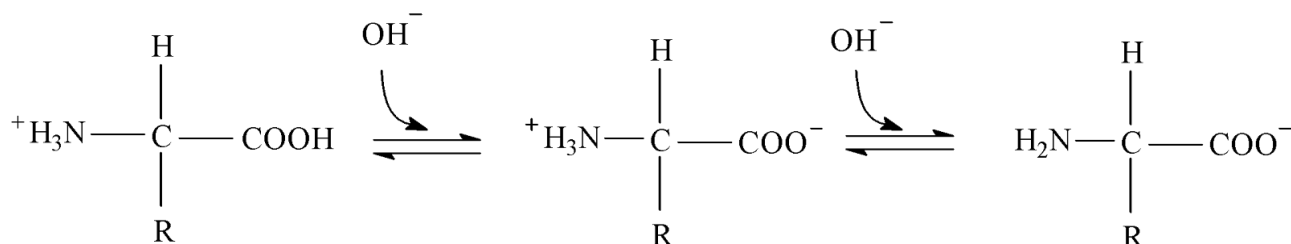


EXPERIÊNCIA 1: TITULAÇÃO E CROMATOGRAFIA DE AMINOÁCIDOS

FUNDAMENTO

As unidades constituintes das proteínas são os L α -aminoácidos. Como o próprio nome indica, estes compostos apresentam pelo menos um grupo amina ($-NH_2$) e um grupo carboxílico ($-COOH$). Em consequência deste fato, ao serem dissolvidos em água, os aminoácidos apresentam caráter anfotérico, ou seja, comportam-se como ácido e como base. Os grupos amina e carboxila podem sofrer protonações e desprotonações reversíveis, comportando-se como eletrólitos fracos. Se os considerarmos em suas formas de ácidos conjugados: $-NH_3^+$ e $-COOH$, veremos que cada um deles apresentará um valor de pKa. Assim, um aminoácido apresenta pelo menos dois valores de pKa e dependendo da natureza ionizável ou não do grupo R ligado ao carbono α , pode ocorrer ou não um terceiro valor de pKa. Em pH 7,0 e no estado sólido, o amino grupo apresenta-se protonado (forma ácida)



e o grupo carboxila desprotonado (forma básica).

Neste experimento utilizaremos um processo de separação de aminoácidos baseado na polaridade dos grupos R de cadeia lateral, que determina a preferência do aminoácido por uma fase líquida polar ou apolar, isto é, sua partição entre duas fases. A água que hidrata a celulose, principal constituinte do papel, constitui a fase polar, neste caso a fase estacionária, enquanto que o solvente orgânico que migra por capilaridade pelo papel constitui a fase apolar, neste caso a fase móvel. Assim, quanto mais apolar for o grupo R, maior a mobilidade do aminoácido com a fase móvel. Consequentemente a relação (R_F) entre a distância percorrida pelo aminoácido no papel e a distância percorrida pela fase móvel será também maior. A Tabela I apresenta valores de R_F de alguns aminoácidos nas condições descritas.

Através da cromatografia em papel identificaremos um aminoácido desconhecido em comparação com quatro outros conhecidos (denominados de

aminoácidos-padrão). Com ajuda da Tabela II e dos valores de pKa obtidos na titulação, confirmaremos a identidade do aminoácido.

OBJETIVOS

1. Identificação de um aminoácido através das técnicas de cromatografia em papel e de titulação, através de seu R_F e de seus pKas.
2. Comparação da curva de titulação de um aminoácido com a de um ácido fraco monoprotico.
3. Verificação do pH de diversos fluídos biológicos (de origem vegetal e animal) e não biológicos, conforme mostrado *na figura 2-15 do Rawn, Biochemistry, pg 39 e na figura 4-9 do Lehninger, Principles of Biochemistry, pg77.*

TABELA 1

R_F de vários aminoácidos determinados nas seguintes condições:
Solvente de Partridge, n-butanol/ácido acético/água (4:1:1);
Papel Whatman nº 1 e temperatura 20°C

Aminoácido	R_F	Aminoácido	R_F
Cys	0.8	Ala	0.38
Lys	0.14	Pro	0.43
His	0.20	Tyr	0.45
Arg	0.20	Trp	0.50
Asp	0.24	Met	0.55
Gly	0.26	Val	0.60
Ser	0.27	Phe	0.68
Glu	0.30	Ile	0.72
Thr	0.35	Leu	0.73

TABELA II

Aminoácidos	pKa
Glu	2.19
	4.25
	9.67
Lys	2.18
	8.95
	10.53
Gly	2.34
	9.60
His	1.82
	6.0
	9.17
Cys	1.71
	8.33
	10.78
Thr	2.62
	10.43
Asn	2.20
	8.80
Ala	2.30
	9.70
Leu	2.36
	9.60
Pro	1.99
	10.60

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. CROMATOGRAFIA EM PAPEL

1. Tomar uma folha (23 x 16 cm) de papel Whatman nº1 e fazer um traço a lápis ao longo do comprimento maior a 2 cm da borda. Evitar tocar no papel durante toda a operação. Deixar uma margem de 1,5 cm de cada lado. Marcar seis pontos sobre essa linha que distem 4 cm um do outro e numerá-los a lápis de 1 a 6. As amostras devem ser aplicadas nos pontos numerados com auxílio de um capilar de tal modo que a mancha formada sobre o papel seja a menor possível.
2. Nos números de 1 a 4 aplicar os padrões e no número 6, a mistura de padrões. A amostra desconhecida é aplicada no número 5.
3. Enrolar o papel de modo a transformá-lo em um cilindro e prender as extremidades superiores com clip.
4. Colocar 25ml de solvente de Partridge, n-butanol/ácido acético/água (4:1:1), em uma placa de Petri e mergulhar o cilindro de papel em seu interior de modo que este fique perfeitamente na vertical. Evitar que o papel toque na parede da placa.
5. Cobrir o sistema com um béquer de 2 litros e deixar o solvente migrar 10 cm.
6. Retirar o papel e marcar imediatamente a linha de frente do solvente.
7. Secar o papel na estufa (80°C-100°C).
8. Mergulhar em solução 0,1% de ninhidrina em acetona e levar à estufa (80°C-100°C) por alguns minutos.
9. Delimitar com lápis as manchas que aparecem no papel.
10. Determinar o R_F dos padrões e do aminoácido desconhecido.

2. TITULAÇÃO

1. Colocar 50 ml da solução do aminoácido (0,1M) em pH 1,0 em um béquer e titular com solução 0,5M de KOH medindo o pH após cada adição de 1 ml até atingir o pH 11,0.
2. Colocar 50ml de ácido acético 0,15M ou HCL 0,1M em outro béquer e titular com solução 0,5M de KOH medindo o pH após cada adição de 0,5ml até pH 12,0.
3. Selecionar alguns fluídos biológicos, com os quais não haja problemas de manipulação e medir seu pH. Eventualmente com auxílio de uma pipeta Pasteur adicionar uma vez, HCl gota a gota e outra vez, KOH. Observar a resistência ou não à variação do pH.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

1. Comparar seus valores de Rf para os aminoácidos padrão com os valores da TABELA I. Discutir as possíveis causas da discrepância.
2. Fazer um gráfico de titulação do aminoácido com base. Estimar os valores de pKa e comparar estes valores obtidos para o aminoácido desconhecido com aqueles da TABELA II.
3. Fazer o gráfico de titulação do ácido acético. Comparar as curvas de titulação do aminoácido e do ácido fraco.
4. Identificar seu aminoácido desconhecido, escrever sua estrutura e suas sucessivas ionizações verificadas ao se aumentar o pH.

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA TITULAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

- 50ml de aminoácidos 0,1M
- 50ml de KOH (0,5M);
- 50ml de Ácido Acético(0,15M);
- 50ml de HCl.

MATERIAIS UTILIZADOS PARA TITULAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

- 2 béquers de 100ml;
- 1 barra magnética;
- 1 haste;
- 1 pH-metro;
- 1 funil;
- 1 agitador magnético;
- 1 frasco para descarte;
- 1 pissete;
- 1 frasco com solução padrão pH 4,0 e pH 7,0.

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA CROMATOGRAFIA EM PAPEL DE AMINOÁCIDOS

- Aminoácidos (Leucina, Histidina, Prolina e Alanina);
- Solvente de Partridge – n-Butanol, ácido acético, água (4:1:1);
- Solução 0,1% de ninhidrina em acetona.

MATERIAIS UTILIZADOS PARA CROMATOGRAFIA EM PAPEL DE AMINOÁCIDOS

- 1 béquer;
- 1 placa de petry;
- 1 proveta de 25ml;
- pinça, capilares, papel de filtro com clip;
- luvas
- padrões de aminoácidos + mistura + um desconhecido;
- solvente de Partridge, solução de ninhidrina e estufa a 80°C.