

GUIA PARA AULAS PRÁTICAS DE BIOTECNOLOGIA DE ENZIMAS E FERMENTAÇÃO

JOSÉ ALVES ROCHA FILHO
MICHELE VITOLO

Blucher

José Alves Rocha Filho
Michele Vitolo

GUIA PARA AULAS PRÁTICAS DE
BIOTECNOLOGIA DE ENZIMAS
E FERMENTAÇÃO

Guia para aulas práticas de biotecnologia de enzimas e fermentação

© 2017 José Alves Rocha Filho e Michele Vitolo

Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar

04531-934 – São Paulo – SP – Brasil

Tel.: 55 11 3078-5366

contato@blucher.com.br

www.blucher.com.br

Segundo Novo Acordo Ortográfico, conforme
5. ed. do *Vocabulário Ortográfico da Língua
Portuguesa*, Academia Brasileira de Letras,
março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por
quaisquer meios, sem autorização escrita da
editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha Filho, José Alves da

Guia para aulas práticas de biotecnologia de
enzimas e fermentação / José Alves Rocha Filho,
Michele Vitolo. – São Paulo : Blucher, 2017.

170 p. : il.

Bibliografia

ISBN 978-85-212-1168-6

1. Biotecnologia 2. Microbiologia 3. Enzimas
4. Enzimas – Fermentação I. Título II. Vitolo,
Michele

17-0067

CDD 660.634

Índice para catálogo sistemático:
1. Enzimas – Biotecnologia

CONTEÚDO

1. SOLUÇÕES-TAMPÃO	11
1.1 Objetivo	11
1.2 Teoria.....	11
1.3 Reagentes e equipamentos	20
1.3.1 Reagentes.....	20
1.3.2 Equipamentos	20
1.4 Métodos analíticos	20
1.5 Práticas	21
1.5.1 Preparação e avaliação da capacidade de tamponamento do tampão acetato.....	21
1.5.2 Curva de titulação da glicina	22
1.5.3 Curva de titulação da glicina na presença de formaldeído	23
1.6 Questões de revisão e fixação	25
1.7 Bibliografia	25
2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	27
2.1 Objetivo.....	27
2.2 Teoria.....	27
2.3 Reagentes e equipamentos	31
2.3.1 Reagentes.....	31
2.3.2 Equipamentos	31

2.4 Métodos analíticos	32
2.4.1 Dosagem de proteína solúvel.....	32
2.4.2 Dosagem de proteína insolúvel (método de Kjehldal)	33
2.4.3 Medida da atividade enzimática	33
2.5 Práticas	37
2.5.1 Estabelecimento da curva-padrão para dosagem de proteína solúvel (método do biureto)	37
2.5.2 Estabelecimento da curva-padrão para a dosagem de proteína solúvel (método de Bradford)	38
2.5.3 Estabelecimento da curva-padrão para dosagem de proteína solúvel (método de Lowry)	40
2.5.4 Estabelecimento da curva-padrão de tirosina para a dosagem da atividade bromelínica.....	41
2.5.5 Estabelecimento da curva-padrão para medida do halo de inibição relacionado à atividade bromelínica em meio sólido (placa de petri)...	42
2.5.6 Obtenção da bromelina (a partir da polpa e/ou casca do abacaxi).....	44
2.5.7 Estabelecimento da curva-padrão de amônia para dosagem da atividade ureásica	45
2.5.8 Obtenção da urease	46
2.5.9 Estabelecimento da curva-padrão de glicose para dosagem da atividade invertásica	49
2.5.10 Obtenção da invertase	51
2.6 Questões de revisão e fixação	52
2.7. Bibliografia	53
3. FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	55
3.1 Objetivo	55
3.2 Teoria.....	55
3.2.1 Fatores de ação localizada.....	56
3.2.2 Fatores de ação deslocalizada	58
3.2.3 Efeito da concentração inicial de substrato.....	60
3.3 Reagentes e equipamentos	62
3.3.1 Reagentes.....	62
3.3.2 Equipamentos	62
3.4 Métodos analíticos	62
3.4.1 Dosagem da atividade da bromelina.....	62
3.4.2 Dosagem da atividade da urease	63
3.4.3 Dosagem da atividade da invertase	63
3.5 Práticas	64
3.5.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática	64
3.5.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática	75
3.5.3 Efeito da força iônica do tampão na atividade enzimática	82
3.5.4 Efeito da concentração inicial de substrato na atividade enzimática ..	84

3.5.5 Efeito conjugado pH-temperatura na atividade enzimática	88
3.5.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática	92
3.6 Questões de revisão e fixação	95
3.7 Bibliografia	96
4. IMOBILIZAÇÃO: TIPOS E TÉCNICAS	97
4.1 Objetivo	97
4.2 Teoria	97
4.2.1 Introdução	97
4.2.2 Encapsulamento	100
4.2.3 Ligação em resinas de troca iônica	102
4.2.4 Quitosana	103
4.2.5 Coeficiente de imobilização (CI)	104
4.3 Reagentes e equipamentos	104
4.3.1 Reagentes	104
4.3.2 Equipamentos	105
4.4 Métodos analíticos	105
4.5 Práticas	105
4.5.1 Imobilização em hidrogel	105
4.5.2 Imobilização em resinas de troca iônica	111
4.6 Questões de revisão e fixação	117
4.7 Bibliografia	117
5. FERMENTAÇÃO	119
5.1 Objetivo	119
5.2 Teoria	119
5.3 Reagentes e equipamentos	121
5.3.1 Reagentes	121
5.3.2 Equipamentos	121
5.4 Métodos analíticos	121
5.4.1 Determinação da massa celular seca	121
5.4.2 Determinação da concentração de células por meio da contagem em câmara de Neubauer	122
5.4.3 Dosagem do etanol	124
5.4.4 Dosagem do açúcar redutor total (ART)	125
5.4.5 Dosagem dos açúcares redutores (AR)	125
5.5 Práticas	125
5.5.1 Preparação e propagação das células para o inóculo	125
5.5.2 Imobilização das células por aprisionamento	126
5.5.3 Determinação da curva de crescimento celular em frascos agitados (efeito do pH, da temperatura e da composição do meio de cultura) ..	127
5.5.4 Determinação da curva de consumo de substrato por células de levedura em frascos agitados	128

5.5.5 Determinação da capacidade fermentativa de leveduras em frascos agitados em termos de etanol formado (efeito do pH, da temperatura e da composição do meio de cultura).....	128
5.5.6 Fermentação de caldo de cana com a levedura imobilizada em alginato de cálcio	130
5.5.7 Destilação do etanol formado na fermentação do caldo de cana clarificado usando células de levedura imobilizadas em alginato de cálcio	132
5.6 Questões de revisão e fixação	133
5.7 Bibliografia	134
6. BIORREATORES	135
6.1 Objetivo	135
6.2 Teoria.....	135
6.3 Reagentes e equipamentos	137
6.3.1 Reagentes.....	137
6.3.2 Equipamentos	137
6.4 Método analítico	137
6.5 Práticas.....	138
6.5.1 Operacionalização de biorreatores descontínuo, contínuo e descontínuo alimentado	138
6.5.2 Hidrólise da sacarose pela invertase solúvel em biorreator descontínuo	144
6.5.3 Hidrólise da sacarose pela invertase solúvel em biorreator descontínuo alimentado	145
6.5.4 Hidrólise da sacarose pela invertase imobilizada em biorreator descontínuo	147
6.5.5 Hidrólise da sacarose pela invertase imobilizada em biorreator descontínuo alimentado	148
6.5.6 Hidrólise da sacarose pela invertase ligada à parede celular da levedura de panificação	150
6.5.7 Emprego da levedura de panificação aprisionada em hidrogel na hidrólise da sacarose executada em biorreator contínuo com agitação constante	152
6.6 Questões de revisão e fixação	153
6.7 Bibliografia	154
RESOLUÇÃO DAS QUESTÕES DE REVISÃO E FIXAÇÃO E DOS PROBLEMAS PROPOSTOS EM “QUESTÕES PARA RESPONDER”.....	155

CAPÍTULO 1

SOLUÇÕES-TAMPÃO

1.1 OBJETIVO

Preparar e verificar a capacidade de tamponamento de soluções-tampão. Construir a curva de titulação de um eletrólito fraco.

1.2 TEORIA

O mundo que nos cerca é constituído de átomos e de moléculas. O átomo é a menor parte da matéria que também caracteriza determinado **elemento químico**, formado por átomos idênticos, ou seja, todos contendo o mesmo número de prótons, já a **molécula** é um agrupamento de átomos que caracteriza uma **substância**. Diz-se que uma substância é **pura** quando possui um só tipo de molécula, caso contrário trata-se de uma **mistura**. A substância pura recebe o adjetivo **simples**, quando é formada por um único elemento químico (O_3 , O_2 , Cl_2 , P_4 , dentre outros), e o adjetivo **composta**, quando possui em sua constituição dois ou mais elementos químicos (CO_2 , NH_3 , CH_4 , por exemplo).

Em termos simples, pode-se considerar que tudo aquilo que ocupa lugar no espaço e possui massa – por ser o resultado da combinação de átomos – constitui a **matéria** e que cada espécie particular de matéria, a qual se distingue das demais pelas suas propriedades, é chamada de **material**. Este, por sua vez, se tiver composição química invariável (um só tipo de molécula) forma uma **substância** (etanol, acetona, clorofórmio, ozônio, oxigênio, por exemplo); entretanto, se possui composição química variável (duas ou mais moléculas diferentes) constitui uma **mistura** (gasolina, leite, petróleo etc.). Quando duas ou mais substâncias são misturadas, o resultado pode ser uma mistura heterogênea, como a **suspensão**, ou homogênea, como a **solução**.

O aspecto relevante relacionado à solução refere-se ao fato de ela ser sempre formada por pelo menos duas substâncias, das quais a que aparece em maior quantidade é chamada de **solvente** e a(s) outra(s), **soluto(s)**. Sucede que a quantidade e/ou natureza química do(s) soluto(s), ao interagir com o solvente, conferem à solução características únicas, por exemplo: o comportamento típico de uma substância frente aos pontos de ebulição (mistura azeotrópica) e de congelamento (mistura eutética) e, no caso de soluções aquosas de eletrólitos fracos (ácido acético, glicina, hidróxido de amônio, entre outros), a capacidade de evitar, dentro de certos limites, a mudança do pH, mesmo mediante adição de pequenas quantidades de ácido ou base forte. Nesse caso, a solução recebe o nome particular de **solução-tampão**. E a compreensão sobre a natureza da solução-tampão baseia-se nos conceitos de pH e par conjugado (ácido/base).

Tomando a dissociação que ocorre na água no estado líquido, tem-se:



Logo, escreve-se a constante de equilíbrio (K_{eq}) para a água:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot (\text{HO}^-)]}{(\text{H}_2\text{O})^2} \quad (1.1)$$

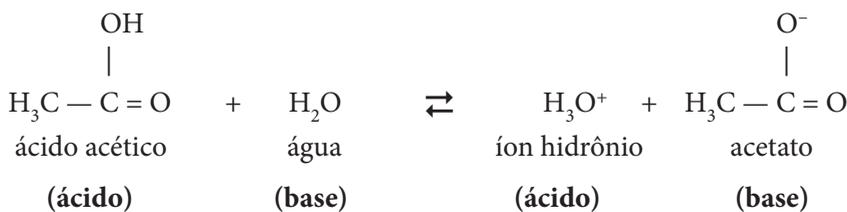
Rearranjando a Equação (1.1), obtém-se:

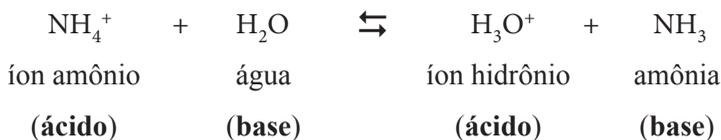
$$K_{\text{eq}} \cdot (\text{H}_2\text{O})^2 = K_w = (\text{H}_3\text{O}^+) \cdot (\text{HO}^-) \quad (1.2)$$

em que K_w é o produto iônico da água. Esse produto iônico da água é uma constante, cujo valor a 25° C é $1,0 \cdot 10^{-14}$. O termo $(\text{H}_2\text{O})^2$ é constante pelo fato da água encontrar-se em grande quantidade na solução – é o solvente, no caso – e sua dissociação ser muito pequena. Em razão da dissociação da água com o consequente aparecimento do íon hidrônio (H_3O^+) livre, define-se a grandeza pH como segue:

$$\text{pH} = -\text{Log} (\text{H}_3\text{O}^+) \quad (1.3)$$

O conceito de par conjugado (ácido/base), introduzido por Bronsted-Lowry, resultou do reconhecimento de que o ácido é uma substância capaz de doar íons H^+ e a base, capaz de recebê-los. Exemplificando:

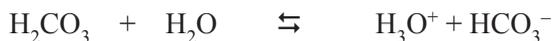




Cada um dos binômios (ácido acético/acetato), ($\text{H}_3\text{O}^+/\text{H}_2\text{O}$) e ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) recebe o nome de **par conjugado ácido/base**.

As soluções-tampão são biologicamente importantes, pois, ao evitar variações no pH do meio, contribuem para a manutenção da atividade catalítica de enzimas responsáveis por reações intracelulares em geral. Exemplos de tampões para essa finalidade são o tampão bicarbonato ($\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$), que mantém o pH do sangue, e o tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$), que é responsável por manter o pH dos fluidos intra e extracelulares.

Toma-se como modelo o tampão carbonato/bicarbonato:



Ao adicionar um ácido a essa solução, o equilíbrio se deslocará para a esquerda, uma vez que uma quantidade equivalente de bicarbonato passará a ácido carbônico. O contrário ocorreria se fosse adicionada uma base a essa solução. A capacidade que uma solução-tampão possui de manter o pH constante após a adição de ácido ou base é denominada **capacidade de tamponamento**, que pode ser expressa como o número de moles por litro de H^+ ou OH^- necessários para causar dada mudança no pH, como de uma unidade.

A partir da equação de equilíbrio químico envolvido em um sistema tampão, pode-se deduzir a equação de Henderson-Hasselbalch – Equação (1.4) –, muito usada nos cálculos envolvendo soluções-tampão:

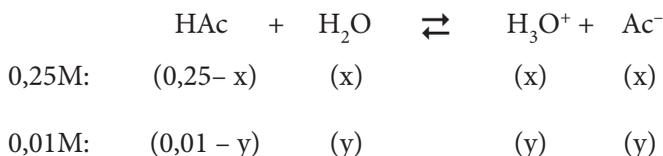
$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.4)$$

Nessa equação: pKa é o pH, no qual 50% do eletrólito fraco está dissociado; $[\text{A}^-]$ significa concentração da base conjugada; $[\text{HA}]$ representa concentração do ácido conjugado.

Retomando o conceito da capacidade de tamponamento de uma solução-tampão e considerando uma curva de titulação qualquer (eletrólito fraco com ácido ou base forte), é definida a capacidade de tamponamento instantânea (φ) como o recíproco da inclinação da curva de titulação em qualquer ponto, a qual pode ser expressa pela seguinte equação (deduzida a partir da equação de Henderson-Hasselbalch):

$$\phi = [2,3 \cdot (A^-) \cdot (HA)] \div [(A^-) + (HA)] \quad (1.5)$$

Embora à primeira vista não pareça, essa equação indica que ϕ aumenta à medida que a concentração do tampão aumenta. Para verificar isso, supõe-se o tampão ácido acético/acetato ($pK_a = 4,76$) nas concentrações 0,25M e 0,01M e $pH = 5,0$. O volume de cada solução-tampão foi fixado em 1L. O cálculo resume-se em considerar o equilíbrio:



Aplicando a equação de Henderson-Hasselbalch para ambas as concentrações de tampão, tem-se $x = 0,159$ e $y = 0,00635$. Logo, as respectivas capacidades de tamponamento são:

$$\phi_{0,25M} = \frac{(2,3 \cdot 0,159 \cdot 0,091)}{0,25} = 0,133$$

$$\phi_{0,01M} = \frac{(2,3 \cdot 0,00635 \cdot 0,00365)}{0,01} = 0,00533$$

ou seja, $\phi_{0,25M} \cong 25\phi_{0,01M}$.

Considerando, a partir do exemplo discutido, que a solução 25 vezes mais concentrada ($0,25/0,01 = 25$) tem poder tamponante superior, pode-se pensar sobre o que sucede com o pH do tampão, quando tem sua concentração variada. A experiência mostra que a diluição de um tampão afeta seu pH. As razões identificadas para a ocorrência desse fato são três: mudança nos coeficientes de atividade das espécies conjugadas ácido/base, alteração no grau de dissociação do eletrólito e aproximação da constante de equilíbrio do K_w na condição extremamente diluída – ou seja, tem-se, praticamente, somente água.

O coeficiente de atividade (γ) para qualquer espécie química não permanece invariável, quando ocorre mudança na concentração. Inclusive, seu valor não varia proporcionalmente à diluição feita. Por exemplo, seguindo o ditame de Segel (1979) e sabendo que na concentração de 0,1M tem-se $\gamma_{HCO_3^-} = 0,82$ e $\gamma_{CO_3^{2-}} = 0,445$ e na concentração 0,01M, $\gamma_{HCO_3^-} = 0,928$ e $\gamma_{CO_3^{2-}} = 0,742$, pode-se calcular o pH de um “tampão carbonato 0,2M” contendo quantidades equimoleculares de HCO_3^- e CO_3^{2-} , isto é, 0,1M de cada espécie iônica, como segue:

$$pH = 10,2 + \text{Log} [\gamma_{CO_3^{2-}} \cdot (CO_3^{2-}) \div \gamma_{HCO_3^-} \cdot (HCO_3^-)]$$

Para “tampão carbonato 0,2M”:

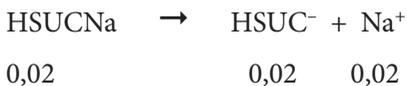
$$\text{pH} = 10,2 + \text{Log} [(0,445.0,1) \div (0,82.0,1)] = 9,94$$

Para “tampão carbonato 0,02M”:

$$\text{pH} = 10,2 + \text{Log} [(0,742.0,01) \div (0,928.0,01)] = 10,1$$

Como se pode observar, uma diluição de dez vezes levou a uma variação do valor do pH da ordem de 1,6%. Na maioria das vezes, uma variação dessa ordem pode ser negligenciada em termos práticos. Além disso, é possível levar o pH da solução 0,02M a 9,94 adicionando uma ou duas gotas de HCl 1M.

A variação do pH da solução frente à mudança do grau de dissociação do eletrólito fraco à medida que a solução é diluída pode ser constatada a partir do próximo exemplo. Assim, 1L do tampão succinato 0,04M é preparado com a dissolução de 0,02 mol de ácido succínico (H_2SUC) – ácido diprótico em que $\text{pK}_{a1} = 4,19$ e $\text{pK}_{a2} = 5,57$ – e 0,02 mol de succinato de sódio (HSUCNa). As reações de dissociação em água do ácido e do sal sódico podem ser representadas da seguinte maneira:



Logo, $[\text{HSUC}^-]_{\text{total}} = (0,02 + y)$. Sabendo que:

$$K_{a1} = \{[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{HSUC}^-]\} \div [\text{H}_2\text{SUC}] = 6,46 \cdot 10^{-5}.$$

$$\text{Substituindo: } 6,46 \cdot 10^{-5} = y \cdot \frac{(0,02 + y)}{(0,02 - y)}.$$

$$\text{Rearranjando: } y^2 + 0,0201y - 1,292 \cdot 10^{-6} = 0.$$

Resolvendo a equação, tem-se como raiz positiva $y = 6,43 \cdot 10^{-5}$.

Finalmente:

$$[\text{H}_2\text{SUC}] = 0,01994 \text{ mol/L}; [\text{HSUC}^-] = 0,0201 \text{ mol/L}; [\text{H}_3\text{O}^+] = 6,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}.$$

Por conseguinte, substituindo as concentrações calculadas para íon hidrônio, base conjugada e ácido conjugado na equação de Henderson-Hasselbalch, tem-se $\text{pH} = 4,19$, ou seja, $\text{pH} \cong \text{pK}_{a1}$.

Ao diluir o tampão succinato 0,04M de cem vezes, tem-se:

$$[\text{H}_2\text{SUC}] = (2 \cdot 10^{-4} - y) \quad [\text{HSUC}^-] = (2 \cdot 10^{-4} + y) \quad [\text{H}_3\text{O}^+] = y$$

Procedendo como o exemplo anterior, chega-se a:

$$y^2 + 2,65 \cdot 10^{-4}y - 13 \cdot 10^{-9} = 0.$$

Resolvendo a equação quadrática, obtém-se: $y = 4,21 \cdot 10^{-5}$.

Logo, $[\text{H}_2\text{SUC}] = 1,58 \cdot 10^{-4}\text{M}$; $[\text{HSUC}^-] = 2,42 \cdot 10^{-4}\text{M}$; $[\text{H}_3\text{O}^+] = 4,21 \cdot 10^{-5}$; e $\text{pH} = 4,38$ (calculado por meio da equação de Henderson-Hasselbalch).

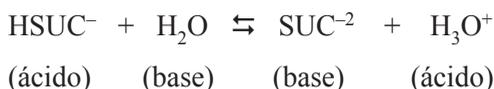
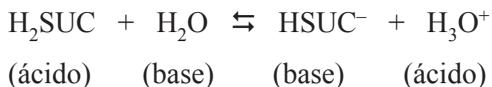
Se o tampão succinato 0,04M tivesse sido diluído de dez mil vezes, procedendo como já descrito, ter-se-ia: $y^2 + 6,66 \cdot 10^{-5}y - 1,292 \cdot 10^{-10} = 0$, que após resolução resulta em $y = 1,887 \cdot 10^{-6}$.

Logo, $[\text{H}_2\text{SUC}] = 0,113 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $[\text{HSUC}^-] = 3,887 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $[\text{H}_3\text{O}^+] = 1,887 \cdot 10^{-6}$; e $\text{pH} = 5,73$ (calculado por meio da equação de Henderson-Hasselbalch).

Como se pode depreender do exposto, o pH da solução-tampão tende para 7,0 à medida que a diluição aumenta. Isso significa que a contribuição em termos de íons H_3O^+ e OH^- por parte do tampão se assemelha ao da água pura.

Do exposto, parece razoável admitir que o uso de tampão concentrado seja a medida correta para manter o pH da solução invariável. Sucede, porém, que o material biológico (enzima, célula, tecido etc.), objeto de estudo, pode ser sensível à força iônica alta, implicando na escolha de uma condição intermediária. Por isso, um estudo das melhores condições de tamponamento (tipo de substância, concentração e pH) deve preceder qualquer manipulação de materiais biológicos.

O ácido succínico é um exemplo de substância diprótica cuja dissociação em água pura se dá conforme o esquema:



Assim, o ácido diprótico possui dois valores de pK_a (pH no qual as concentrações de ácido e base conjugados são iguais, conforme a equação de Henderson-Hasselbalch), que, no caso do ácido succínico, são $\text{pK}_{a1} = 4,19$ e $\text{pK}_{a2} = 5,57$. Logicamente, a escolha do par conjugado mais adequado vai depender da faixa de trabalho. Assim, caso se queira uma solução de pH entre 3,7 e 4,5, o tampão deve ser preparado usando ácido succínico e succinato monossódico. Porém, caso a faixa seja entre 5,0 e 6,0, é preciso

usar succinato mono e dissódico. No entanto, como as espécies H_2SUC , HSUC^- e SUC^{2-} coexistem em meio aquoso através de equações de equilíbrio, pode-se preparar o tampão usando quaisquer combinações de ácido succínico e seus sais, uma vez que o pH da solução-tampão desejada pode ser alcançado por meio da adição de solução, em geral 1M, de HCl ou NaOH. A mesma argumentação vale para um ácido triprótico.

Alguns exemplos de ácidos fracos com capacidade de tamponamento são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 1.1 Valores de K_a e $\text{p}K_a$ para alguns ácidos fracos

Ácido	HA	A-	K_a	$\text{p}K_a$
Ácido acético	CH_3COOH	CH_3COO^-	$1,76 \cdot 10^{-5}$	4,76
Ácido benzoico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$	$6,46 \cdot 10^{-5}$	4,19
Ácido carbônico (1)	H_2CO_3	HCO_3^-	$4,3 \cdot 10^{-7}$	6,37
Ácido carbônico (2)	HCO_3^-	CO_3^{2-}	$5,6 \cdot 10^{-11}$	10,20
Ácido cítrico (1)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	$8,14 \cdot 10^{-4}$	3,09
Ácido cítrico (2)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	$^- \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	$1,78 \cdot 10^{-5}$	4,75
Ácido cítrico (3)	$^- \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	$^- \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{COO}^- - \text{CH}_2-\text{COO}^-$	$3,90 \cdot 10^{-6}$	5,41
Ácido fosfórico (1)	H_3PO_4	H_2PO_4^-	$7,25 \cdot 10^{-3}$	2,14
Ácido fosfórico (2)	H_2PO_4^-	HPO_4^{2-}	$6,31 \cdot 10^{-8}$	7,20
Ácido fosfórico (3)	HPO_4^{2-}	PO_4^{3-}	$3,9 \cdot 10^{-13}$	12,40
Ácido láctico	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$	$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$	$1,38 \cdot 10^{-4}$	3,86
Ácido pirúvico	$\text{CH}_3\text{COCO OH}$	$\text{CH}_3\text{COCO O}^-$	$3,16 \cdot 10^{-3}$	2,50

Ao se considerar um ácido poliprótico em solução, tem-se pelo menos um íon intermediário que pode ionizar-se tanto como ácido quanto como base. Por exemplo, no caso do ácido succínico:



(forma salina; AA°); (b) no pI, 100% das moléculas estão na forma neutra (salina; AA°); e (c) em pK_{a2} , a solução comporta-se como sistema tampão e, nesse ponto, há 50% das moléculas carregadas negativamente (forma de base fraca; AA^{-}) e 50% das moléculas eletricamente neutras (forma salina; AA°).

Uma vez que os aminoácidos são os constituintes de todas as proteínas, essas macromoléculas acabam apresentando carga líquida positiva, negativa ou neutra, conforme o pH da solução em que se encontram. Nesse caso, porém, os grupamentos responsáveis por essa característica localizam-se nas cadeias laterais dos aminoácidos, já que os grupos amino e carboxílico do C1 estão envolvidos na formação das ligações pépticas da macromolécula.

Uma aplicação muito importante da titulação dos aminoácidos com base forte é na determinação do **grau de hidrólise (GH)** de uma proteína submetida à ação de protease. Por exemplo, na produção de gelatina a partir do colágeno, a intensidade da hidrólise é acompanhada tanto pela medida do GH como pela determinação da viscosidade do hidrolisado.

Para finalizar, é preciso lembrar o conceito de concentração de uma solução, que relaciona a quantidade de soluto com a de solvente. Há várias maneiras de expressar a concentração de soluções. São exemplos:

a) Percentagem em volume (C):

Consiste na relação entre o volume do soluto e o volume da solução. Pode ser representada pela equação:

$$C = [\text{volume do soluto} \div \text{volume da solução}] \cdot 100 \quad (1.6)$$

É útil quando há dissoluções de líquidos em líquidos, gases em gases e gases em líquidos. Por exemplo, quando se tem uma solução de etanol em água a 80%, significa que, em cem volumes de solução, 80 volumes são de etanol e 20 volumes, de água.

b) Título (τ):

$$\tau = [\text{massa do soluto} \div \text{massa da solução}] \quad (1.7)$$

Sendo massa da **solução** = massa do **soluto** + massa do **solvente**.

Por exemplo, se temos 20g de H_2SO_4 dissolvidos em 100g de água, obtemos:

$$\tau = \left[\frac{20}{(20+100)} \right] = 0,165$$

ou seja, o título da solução é 0,165. É preciso lembrar que o título não tem unidade e que seu valor pertence sempre ao intervalo $0 < \tau < 1$. Outra forma de lidar com o título é a chamada **percentagem em peso**, dada por: **(% em peso) = $\tau \cdot 100$** . Assim, na solução citada, cujo título é 0,165, a **(% em peso)** do ácido sulfúrico seria de 16,5%, isto é, em cada 100g de solução, 16,5g são de ácido.

c) Molaridade (M):

A molaridade sempre deve ser expressa como segue:

$$M = (\text{número de moles do soluto}) \div (\text{volume da solução em litro}) \quad (1.8)$$

Deve-se lembrar que:

$$(\text{número de moles do soluto}) = (\text{massa do soluto}) \div (\text{massa molar do soluto}) \quad (1.9)$$

1.3 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

1.3.1 REAGENTES

Ácido acético glacial, acetato de sódio (sólido), formaldeído, solução de HCl 0,1 mol/L, solução de HCl 1 mol/L, solução de NaOH 0,1 mol/L, solução de KOH 0,1 mol/L, soluções-tampão para calibrar o medidor de pH (pH 4,0 e 7,0), solução de cloridrato de glicina 0,01 mol/L (dissolver 0,115g de cloridrato de glicina ou 0,076 g de glicina em 100 mL de água destilada).

1.3.2 EQUIPAMENTOS

Balança analítica, agitador magnético e medidor de pH.

1.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

A medida do pH, quer referente à capacidade de tamponamento da solução, quer relativo ao acompanhamento da titulação, é feita usando um medidor de pH. Para tanto, mergulha-se o eletrodo de vidro do aparelho na solução-tampão para fazer a medida direta de seu pH. Antes de realizar a leitura, deve-se interromper a agitação da solução. Para calibrar o aparelho é preciso usar soluções-tampão padronizadas de pH 4,0 e pH 7,0. Essas soluções devem estar na mesma temperatura da solução de amostra.

1.5 PRÁTICAS

1.5.1 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TAMPONAMENTO DO TAMPÃO ACETATO

Preparar 100 mL de tampão acetato 1 mol/L, pH 4,5, a partir de solução de ácido acético e acetato de sódio 1 mol/L.

Seguir os passos:

1. Calcular o volume de ácido acético glacial necessário para preparar 100 mL de solução 1 mol/L. Massas atômicas: C = 12,0; H = 1,0; O = 16,0. A densidade e a percentagem em peso serão fornecidas pelo professor.
2. Calcular a massa de acetato de sódio necessária para preparar 100 mL de solução 1 mol/L. Massas atômicas: C = 12,0; H = 1,0; O = 16,0; Na = 23,0.
3. Preparar 100 mL de cada uma das soluções.
4. Calcular os volumes de soluções de ácido acético e acetato de sódio necessários para preparar 100 mL de tampão acetato 1 mol/L e pH 4,5. Dado: $K_a = 1,76 \cdot 10^{-5}$.
5. Preparar a solução-tampão mediante adição dos volumes de soluções calculados no item anterior.
6. Medir o pH do tampão preparado com o medidor de pH, **anotando** o valor encontrado.
7. Transferir uma alíquota de 20 mL do tampão preparado para um béquer de 100 mL.
8. Adicionar 1 mL de HCl 0,1 mol/L. Agitar e medir o pH. **Anotar** o pH antes e após a adição do ácido.
9. Transferir uma alíquota de 20 mL do tampão preparado para um béquer de 100 mL. Adicionar 1 mL de NaOH 0,1 mol/L. Agitar e medir o pH. **Anotar** o pH antes e após a adição da base.

1.5.1.1 Organizar e analisar os dados obtidos

- a) Realizar os cálculos necessários para determinar a massa de acetato de sódio necessária para o preparo da solução.
- b) Fazer os cálculos necessários para determinar o volume de ácido acético concentrado necessário para o preparo da solução.

- c) Efetuar os cálculos necessários para determinar os volumes de soluções de acetato de sódio e ácido acético necessários para o preparo da solução-tampão.
- d) Completar a Tabela 1.2 a seguir com os resultados obtidos no experimento.

Tabela 1.2 Dados para avaliação da capacidade de tamponamento do tampão acetato

Tampão acetato 1 mol/L (pH 4,5)						
pH teórico	pH experimental	% variação	pH após adição de HCl	% variação	pH após adição de NaOH	% variação
4,5						

1.5.1.2 Questões para responder

1. Discuta a importância das soluções-tampão para os sistemas biológicos.
2. Variações bruscas de pH podem afetar a atividade de enzimas? Justifique a resposta.
3. Que conclusão se pode tirar do experimento realizado?
4. Escreva a equação química envolvida no tampão acetato, discutindo seu mecanismo de ação mediante a adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

1.5.2 CURVA DE TITULAÇÃO DA GLICINA

Transferir 50 mL de solução de glicina 0,01 mol/L para um béquer de 250 mL. Com cuidado, deve-se inserir na solução o eletrodo de pH. Acidificar a solução pela adição de gotas de solução de ácido clorídrico 1 mol/L até pH = 2,0. Com o sistema em agitação, utilizando uma bureta, adicionar solução de hidróxido de potássio 0,1 mol/L em volumes de 2 mL. A cada adição, anotar o pH da solução. Parar a adição quando o pH da solução estiver próximo a 13. **Anotar** os valores de pH na Tabela 1.3 a seguir.

Tabela 1.3 Volumes de KOH para titular solução de glicina 0,01 mol/L

Volume de KOH adicionado (mL)	pH	Volume de KOH adicionado (mL)	pH
0		22	
2		24	
4		26	
6		28	
8		30	

(continua)

Tabela 1.3 Volumes de KOH para titular solução de glicina 0,01 mol/L (*continuação*)

Volume de KOH adicionado (mL)	pH	Volume de KOH adicionado (mL)	pH
10		32	
12		34	
14		36	
16		38	
18		40	
20		42	

1.5.2.1 Organizar e analisar os dados obtidos

Construir em papel milimetrado ou no programa Microsoft Excel a curva de pH (ordenada) em função do volume de solução de hidróxido de potássio adicionado (abscissa).

1.5.2.2 Questões para responder

1. Represente as estruturas da glicina e do cloridrato de glicina.
2. Como se comporta a glicina em meio básico, ácido e neutro? Quais as estruturas predominantes em cada caso?
3. Conceitue pK e pI de um aminoácido.
4. Utilizando a curva de titulação obtida a partir dos dados experimentais, determine o valor do pI da glicina.
5. A solução de glicina poderia ser usada como solução-tampão? E em pH fisiológico? Justifique a resposta.
6. Cite pelo menos duas informações importantes a respeito de um aminoácido, obtidas a partir de sua curva de titulação.

1.5.3 CURVA DE TITULAÇÃO DA GLICINA NA PRESENÇA DE FORMALDEÍDO

Transferir 50 mL de solução de glicina 0,01 mol/L para um béquer de 250 mL. A seguir, adicionar 10 mL de solução de **formaldeído** 0,06 mol/L. Com cuidado, inserir na solução o eletrodo de pH. Acidificar a solução pela adição de gotas de solução de ácido clorídrico 1 mol/L até pH = 2,0. Com o sistema em agitação, utilizar uma bureta para adicionar solução de hidróxido de potássio 0,1 mol/L em volumes de 2 mL. A cada adição, anotar o pH da solução. Parar a adição quando o pH da solução estiver próximo a 13. **Anotar** os valores de pH na Tabela 1.4 a seguir.

Tabela 1.4 Volumes de KOH para titular solução de glicina 0,01 mol/L em presença de formaldeído 0,06 mol/L

Volume de KOH adicionado (mL)	pH	Volume de KOH adicionado (mL)	pH
0		22	
2		24	
4		26	
6		28	
8		30	
10		32	
12		34	
14		36	
16		38	
18		40	
20		42	

1.5.3.1 Organizar e analisar os dados obtidos

Construir em papel milimetrado ou no programa Microsoft Excel a curva de pH (ordenada) em função do volume de solução de hidróxido de potássio adicionado (abscissa).

OBSERVAÇÃO

Recomenda-se que os alunos executem a titulação da glicina com e sem formaldeído, para sobrepor as curvas e avaliar o eventual efeito do formaldeído. ■

1.5.3.2 Questões para responder

1. Há diferença entre os perfis das curvas de titulação da glicina na presença ou não de formaldeído?
2. No caso dos perfis das curvas não coincidirem, qual dos dois pK do aminoácido foi mais afetado? Por quê?

1.6 QUESTÕES DE REVISÃO E FIXAÇÃO

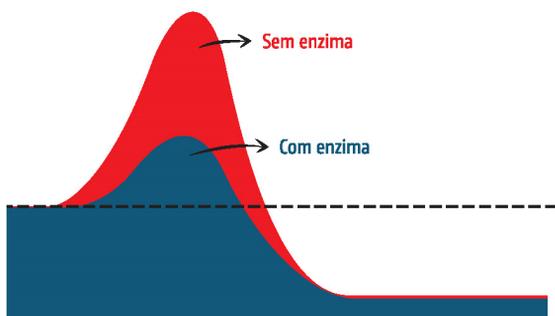
1. Calcule o pH de uma solução cuja concentração de íons hidrônio é $5,7 \cdot 10^{-9}M$.
2. Com base em que propriedade seria possível separar uma mistura de aminoácidos? Justifique a resposta.
3. Calcule o pH de uma solução de ácido acético 0,05M cujo grau de dissociação é de 2% nessa concentração.
4. Descreva a preparação de 25L de tampão fosfato de potássio 0,06M (pH = 7,35) usando os sais KH_2PO_4 e K_2HPO_4 . Dados: massas atômicas: P = 31,0; H = 1,0; O = 16,0; K= 39,1; $pK_{a2} = 7,2$.
5. O pH de uma solução de NH_4OH 0,025M é 10,83. Calcule a K_{eq} dessa base.
6. Descreva a preparação de 10L de um tampão acetato 0,3M, pH 4,86, partindo de uma solução de ácido acético 2M e de uma solução de KOH 2,2M. O pK_a do ácido acético é 4,77.
7. Assinale a alternativa correta e justifique tanto a alternativa correta como as incorretas:
 - () O conceito de par conjugado ácido/base é consequência da teoria de Arrhenius.
 - () $pH = pK_a + \log \frac{(HA)}{(A^-)}$
 - () Tampão é uma solução formada por um par conjugado ácido/base e que resiste às mudanças de pH.
 - () O pK_a e o pH são parâmetros que não se correlacionam.
 - () $pH = \log (H_3O^+)$
8. Por que se pode ajustar o pH de uma solução-tampão por meio da adição controlada de HCl 1M ou NaOH 1M?
9. Calcule o pH de um tampão carbonato 0,002M contendo quantidades equimoleculares de HCO_3^- e CO_3^{2-} . Dados: $pK_{a2} = 10,2$, $\gamma_{HCO_3^-} = 0,975$ e $\gamma_{CO_3^{2-}} = 0,903$.

1.7 BIBLIOGRAFIA

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

SEGEL, I. H. **Bioquímica**: teoria e problemas. Rio de Janeiro: LTC, 1979.



Clique aqui e:

[Veja na loja](#)

Guia para Aulas Práticas de Biotecnologia de Enzimas e Fermentação

José Alves Rocha Filho e Michele Vitolo

ISBN: 9788521211686

Páginas: 168

Formato: 16,8 x 23,9 cm

Ano de Publicação: 2017

Peso: 0.295 kg