

## EXPERIMENTO 3

# CURVAS DE TITULACION DE AMINOACIDOS. DETERMINACION DE VALORES DE pK

### REQUISITOS

Repasar los conceptos sobre las propiedades de los aminoácidos (AA), reacciones ácido base, pH, pK, soluciones amortiguadoras, representación gráfica y el manejo del pH-metro.

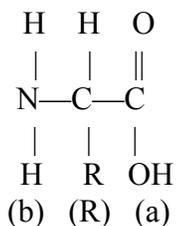
### OBJETIVOS

Titular con NaOH y con HCl diversos aminoácidos (glicina, ácido aspártico, arginina), a fin de determinar el número de funciones ionizables, y el valor pKa y pKb de cada función

## 1. FUNDAMENTOS

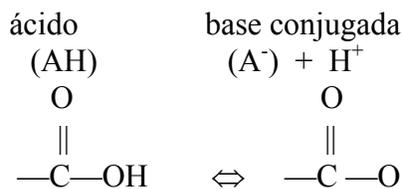
Las propiedades de los aminoácidos, constituyentes fundamentales de las proteínas, radican principalmente en su comportamiento ácido-básico. En efecto, los aminoácidos presentan al menos dos grupos ionizables, como se puede apreciar en su fórmula general (figura 1).

**Figura 1**      **Formula general de los aminoácidos**



La función (a) que se llama grupo carboxilo se encuentra protonada a pH ácido y pierde un protón a pH neutro (con la aparición de una carga negativa) según la ecuación siguiente (figura 2).

**Figura 2.**      **Funciones ácido y base conjugada de los aminoácidos**



Esta función química está caracterizada por su constante de ionización (Ka), es decir, la constante de equilibrio de la reacción de ionización (figura 3).

**Figura 3. Constante de equilibrio de la reacción de ionización**

$$K_{a1} = \frac{(A^-) (H^+)}{(AH)}$$

Sabiendo que:

$$pK_a = -\log K_a$$

$$pH = -\log (H^+)$$

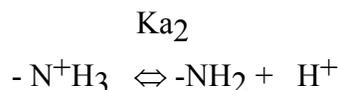
Podemos escribir:

$$pK_a = pH - \log \frac{(A^-)}{(AH)}$$

En la práctica una ionización se define por el valor de pKa, que corresponda al valor de pH en el cual hay igual concentración de (A<sup>-</sup>) y de (AH), o sea 50% de cada uno. El pKa de una función carboxilo tiene en general un valor entre 2 y 4.5.

La función (b) se llama amina. (figura 4). Se presenta en forma protonada (con carga positiva) a pH neutro y ácido, pierde un protón a pH muy básico (sin mostrar carga).

**Figura 4. La función (b) amina.**



El pKa de una función amina se encuentra generalmente entre 8 y 11. En la práctica se puede comprobar que una molécula se puede ionizar al titularla con NaOH.

Primero es necesario llevar el pH alrededor de 1.5-1.8 luego se agrega lentamente cantidades conocidas de NaOH y se mide después de cada adición el pH obtenido. Por Ejemplo, el ácido acético CH<sub>3</sub>COOH da una curva de titulación de este tipo (figura 5).

En esa curva se puede observar que al agregar NaOH el pH cambia rápidamente al principio y luego se estabiliza de tal manera que casi no varía al agregar más NaOH (zona plana). Después de esta región de estabilización ocurre un cambio brusco de pH por adición de más NaOH.

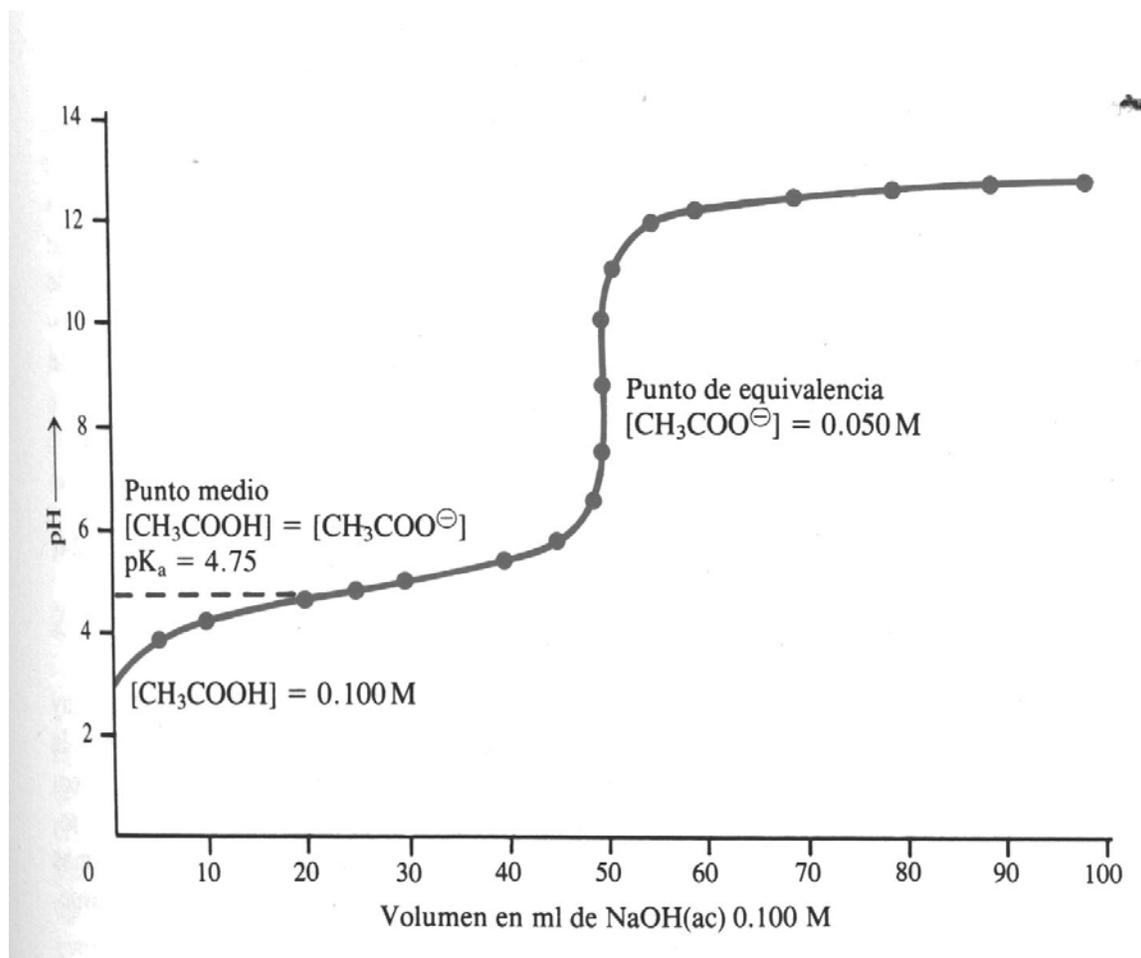
La región "estable" es una sigmoide, cuyo centro se encuentra a un pH correspondiente al valor de pKa. Una molécula ionizable se caracterizará siempre por un pKa y también por un rango de pH (pKa -1 < pH < pKa + 1) en el cual toda variación de pH será amortiguada.

Esa zona se llama zona de tamponamiento. Todas las moléculas ionizables servirán entonces de tampón alrededor de un valor del pKa.

Se puede escribir las fórmulas ionizantes o iónicas del ácido acético en función de la curva:

1. El valor del pKa corresponde a un equilibrio 50%-50% entre  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ .
2. Al comenzar la titulación, antes de la zona plana tenemos  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .
3. En la parte que cambia bruscamente después de la zona plana tenemos  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ .

**Figura 5. Curva de titulación del ácido acético**



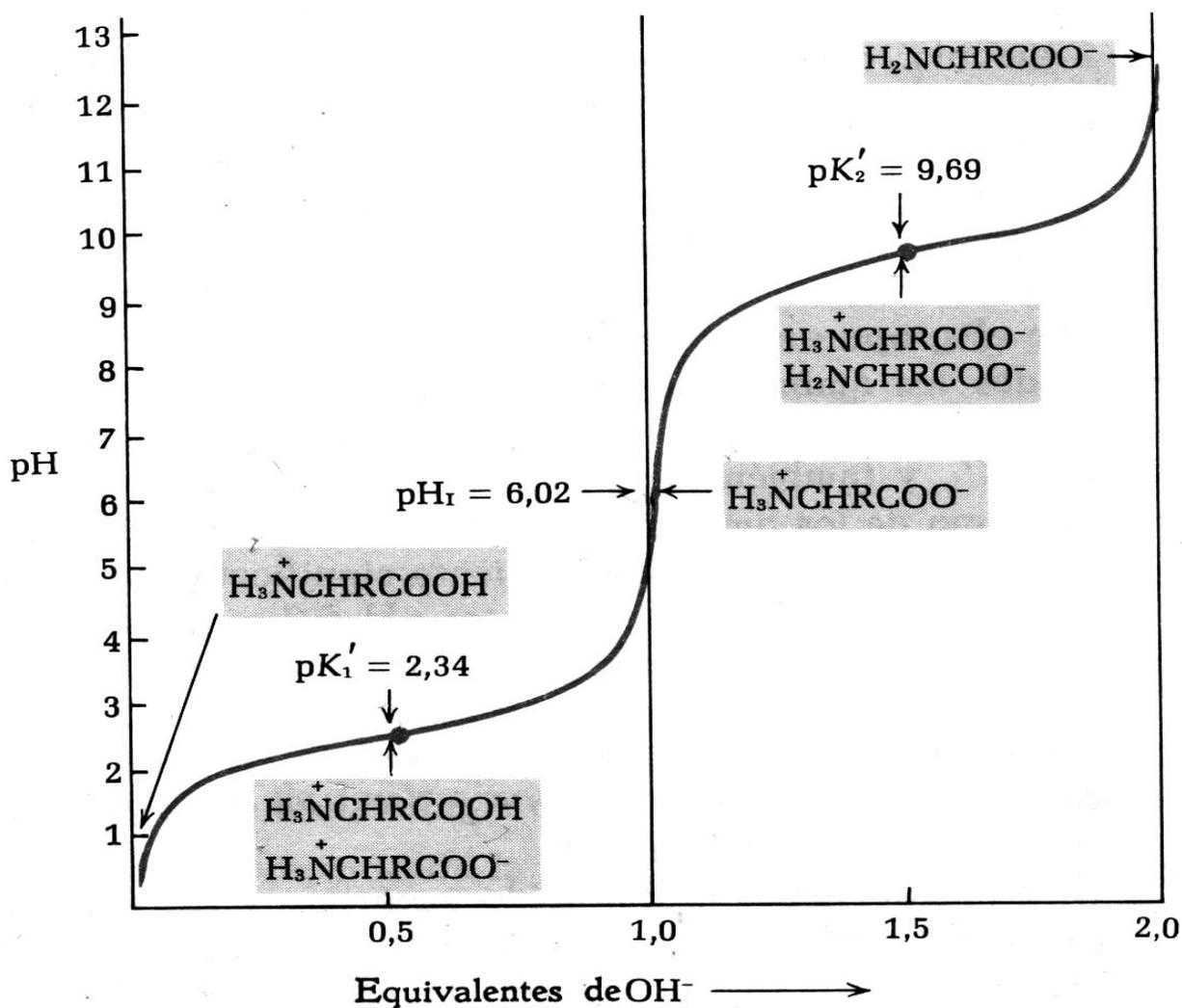
En resumen, por debajo del valor de su pKa (por lo menos de 2 unidades de pH) una molécula ionizable se encuentra casi todo en forma protonada, mientras que por encima de ese valor, se encuentra en su forma no protonada.

El caso de los aminoácidos (AA) es algo más complicado, puesto que hay 2 funciones ionizables. Eso se va a traducir en curvas de titulación multifásicas. (figura 6)

Sobre la base de las propiedades iónicas que poseen los grupos R de los aminoácidos, constituyentes de las proteínas, se han desarrollado métodos de separación cuantitativa a partir de mezclas complejas, como un hidrolizado de proteínas.

El estudio sistematizado de estas propiedades, ha significado progresos importantes en el conocimiento detallado de la estructura de las proteínas, métodos como la cromatografía y la electroforesis, que han permitido un análisis más rápido, preciso y actualmente: automatizado.

Figura 6. Curva de titulación del aminoácido alanina (ALA)



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 Equipos.

pH-Metro.  
Tubos de ensayo.  
Pipetas.  
Balones aforados.  
Fioles.  
Buretas.

### 2.2 Reactivos.

Aminoácidos.  
NaOH 0.5 N  
HCl 0.5 N.

### 2.3. Procedimiento

El objetivo de la práctica es la titulación con NaOH y con HCl de diversos aminoácidos (glicina, ácido aspártico, arginina), a fin de determinar el número de funciones ionizables, y el valor pKa y el pKb de cada función.

Las titulaciones se hacen en fioles que contienen la solución de aminoácido.

Se agrega el NaOH 0.5 N con una bureta. El pH se mide mediante un pH-metro provisto de un electrodo de vidrio introducido en la fiola.

En una fiola, se mide, con precisión la solución de aminoácido, y se diluye con agua. La solución del AA ha sido llevada a pH 1.2, antes de comenzar la titulación.

Después de haber introducido el electrodo en la fiola de tal manera que el vidrio poroso este sumergido en la solución, se agita y se mide el pH inicial. Ahora se agregan un volumen conocido de NaOH y se anota el valor obtenido de pH. No olvidar agitar bien la fiola antes de medir. La titulación se considera terminada cuando el pH (habiendo alcanzado valores cercanos a 13) no cambia más al agregar NaOH.

Se repite el procedimiento descrito con la base, pero se titula con el ácido.

Después de terminada la práctica, se grafican los valores de pH (en las ordenadas) en función de las cantidades de NaOH o HCl (en las abscisas). Se determina para cada AA el valor de pKa, pKb, el valor de pI (isoelectrico, es decir el pH al cual la carga de AA es nula) y se escribe para cada fase de la curva obtenida la fórmula iónica de la molécula presente.

### 2.4 Titulación de los Aminoácidos.

1. Es conveniente familiarizarse previamente con el uso del pH-metro, utilizando una muestra de tampón patrón.
2. Pese 200 mg de un aminoácido neutro (monoamino-monocarboxílico) como la glicina, disuelva en 10 ml de agua destilada y se lleva a pH 13.
3. Titule la disolución del aminoácido (utilizando una bureta y un pH-metro) con HCl 0.5 N; gota a gota, hasta que la solución alcance un pH de 1.2.

4. Terminada cada nueva adición del ácido, agítase la solución y anote el pH y el volumen consumido (lectura de la bureta).
5. Disuelva otros 200 mg de la muestra en 10 ml de agua y titule con NaOH 0.5 N del mismo modo que hizo con el ácido, hasta que la solución alcance un pH de 13.
6. Repita ésta operación con un aminoácido trifuncional como la histidina, el ácido glutámico o la lisina.

### **3. AUTO-EVALUACIÓN.**

1. Calcule la concentración: molar, normal y porcentual, de una solución de L-Lisina que se ha preparado al pesar 20 mg y se completa con 50 ml de agua.
2. Calcule los meq de OH consumidos al titular la solución anterior, si se gastaron 0.2 ml de KOH 0.1 N.
3. Calcule los Eq de H consumidos de HCl 1 N, si se consumen 0.2 ml cuando se titula L-Val 0.1 M.
4. Si el pH de una disolución 0.01 M de un ácido HA, es 3.80. Calcule el pK del ácido.
- 5.Cuál es la aplicación de la fórmula de Henderson-Hasselbalch.
6. Por qué los AA poseen capacidad amortiguadora.
7. Cuando el tetrapéptido GLU-ASP-VAL-LYS, se somete a un campo eléctrico, hacia cuál electrodo migrará y por qué.
8. Diga cuál AA posee los grupos: amino terminal, carboxilo terminal.
9. Para el mismo tetrapéptido, como debe ser empacada una columna de intercambio iónico, si deseamos eliminar del eluato el tetrapéptido.
10. Defina los siguientes términos: pH, pKa, pKb, pI y solución amortiguadora.
11. Dibuje los 20 L-  $\alpha$ - AA y clasifíquelos según la polaridad de sus grupos -R.
12. Efectué un enlace peptídico.
- 13.Cuál es la relación que existe entre la polaridad de una proteína y sus aminoácidos constitutivos.

**4. INFORME 3 (TITULACION DE AMINOACIDOS)**

**Apellidos**

**Nombres**

Grupo de prácticas

Nº del mesón

Fecha

Nº del estudiante

Calificaciones

Entrada		Desarrollo		Informe		<b>Definitiva</b>	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

**1. Complete el siguiente cuadro con la información deseada relacionada con el AA que Ud. tituló. (Consulte del anexo del experimento 2)**

Nombre del aminoácido (AA)	
Clasificación del AA	
Concentración del AA	
Escriba la fórmula	

**2. Use un papel milimetrado para realizar ambas curvas, recorte y anexe al informe en el espacio a continuación.**

Con ácido	Con base

3. Sobre la base de sus cálculos complete el cuadro con la información deseada.

Valores	Especie(es) química en fórmula	Eq. OH	Eq. H
pK1.			
pK2.			
pK3.			
pI			

4. Discuta sus resultados.

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica y sin anexar hojas. Tijeras, papel milimetrado, regla y goma deben ser aportado por los estudiantes.**