

## 4. CURVAS DE TITULACION DE AMINOACIDOS

### ESQUEMA

- Curvas de titulación de los aminoácidos
  - Curva de titulación de un aminoácido neutro como la glicina
  - Curva de titulación de un aminoácido básico como la histidina
  - Curva de titulación de un aminoácido ácido como el glutamato
- Aplicación práctica. Realización y análisis de la titulación de aminoácidos

### Curvas de titulación de los aminoácidos

Tal y como se ha descrito previamente, la representación gráfica de la variación del pH de una solución por la adición de equivalentes de ácido o de base se denomina **curva de titulación**. En el caso de los aminoácidos, las curvas de titulación proporcionan la siguiente información (o bien se puede deducir a partir de las mismas):

- Medida del pK de los grupos ionizables: se localizan en el punto medio de la zona tampón.
- Regiones de capacidad tampón: mesetas donde se localizan los pKs; dichas regiones se encuentran en el intervalo  $pK \pm 1$  unidad de pH.
- pI: se localiza en el intervalo de viraje.
- Formas ionizables del aminoácido en cada rango de pH.
- Carga eléctrica del aminoácido en cada rango del pH
- Solubilidad relativa del aminoácido en cada rango de pH.

## Curva de titulación de un aminoácido neutro como la glicina

Se pueden realizar las siguientes observaciones:

1. A pH ácido la Gly se encuentra como un ácido diprótico, ya que tanto el grupo amino como el carboxilo se encuentran protonados, es decir, a pH = 1, el 100% de las moléculas de aminoácido se encuentran en forma de catión.

2. Al ir añadiendo equivalentes de base, el grupo  $\alpha$ -carboxilo (-COOH) se disocia, cediendo protones al medio y transformándose en un grupo carboxilato; este equilibrio viene descrito por el  $pK_C$ . Cuando pH =  $pK_C$ , la glicina se encuentra como 50% cation + 50% zwitterion. Por lo tanto, el par -COOH/-COO<sup>-</sup> puede servir como un tampón amortiguador en la región de pH cerca del valor  $pK_C$ . En cuanto a la carga, cuando pH =  $pK_C$ , entonces [I] = [II] y por lo tanto  $Q_{neta} = 0.5$ ; y cuando pH =  $pK_C - 2$ ; [I] / [II] = 100:1;  $Q = 1$ , es decir prácticamente sólo existe la forma I en solución.

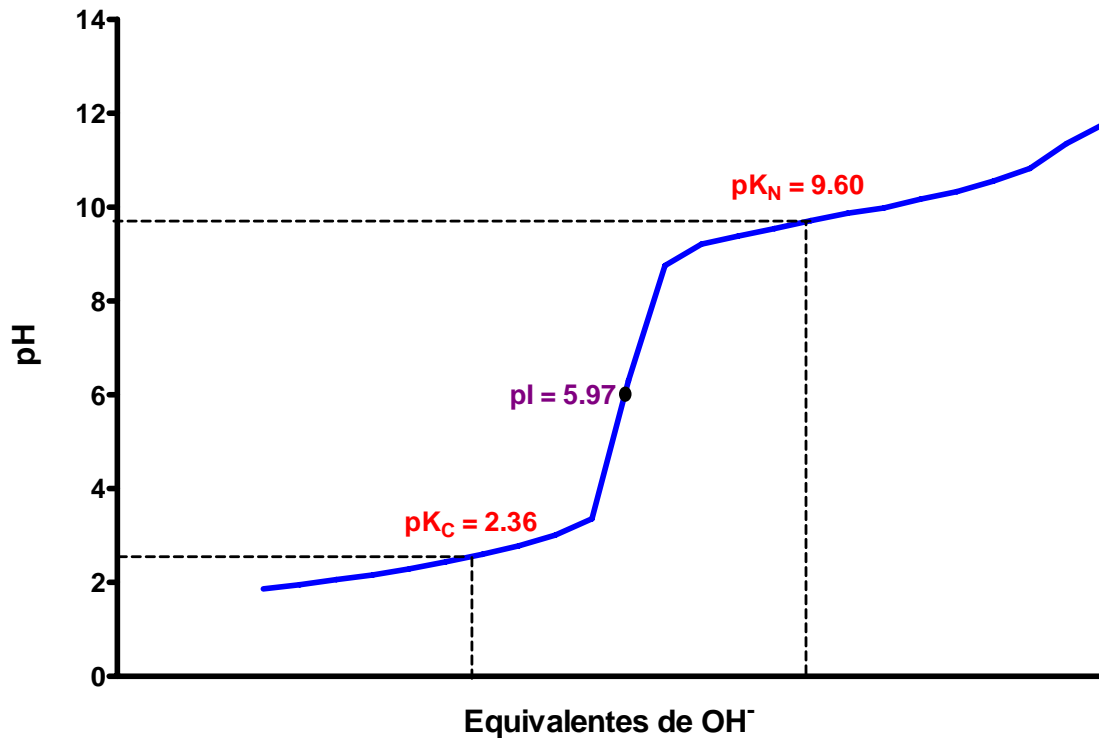
3. En el pl, prácticamente el 100% del aminoácido se encuentra como ion dipolar o zwitterion, de forma tal que el aminoácido presenta una carga neta nula (el aminoácido es eléctricamente neutro).

Nota: tal y como se ha comentado anteriormente, en el pl, la mayoría de las moléculas del aminoácido se encuentran en forma de ion dipolar, pero también existen pequeñas cantidades equimolares de aniones y cationes, además de una pequeña fracción de aminoácido no ionizado.

4. Si se siguen añadiendo equivalentes de base, el grupo amino (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) se disocia también, obteniéndose la forma totalmente desprotonada de la glicina; este equilibrio está definido por el  $pK_N$ . Cuando pH =  $pK_N$ , la glicina se encuentra como 50% zwitterion + 50% anion. Por lo tanto, el par -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>/-NH<sub>2</sub> puede actuar como un sistema tampón ó disolución amortiguadora en la región de pH cerca del  $pK_N$ . En cuanto a la carga, cuando pH =  $pK_N$ , entonces [II] = [III] y por lo tanto  $Q_{neta} = -0.5$ .

5. A pH muy elevados, el 100% de las moléculas de aminoácido se encuentran en forma de ion negativo o anion. Cuando  $\text{pH} = \text{pK}_N + 2$ ;  $[\text{III}] / [\text{II}] = 1:100$ ;  $Q = -1$ , es decir prácticamente sólo existe la forma III en solución.

### Curva de titulación de la Gly



### Curva de titulación de un aminoácido básico como la histidina

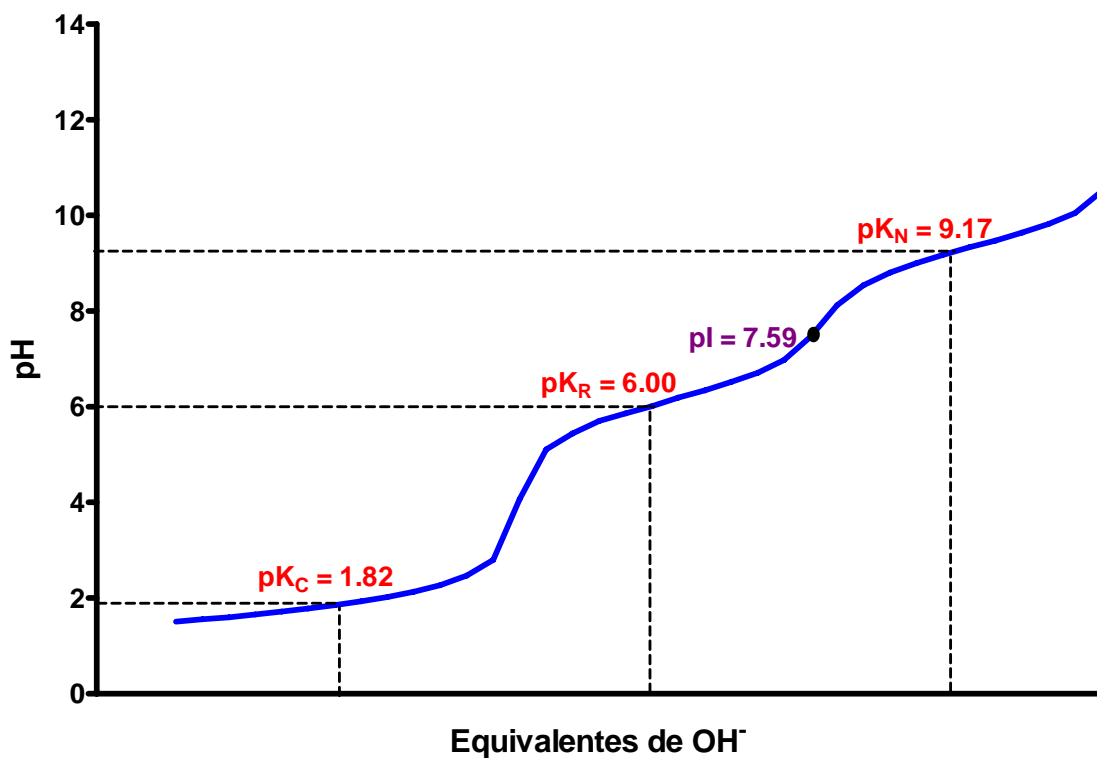
Las premisas establecidas para la glicina son igualmente válidas. Simplemente hay que tener en consideración el hecho de que este aminoácido presenta tres grupos ionizables: el grupo carboxilo, el grupo imidazol de la cadena lateral y el grupo  $\alpha$ -amino.

Por lo tanto, la adición de equivalentes de base produce la liberación secuencial de protones al medio, y estos equilibrios están determinados por sus correspondientes constantes: el grupo carboxilo ( $\text{pK}_C$ ), el grupo imidazol ( $\text{pK}_R$ ) y el grupo amino ( $\text{pK}_N$ ). En este caso, existen tres

regiones de capacidad tamponante, una de ellas localizada cerca del  $pK_R = 6$ , por lo que la histidina actúa como tampón a pH fisiológico. A su vez, el  $pI$  se calcula como el promedio del  $pK_N$  y del  $pK_R$ .

En el caso de la histidina, el hecho de que su  $pK_R$  esté muy próximo al pH fisiológico, implica que este aminoácido puede actuar como ácido ó como base en los medios biológicos. Por lo tanto, la hemoglobina, que es una proteína rica en histidina, es capaz de tamponar los excesos de ácido ó de base en sangre, constituyendo uno de los sistemas tampón del organismo (uno de los más importantes junto al tampón bicarbonato). Además, la histidina forma parte del centro activo de muchas enzimas que catalizan reacciones que cursan con transferencia de protones.

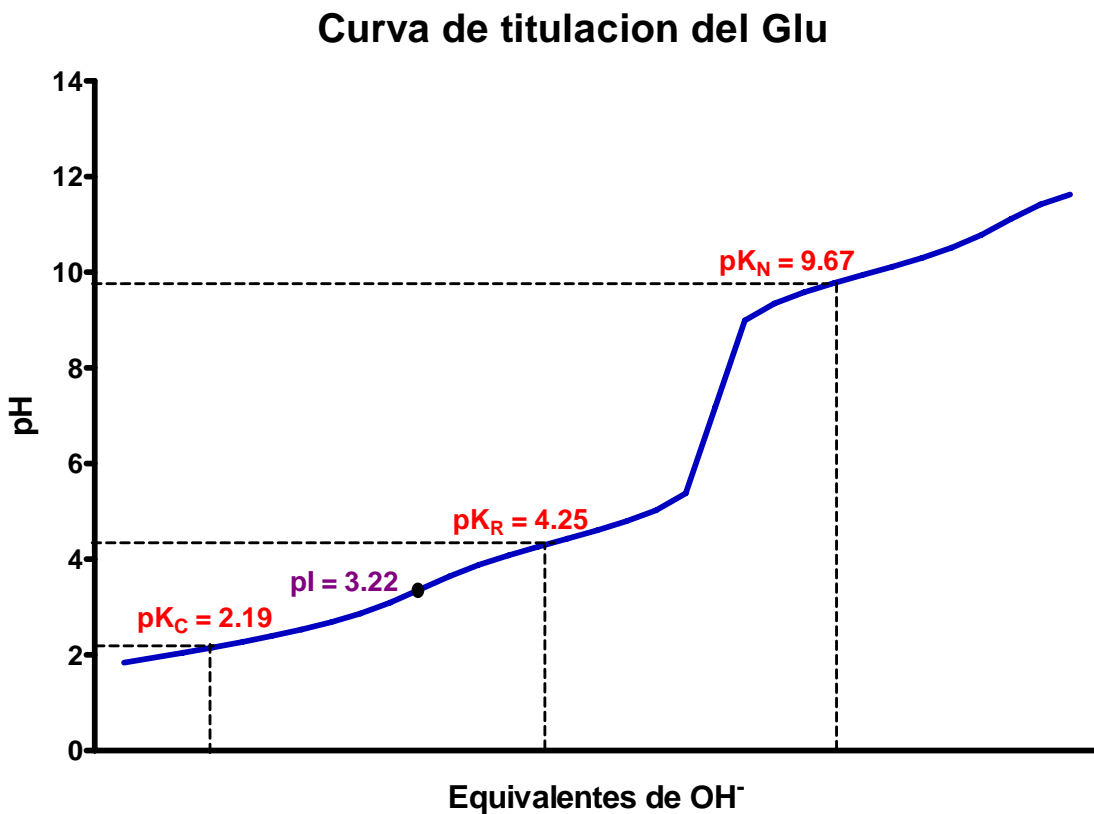
### Curva de titulación de la His



## Curva de titulación de un aminoácido ácido como el glutamato

Igualmente, se realiza el mismo análisis que para la Gly e His. Simplemente hay que tener en consideración el hecho de que este aminoácido presenta tres grupos ionizables: el grupo  $\alpha$ -carboxilo, el grupo carboxilo de la cadena lateral y el grupo  $\alpha$ -amino.

Por lo tanto, la adición de equivalentes de base produce la liberación secuencial de protones al medio, y estos equilibrios están determinados por sus correspondientes constantes: el grupo  $\alpha$ -carboxilo ( $pK_C$ ), el grupo carboxilo de la cadena lateral ( $pK_R$ ) y el grupo amino ( $pK_N$ ). En este caso, existen tres regiones de capacidad tamponante, y el  $pI$  se calcula como el promedio del  $pK_C$  y del  $pK_R$ .



## Aplicación práctica. Realización y análisis de la titulación de aminoácidos

### I. Introducción

Como se ha señalado, los aminoácidos son compuestos anfóteros, ya que pueden comportarse como ácidos ó como bases, debido a que contienen al menos un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) en su estructura. En esta práctica se realizará la titulación de la glicina, un aminoácido neutro, y de la histidina, un aminoácido básico. Para obtener la curva completa de valoración es necesario utilizar un ácido titulante (HCl 0.5 M) y una base (KOH 0.5 M). A partir de la curva de titulación se determinarán los valores pK y K de cada uno de los grupos ionizables, así como las zonas tampón y la posible importancia fisiológica de estos equilibrios.

### II. Indicaciones para realizar el procedimiento experimental

Teniendo en cuenta que los pK de los grupos funcionales de los aminoácidos se encuentran localizados en distintos rangos de pH, es necesario realizar una titulación que abarque prácticamente todo el rango de pH (ácido y básico) para cada aminoácido. Así, se emplea una solución de HCl 0.5 M para los grupos  $\alpha$ -carboxilo, y una solución de KOH 0.5 M para los grupos  $\alpha$ -amino. Dado que la histidina presenta el grupo ionizable imidazol en su cadena lateral, es necesario también caracterizar su pK<sub>R</sub>. Por lo tanto, hay que realizar cuatro valoraciones (dos por cada solución de aminoácido, una con ácido y otra con base). Otra posibilidad es ajustar el pH de la solución inicial a valores muy ácidos ó muy básicos, y titular con un solo agente; el problema de esta segunda aproximación radica en la dilución de la muestra tras sucesivas adiciones de ácido ó base fuerte.

1. Calibrar el pHmetro y lavarlo con agua destilada, según las instrucciones que se proporcionan.
2. Medir 50 mL de la solución de aminoácido a valorar y añadirlos a un vaso de precipitados.
3. Introducir el electrodo en la solución y medir el pH (pH inicial). Anotar el valor en el protocolo experimental.
4. Lavar el electrodo con agua destilada.
5. Añadir a la solución 0.5 mL ácido o base titulante, agitar con cuidado y medir el pH de nuevo. Anotar el volumen añadido y el pH medido.

6. Repetir la adición de ácido o base titulante en alícuotas de 0.5 mL hasta terminar la valoración, es decir, cuando se haya cubierto el rango entero de pH, o bien se haya completado la titulación de todos los grupos funcionales de la molécula.

### III. Análisis de los resultados

Para analizar y representar gráficamente los resultados obtenidos se puede utilizar un programa informático, tipo Excel, Calc ó Prism, y es imprescindible que todas las magnitudes estén acompañadas de sus correspondientes unidades. La herramienta de "**GRAFICO**" se emplea para representar los resultados, y como se señalo en el tema anterior, para que una gráfica sea informativa, es conveniente que tenga un **título** y es absolutamente imprescindible que los ejes tengan una **leyenda**, donde se indique la **magnitud** que se representa, junto con las **unidades** utilizadas.

#### Valores de pH con los que se puede trabajar

Gly con HCl: 6.82, 3.36, 3.01, 2.78, 2.60, 2.44, 2.29, 2.16, 2.06, 1.95, 1.86, 1.78, 1.70, 1.63, 1.59, 1.52, 1.47, 1.43, 1.40, 1.32

Gly con KOH: 6.60, 8.75, 9.12, 9.38, 9.54, 9.71, 9.87, 9.98, 10.17, 10.33, 10.55, 10.82, 11.35, 11.76, 12.00, 12.14, 12.25, 12.35, 12.42, 12.47

His con HCl: 4.07, 2.80, 2.47, 2.27, 2.13, 2.02, 1.93, 1.85, 1.78, 1.72, 1.66, 1.60, 1.56, 1.51, 1.47, 1.43, 1.40, 1.37, 1.34, 1.31, 1.29, 1.27, 1.25, 1.22

His con KOH: 4.01, 5.11, 5.44, 5.70, 5.86, 6.01, 6.19, 6.34, 6.52, 6.71, 6.98, 7.46, 8.12, 8.54, 8.80, 9.00, 9.17, 9.33, 9.47, 9.64, 9.82, 10.05, 10.50, 10.99

#### Normas a tener en cuenta a la hora de realizar el análisis

- Empleo del S.I.
- Utilización correcta de las magnitudes, unidades y cifras significativas.
- Los resultados deben deducirse, y no sólo incluir el resultado final.
- Empleo de la notación científica.

- Queda absolutamente descartado el uso de reglas de tres, por no ser cálculos matemáticos válidos.

### Pasos a realizar para analizar los resultados obtenidos

1. *Tabulación de los datos experimentales.* En una tabla se han de disponer los siguientes datos, expresándolos siempre en unidades del SI: el volumen de ácido o base titulante añadido, el volumen total, las moles de ácido o base añadidas, el pH medido y  $[H_3O^+]$ .

2. *Representaciones gráficas.* En una gráfica, se ha de representar  $V_{\text{ácido/base}}$  vs. pH para la cada valoración realizada. En el eje de abscisas se representa la cantidad de agente titulante añadido (equivalentes, moles, volumen...) y en el eje de ordenadas, el pH obtenido. Los puntos se pueden unir con una línea. En esta gráfica se pueden distinguir las distintas fases indicadas en la práctica anterior (Titulación del Tris, tema 2); cabe recordar que en el punto medio de la zona tampón se localiza el valor pK, y en el punto medio del intervalo de viraje, el punto de equivalencia. Así, a partir de la curva de valoración es posible determinar de forma intuitiva el valor  $pK_a$  y la cantidad de base valorada.

3. *Deducción de resultados a partir de las gráficas y de los datos facilitados*

- gramos de aminoácido valorado.
- Valor de los **K y pK** de los grupos ionizables.
- Regiones de capacidad tampón.
- Punto isoeléctrico (pI).
- Formas ionizables del aminoácido en cada rango de pH.
- Carga eléctrica del aminoácido en cada rango del pH y solubilidad del mismo.

4. *Comentarios y conclusiones*