

AMINOÁCIDOS:ESTUDO DA ESTRUTURA E PROPRIEDADES ÁCIDO-BASE

ERIK MUHAI BARBOSA MATSUNAGA 11202421756

EDUARDO DO AMARAL SILVA E BIELLA 11202421958

LEONARDO DIAS CRUZ TERRAZAS 11202421555

Introdução:

A ionização reversível da água em íons H^+ e OH^- é fundamental para os sistemas biológicos, pois a concentração de H^+ define o pH. Pequenas alterações no pH podem afetar as estruturas e interações das biomoléculas, como enzimas e substratos, que possuem grupos ionizáveis.

Para resistir a mudanças bruscas de pH, existem os sistemas tampão, geralmente compostos por um ácido fraco e sua base conjugada. Esses sistemas neutralizam a adição de pequenas quantidades de ácidos ou bases, mantendo o pH relativamente estável. A relação entre o pH, o pK_a (constante de ionização) do ácido fraco e as concentrações das espécies ácida e básica é descrita pela equação de Henderson-Hasselbach. Quando as concentrações do ácido fraco e da base conjugada são iguais, o pH é igual ao pK_a .

Os aminoácidos, componentes das proteínas, são moléculas que contêm grupos funcionais amina e ácido carboxílico ligados ao carbono. Eles são classificados com base na polaridade de sua cadeia lateral (Grupo R). Por possuírem grupos que podem doar ou aceitar prótons, os aminoácidos são anfotéricos (agem como ácidos ou bases).

O estudo dessas propriedades é feito por titulação, onde se mede a variação do pH de uma solução de aminoácido à medida que um ácido forte ou base forte é adicionado. O gráfico resultante (curva de titulação) permite identificar os valores de pK_a de cada grupo ionizável, que correspondem aos pontos médios das regiões de tamponamento (onde o pH muda menos).

A curva também revela o ponto isoelétrico (pI), que é o pH exato onde a carga líquida total do aminoácido é zero. Para aminoácidos com apenas dois grupos ionizáveis (carboxila e amina), o pI é a média dos dois pK_a s. Para aminoácidos com cadeia lateral ionizável (como o ácido glutâmico ou a histidina), o pI é a média dos dois valores de pK_a que definem a faixa de pH onde a molécula tem carga zero. Conhecer o pI é crucial para técnicas de separação e purificação de proteínas, como a cromatografia de troca iônica, pois a carga total de uma proteína depende do pH do meio em relação ao seu pI.

Métodos:

Os objetivos desta prática são estudar as propriedades de tamponamento dos aminoácidos, determinar graficamente os valores de pKa de seus grupos químicos através da titulação e encontrar o ponto isoelétrico (pI) do aminoácido glutâmico.

Procedimentos:

Titulação do Ácido Glutâmico: O experimento foi dividido em duas partes em que a parte básica foi realizada pelo grupo e uma da parte ácida feita por outro grupo.

Titulação Básica (com NaOH): Nós titulamos 50 mL de uma solução 0,01 mol/L de ácido glutâmico. Adiciona-se NaOH 0,125 mol/L em incrementos de 0,5 mL, agitando e anotando o pH após cada adição, até o pH atingir aproximadamente 12,0.

Titulação Ácida (com HCl): O outro grupo fez o mesmo procedimento, mas titulando 50 mL da solução de aminoácido com HCl 0,125 mol/L em incrementos de 0,5 mL, até o pH atingir aproximadamente 1,5.

Análise dos Dados

Os dados das titulações ácida e básica serão combinados em uma única tabela (Volume de titulante vs. pH) Sendo o volume titulado do ácido negativo e volume titulado da solução básica positiva.

Resultados

Segue a tabela e que o pH com nenhum volume adicionado de ambas que é 3,43, sendo que foi realizado uma média já que os valores eram próximos sendo o pH da da solução sem a base sendo 3,48 e da solução sem adicionar o ácido 3,38.

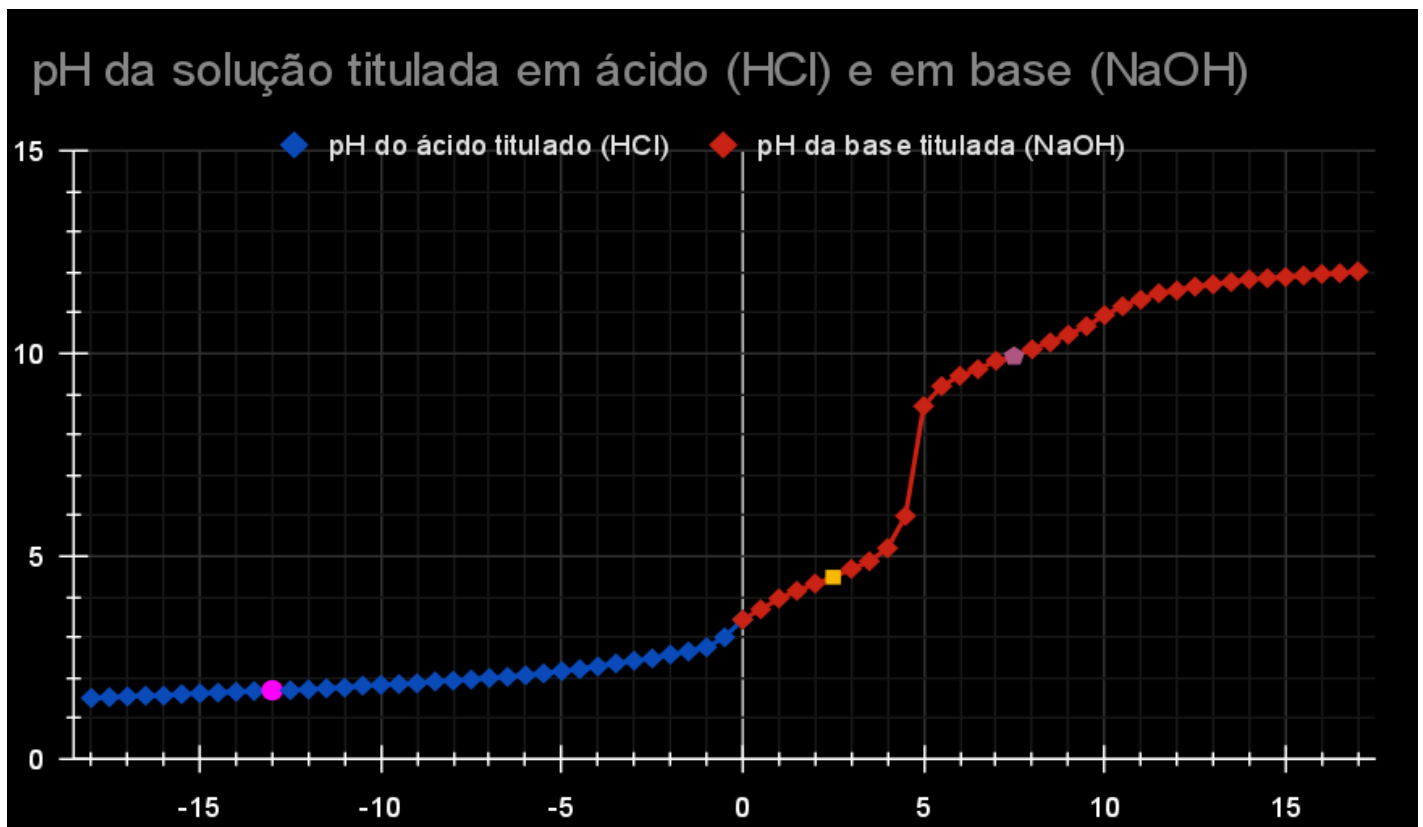
Volume titulado de ácido /base (ml)	pH do ácido titulado (HCl)	pH da base titulada (NaOH)
-18	1,5	
-17,5	1,52	
-17	1,54	
-16,5	1,56	
-16	1,56	

-15,5	1,59	
-15	1,61	
-14,5	1,63	
-14	1,65	
-13,5	1,67	
-13	1,69	
-12,5	1,69	
-12	1,71	
-11,5	1,74	
-11	1,76	
-10,5	1,8	
-10	1,82	
-9,5	1,84	
-9	1,86	
-8,5	1,91	
-8	1,93	
-7,5	1,95	
-7	1,99	
-6,5	2,02	
-6	2,06	
-5,5	2,11	
-5	2,16	
-4,5	2,21	
-4	2,28	
-3,5	2,35	
-3	2,42	
-2,5	2,48	
-2	2,57	

-1,5	2,65	
-1	2,75	
-0,5	3	
0	3,43	3,43
0,5		3,69
1		3,95
1,5		4,14
2		4,32
2,5		4,48
3		4,68
3,5		4,87
4		5,2
4,5		5,99
5		8,7
5,5		9,2
6		9,45
6,5		9,61
7		9,82
7,5		9,93
8		10,11
8,5		10,28
9		10,47
9,5		10,67
10		10,95
10,5		11,17
11		11,33
11,5		11,49
12		11,56

12,5		11,65
13		11,71
13,5		11,76
14		11,83
14,5		11,86
15		11,89
15,5		11,93
16		11,96
16,5		11,98
17		12,03

Segue o Gráfico



pKa1=1,69 em Rosa com 13,5ml de solução ácido titulado

pKaR=4,48 em Amarelo 2,5ml de solução básica titulada

pKa3=9,93 em vinho /marrom com 7,5 ml de solução básica titulada

Discussão dos resultados

Nesta prática, as propriedades ácido-base do aminoácido ácido glutâmico foram investigadas por meio de titulação ácido-base. O objetivo foi construir uma curva de titulação completa para determinar experimentalmente os valores de pKa de seus grupos ionizáveis e seu ponto isoelétrico (pI).

A determinação dos pKas foi baseada na equação de Henderson-Hasselbalch, $\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$. Conforme o princípio analisado, quando o sistema está em equilíbrio ($[\text{A}^-] = [\text{HA}]$), o termo logarítmico se torna zero ($\log(1) = 0$), resultando em $\text{pH} = \text{pKa}$. Graficamente, esses pontos correspondem aos centros das regiões de tamponamento. Nestas regiões, mesmo com a adição do titulante, o pH se mantém estável, apresentando baixa variação. Analisando a inclinação da curva entre os pontos, foi possível identificar os volumes onde a variação era mínima, correspondendo aos pKas.

O ácido glutâmico possui três grupos ionizáveis: o grupo alfa-carboxila, o grupo alfa-amina e o grupo carboxila da cadeia lateral. A partir da curva de titulação, foram identificados os três pKas experimentais, que, em ordem crescente, foram: 1,69 (pKa1), 4,48 (pKaR) e 9,93 (pKa2).

Estes valores estão relativamente próximos aos valores teóricos encontrados na literatura (tipicamente pKa1 aprox. 2,19; pKaR aprox. 4,25; pKa2 aprox. 9,67). As discrepâncias observadas podem ser atribuídas a variações experimentais, como a temperatura da solução (que afeta as constantes de equilíbrio), a precisão na adição do titulante ou a calibração do pHmetro.

O ponto isoelétrico (pI) é o pH onde a carga líquida do aminoácido é igual a zero. Para um aminoácido ácido como o glutâmico, a forma zwitteriônica (carga 0) existe na faixa de pH entre a desprotonação dos dois grupos carboxílicos (pKa1 e pKaR). Portanto, o pI é calculado como a média desses dois valores:

$$\text{pI} = (\text{pKa1} + \text{pKaR}) / 2 = (1,69 + 4,48) / 2 = 3,085$$

As faixas de tamponamento, onde o aminoácido resiste eficazmente a mudanças de pH, correspondem a aproximadamente mais ou menos 1 unidade de pH em torno de cada pKa. Com base nos nossos dados, as faixas de tamponamento do ácido glutâmico são:

- Faixa 1: pH 0,69 a 2,69 (em torno do pKa1 = 1,69)
- Faixa 2: pH 3,48 a 5,48 (em torno do pKaR = 4,48)
- Faixa 3: pH 8,93 a 10,93 (em torno do pKa2 = 9,93)

Ao comparar o ácido glutâmico com a histidina (apresentada na introdução da prática), observamos que ambos possuem três grupos ionizáveis. No entanto,

suas propriedades são distintas. A histidina possui um grupo carboxila, um grupo alfa-amina e um grupo amina (imidazol) na cadeia lateral, resultando em um pI próximo da neutralidade (pI aprox. 7,58). O ácido glutâmico, por ter uma cadeia lateral carboxílica (ácida), possui dois grupos ácidos e um básico, o que desloca seu pI para um valor muito mais ácido (experimental: 3,085).

Respondendo à questão 5 da análise de dados, para purificar o ácido glutâmico usando cromatografia de troca iônica de modo que ele fique com carga negativa, é necessário utilizar um tampão com pH acima do seu ponto isoelétrico ($pI > 3,085$). Por exemplo, se utilizarmos um tampão com pH 7,0 (que está dentro da faixa de tamponamento da histidina ou do sistema fosfato), este pH estará acima dos dois pK_a s ácidos (1,69 e 4,48) mas abaixo do pK_a básico (9,93). Nessa condição, o ácido glutâmico (glutamato) terá uma carga líquida de -1 e poderá se ligar a uma coluna de troca aniônica (positiva) para purificação.

Conclusão

A técnica de titulação ácido-base permitiu determinar com sucesso os parâmetros físico-químicos do ácido glutâmico. Os valores experimentais obtidos para os pK_a s (1,69, 4,48 e 9,93) e o cálculo do ponto isoelétrico ($pI = 3,085$) foram consistentes com a natureza de um aminoácido ácido, apesar de pequenas variações em relação aos valores teóricos da literatura, que são esperadas em um procedimento experimental.

Este experimento demonstrou de forma prática como as propriedades estruturais de um aminoácido definem seu comportamento em solução. A compreensão do pI é fundamental, pois dita a carga elétrica líquida de um aminoácido ou proteína em um determinado pH . Esse conhecimento é essencial para o planejamento de protocolos bioquímicos, como a escolha de um sistema tampão adequado para a purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica, conforme discutido.

Referências

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 1596 p.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J.L; STRYER, L. **Bioquímica**, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. **Color Atlas of Biochemistry** 2012, 3rd Edition

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.