LET K5=Y-K2*X
1015 LET K3=K3/(-K2)
1016 LET R2=R
1045 REM CALCULO DA F GRAN REFINADA PARA HAZ
1050 IF K4=0 GOTO 1140
1065 FOR I=N5 TO (N5+N6)
1070 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*U)/0.23))*(-K4+H2(I))/B
1075 LET F4(I)=(V1(I)-Z7)*H2(I)+(K3-Z7)*(-K4)-(K3-Z7)*A1(I)*(-K4+H2(I))
1076 IF K6<>0 GOTO 1080
1077 LET F6(I)=0
1078 LET F7(I)=0
1079 GOTO 1090
1080 LET F6(I)=(K7-K5)*A3(I)*(-K4+H2(I))
1081 IF K8<>0 GOTO 1085
1082 LET F7(I)=0
1083 GOTO 1090
1085 LET F7(I)=(D1-K7)*A4(I)*(-K4+H2(I))

```

1090 IF D2 <> 0 GOTO 1093

1091 LET F9(I)=0

1092 GOTO 1094

1093 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K4+H2(I))

1094 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)-F5(I)-F7(I)-F9(I)

1100 LET T1(I)=F8(I)

1103 NEXT I

1107 LET J=N5

1108 LET J1=N6

1110 GOSUB 2200

1115 LET K4=X1/Y1

1120 LET K5=Y-K4*X

1125 LET K5=K5/(-K4)

1133 LET K5=R

1140 REM CALCULO DA F GRAN MOD. REFINADA P. /B1H

1145 IF K6=0 GOTO 1441

1180 FOR I=N7 TO (N7+N8)

1185 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K6+H2(I))/B

1187 LET C1(I)=(V1(I)-Z7)*H2(I)+(K5-Z7)*(-K6)

1189 LET C2(I)=(K3-Z7)*A1(I)*(-K6+H2(I))+(K5-K3)*A2(I)*(-K6+H2(I))

1190 LET F4(I)=C1(I)-C2(I)

1191 IF K8 <> 0 GOTO 1195

1192 LET F5(I)=0

1193 GOTO 1200

1195 LET F5(I)=(D1-K7)*A4(I)*(-K6+H2(I))

1200 IF D2 <> 0 GOTO 1203

1201 LET F9(I)=0

1202 GOTO 1204

1203 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K6+H2(I))

1204 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)-F5(I)-F9(I)

1210 LET T2(I)=F8(I)

1212 NEXT I

1215 LET J=N7

1217 LET J1=N8

1220 GOSUB 2200

1225 LET K6=X1/Y1

1230 LET K7=Y-K6*X

1235 LET K7=K7/(-K6)

1239 LET K7=R

1386 REM CALCULO DA F. DE GRAN MOD. REFINADA PARA B2H

1387 IF K8 = 0 GOTO 1441

1388 FOR I=N9 TO (N9+G6)

1389 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-K8+H2(I))/B

1390 LET C1(I)=(V1(I)-Z7)*H2(I)+(K7-Z7)*(-K8)

1391 LET C2(I)=(K3-Z7)*A1(I)*(-K8+H2(I))+(K5-K3)*A2(I)*(-K8+H2(I))+(K7-K5)*A3(I)*(-K8+H2(I))

1392 LET F4(I)=C1(I)-C2(I)

1393 IF D2 <> 0 GOTO 1396

1394 LET F9(I)=0

1395 GOTO 1397

1396 LET F9(I)=(D3-D1)*A5(I)*(-K8+H2(I))

1397 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)-F9(I)

1398 LET T3(I)=F8(I)

1399 NEXT I

1400 LET J=N9

1401 LET J1=G6

1402 GOSUB 2200

1403 LET K8=X1/Y1

1404 LET D1=Y-K8*X

1405 LET D1=D1/(-K8)

1410 LET R5=R

1412 REM CALCULO DA F GRAN MOD. REFINADA P/HAS

1414 IF D2=0 GOTO 1441

1416 FOR I=G7 TO (G7+G8)

1418 F3(I)=(H1(I)*V2(I)+((H2(I)*U*V)/0.23))*(-D2+H2(I))/B

1419 LET C1(I)=(V1(I)-Z7)*H2(I)+(D1-Z7)*(-D2)

1420 LET C2(I)=(K3-Z7)*A1(I)*(-D2+H2(I))+(K5-K3)*A2(I)*(-D2+H2(I))

1421 LET C3(I)=(K7-K5)*A3(I)*(-D2+H2(I))+(D1-K7)*A4(I)*(-D2+H2(I))

1422 LET F4(I)=C1(I)-C2(I)-C3(I)

1423 LET F8(I)=F3(I)+F4(I)

1424 LET T4(I)=F8(I)

1426 NEXT I

1428 LET J=67

```
1430 LET S1=66
1432 GOSUB 2200
1434 LET D2=X1/Y1
1435 LET D3=Y-D2*X
1438 LET D3=D3/(-D2)
1440 LET K6=R
1441 GOTO 1442
1442 LET E=E+1
1443 IF Z7-S>0.00001 GOTO 600
1445 IF S-27<ABS(0.00001) GOTO 1452
1447 PRINT S,Z7
1450 GOTO 680
1451 GOTO 1525
1452 PRINT TAB(9);"FUNCIONES DE GRAN MODIFICADAS"
1453 PRINT
1454 PRINT TAB(10);" PARA HCL "
1456 PRINT"VOLUME      PH      FG REFINADA      FG AJUSTADA"
1457 A4="      HH.HHHH      HH.HHH      HH.HHHCEEE      HH.HHHCEEE"
1458 PRINT
1459 FOR I=N1 TO (N1+N2)
1460 LET FB(I)=Z7*B-V1(I)*B
1461 PRINT USING A4;V1(I),P(I),Z4(I),FB(I)
1462 NEXT I
1463 PRINT
1464 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HCL="Z7
1465 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACION="R1
1466 IF K2=0 GOTO 1542
1467 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA1"
1468 PRINT"VOLUME      PH      FG REFINADA      FG AJUSTADA"
1469 A4="      HH.HHHH      HH.HHH      HH.HHHCEEE      HH.HHHCEEE"
1470 PRINT
1471 FOR I=N3 TO (N3+N4)
1472 LET FB(I)=K3*(-K2)-V1(I)*(-K2)
1473 PRINT USING A4;V1(I),P(I),T(I),FB(I)
1474 NEXT I
1475 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACION="R2
1476 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA1="K3
1478 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACION P/HA1=";-K2
1479 IF K4=0 GOTO 1493
1480 PRINT
1481 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA2"
1482 PRINT
1483 PRINT"VOLUME      PH      FG REFINADA      FG AJUSTADA"
1484 A4="      HH.HHHH      HH.HHH      HH.HHHCEEE      HH.HHHCEEE"
1485 PRINT
1486 FOR I=N5 TO (N5+N6)
1487 LET FB(I)=N5*(-K4)-V1(I)*(-K4)
1488 PRINT USING A4;V1(I),P(I),T1(I),FB(I)
1489 NEXT I
1490 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACION="R3
1491 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA2="N5
1492 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACION PARA HA2=";-K4
1493 IF K6=0 GOTO 1542
1494 PRINT
1495 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA3"
1496 PRINT
1497 PRINT"VOLUME      PH      FG REFINADA      FG AJUSTADA"
1498 A4="      HH.HHHH      HH.HHH      HH.HHHCEEE      HH.HHHCEEE"
1499 PRINT
1500 FOR I=N7 TO (N7+N8)
1501 LET FB(I)=K7*(-K6)-V1(I)*(-K6)
1502 PRINT USING A4;V1(I),P(I),T2(I),FB(I)
1503 NEXT I
1504 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACION="R4
1505 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HA3="K7
1506 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIACION PARA HA3=";-K6
1507 IF K8=0 GOTO 1542
1508 PRINT
1509 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HA4"
1510 PRINT
1511 PRINT"VOLUME      PH      FG REFINADA      FG AJUSTADA"
1512 A4="      HH.HHHH      HH.HHH      HH.HHHCEEE      HH.HHHCEEE"
1513 PRINT
1514 FOR I=N9 TO (N9+N4)
1515 LET FB(I)=D1*(-K8)-V1(I)*(-K8)
1516 PRINT USING A4;V1(I),P(I),T3(I),FB(I)
1517 NEXT I
```

```

1518 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO = "D5
1519 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HAS="D1
1520 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO PARA HAS="D2
1521 PRINT
1522 IF D2=0 GOTO 1542
1523 PRINT TAB(17);"PARA ACIDO HAS"
1524 PRINT
1525 PRINT "VOLUME      pH      FB REFINADA      FB AJUSTADA"
1526 A$="  BB.BBBB      BB.BBB      BB.BBBLLL      BB.BBBLLL"
1527 PRINT
1528 FOR I=67 TO (67+68)
1529 LET F8(I)=D3*(-D2)-V1(I)*(-D2)
1530 PRINT USING A$;V1(I),F(I),T4(I),F8(I)
1531 NEXT I
1532 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO = "R6
1533 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA PARA HAS="D5
1534 PRINT "CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO PARA HAS="D2
1535 PRINT
1536 PRINT "CONCENTRAÇÃO DA BASE=";B1
1540 PRINT
1542 PRINT "NO. DE INTERAÇÕES="E
1544 FOR I=7 TO (87+85)
1545 PRINT TIME$
1546 CND"Z";"OFF"
1547 STOP
1548 NEXT I
1636 NEXT I
2000 LET Y=0
2060 LET X=0
2070 FOR I=L TO (L+L2)
2080 LET Y=Y+F2(I)
2090 LET X=X+V1(I)
2100 NEXT I
2110 LET X=X/(L2+1)
2120 LET Y=Y/(L2+1)
2130 LET X1=0
2140 LET Y1=0
2150 FOR I=L TO (L+L2)
2160 LET X1=X1+(V1(I)-X)*F2(I)
2170 LET Y1=Y1+(V1(I)-X)F2
2180 NEXT I
2190 RETURN
2200 LET Y=0
2210 LET X=0
2220 FOR I=J TO (J+J1)
2230 LET Y=Y+F8(I)
2240 LET X=X+V1(I)
2250 NEXT I
2260 LET X=X/(J1+1)
2270 LET Y=Y/(J1+1)
2280 LET X1=0
2290 LET Y1=0
2292 LET X2=0
2293 LET Y2=0
2294 LET Y3=0
2300 FOR I=J TO (J+J1)
2310 LET X1=X1+(V1(I)-X)*(F8(I)-Y)
2320 LET Y1=Y1+(V1(I)-X)F2
2321 LET X2=X2+(V1(I)-X)F2
2322 LET Y2=Y2+(F8(I)-Y)F2
2323 LET Y3=(V1(I)-X)*(F8(I)-Y)+Y3
2330 NEXT I
2331 LET X4=X2*Y2
2332 LET R=Y3/SQR(X4)
2340 RETURN
2345 REM SUBROUTINE QUE FAZ A SEGMENTAÇÃO DA CURVA
2350 FOR I=1 TO N
2355 LET L=I+L1
2360 IF V1(I)>C GOTO 2370
2365 NEXT I
2366 PRINT "VOLUME DE EQUIVALENCIA MAIOR QUE VOL. DE TITULAÇÃO"
2370 RETURN

```