



# DETERMINAÇÃO REFRAATOMÉTRICA DO LIMITE DE SOLUBILIDADE DA ARGININA EM ÁGUA PURA E EM SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICEROL

*Refractrometric determination of the solubility limit of arginine in pure water and aqueous glycerol solution*

Mario da Silva Garrote Filho<sup>1</sup>, Natássia Caroline Resende Corrêa<sup>1</sup>, Lúbia Cristina Fonseca<sup>1</sup>, Cleine Chagas da Cunha<sup>1</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>1</sup>, Tales Alexandre Aversi-Ferreira<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas (ICB III), Universidade Federal de Goiás

\*Autor para correspondência: [aversiferreira@yahoo.com.br](mailto:aversiferreira@yahoo.com.br)

**Palavras-chave:** *arginina, glicerol, solubilidade*

## 1- INTRODUÇÃO

As proteínas são formadas pelo enovelamento da cadeia polipeptídica, que é formada pela ligação seqüencial de aminoácidos. Há 20 aminoácidos que comumente são utilizados na síntese de aminoácidos. Todos os aminoácidos possuem em comum o fato de serem constituídos por um átomo de carbono ao qual está ligado um grupo amino, um grupo carboxila, um átomo de hidrogênio e uma estrutura conhecida por cadeia lateral. Os aminoácidos diferem entre si devido a cadeia lateral que possuem, pois as demais estruturas são as mesmas para os aminoácidos como um todo. Por causa da cadeia lateral, um aminoácido pode ser hidrofóbico, como é o caso da tirosina e do triptofano, ou hidrofílico, como é o caso da arginina e da lisina (NELSON; COX, 2002).

Um das principais fatores envolvidos no enovelamento de uma proteína é a força hidrofóbica, que surge a partir da aversão entre os aminoácidos hidrofóbicos e a água (BRANDEN; TOOZE, 1991). Uma proteína pode se enovelar de diferentes modos e, conseqüentemente, apresentar várias conformações. Poucas dessas conformações correspondem a proteínas funcionais, que pertencem ao estado nativo. Já as conformações que correspondem a proteínas inativas, fazem parte do estado desnaturado (QUO; BOLEN; BOLEN, 1998; BASKAKOV; BOLEN, 1998).

Os estados nativo (N) e desnaturado (D) encontram-se em equilíbrio, o que acontece quando o processo de desnaturação é reversível. O equilíbrio entre esses dois estados pode ser deslocado no sentido do estado nativo, como ocorre na presença de osmólitos, ou do estado desnaturado, como ocorre na presença de caotrópicos. Esse deslocamento ocorre de acordo com a diferença de energia livre entre esses dois estados, sendo favorecido o estado de menor energia livre. Na presença de osmólitos, como o glicerol, o estado N apresenta menor energia livre do que o estado D. Já na presença de caotrópicos, como a uréia, o estado nativo apresenta maior energia livre do que o estado D (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; LIU; BOLEN, 1995).

Acredita-se que os osmólitos são excluídos preferencialmente da superfície da proteína com a qual interagem, resultando na formação de uma camada de hidratação ao redor da mesma. Essa camada de hidratação seria a chave para o mecanismo de estabilização dos osmólitos (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989). Além de estabilizar o estado N de uma proteína, os osmólitos podem ser usados para na cristalização dessas moléculas (BOLEN, 2004).

O efeito de solutos sobre a estabilidade de uma proteína pode ser estudo a partir do efeito desses solutos sobre cada um dos 20 tipos de aminoácidos que são comumente empregados na síntese de uma proteína. Um dos modos de se fazer isso é pela avaliação do limite de solubilidade desses aminoácidos (NOZAKI; TANFORD, 1963; QUO; BOLEN; BOLEN, 1998).

O limite de solubilidade de um aminoácido corresponde à concentração máxima que uma solução desse aminoácido pode alcançar em uma determinada temperatura, de tal forma que um acréscimo do aminoácido à solução leva à sua precipitação. Em uma solução saturada, o aminoácido solubilizado fica em equilíbrio com o aminoácido precipitado. Esse equilíbrio pode ser modificado pela incorporação de osmólitos ou caotrópicos à solução, o que permite a obtenção de inferências importantes sobre o efeito daqueles solutos sobre a estabilidade de uma proteína (NOZAKI; TANFORD, 1963; QUO; BOLEN; BOLEN, 1998).

O estudo da estabilidade das proteínas é importante porque essas moléculas são indispensáveis para a vida, e também porque possuem importantes aplicações farmacológicas. Muitas proteínas são usadas como medicamentos ou cosméticos. Para a indústria, é importante que as propriedades de uma proteína de uso comercial sejam mantidas. Entretanto, o transporte e o armazenamento dessas proteínas podem desnaturá-las.

Para evitar isso, é importante estabilizar o estado nativo (LEE, 2000).

Neste trabalho nós determinamos o limite de solubilidade da arginina em água pura e em solução aquosa de glicerol a 0,5 mol.l<sup>-1</sup> e 25 °C mediante uso de refratometria.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

O limite de solubilidade da arginina foi obtido por refratometria. Foi necessária a elaboração de um novo protocolo para a utilização da refratometria (FONSECA, 2005; GARROTE FILHO, 2005). A arginina foi escolhida por ser um aminoácido bastante solúvel em água. Até então já haviam sido realizadas pesquisas similares, porém usando-se outros métodos (NOZAKI; TANFORD, 1963; QUO; BOLEN; BOLEN, 1998). A validade do uso de refratometria neste tipo de determinação foi checada pela análise gravimétrica dos precipitados. Os cálculos e as análises estatísticas foram realizados com a ajuda do programa Microcal Origin 6.0 (Microcal, Inc., Massachusetts, EUA).

## 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do limite de solubilidade da arginina obtidos por refratometria foram comparados com os valores obtidos por gravimetria e não houve diferença estatisticamente significativa entre eles (P>0,05). Isso mostra que o uso de refratometria é confiável.

Os limites de solubilidade da arginina que obtivemos em água pura e em glicerol a 0,5 mol.l<sup>-1</sup> foram respectivamente de 85,84 e 81,43 g/100 ml.. Comparados com dados da literatura referentes ao limite de solubilidade da arginina em água pura, o erro relativo foi de apenas 0,23% (GARROTE FILHO, 2005).

A redução do limite de solubilidade da arginina em solução de glicerol em relação à água pura pode ter sido decorrente de um aumento da hidratação da arginina devido à presença de glicerol. Isso seria condizente com o efeito do glicerol sobre a formação da camada de hidratação ao redor da cadeia polipeptídica (GARROTE FILHO, 2005).

## 4- CONCLUSÃO

O método desenvolvido para a obtenção do limite de solubilidade por refratometria mostrou ser confiável para a arginina, pois seus valores de limite de solubilidade foram condizentes com aqueles relatados na literatura.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASKAKOV, H.; BOLEN, D. W. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 9, p. 4831-4834, fev. 1998.

BOLEN, D. W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. **Methods**. v. 34, n.3, p. 312-322, nov. 2004.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, engineering, and design of protein structures. In: \_\_\_\_\_. Introduction to Protein Structure. Nova York e Londres: Garland Publishing, 1991. p. 247-266

FONSECA, L. C. Termodinâmica da transferência de glicina da água pura para uma mistura água-etanol. 2005. 52 f. Dissertação (mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

LEE, C. J. Biopharmaceutical formulation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, n. 1, p. 81-84, fev. 2000.

LIU, Y.; BOLEN, D. W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**. v. 34, n. 39, p. 12884-12891, set. 1995.

GARROTE FILHO, M. S. Termodinâmica da transferência da cadeia lateral da arginina de água pura para solução aquosa de glicerol 0,5 mol.l<sup>-1</sup>. 2005. 60 f. Monografia (Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: \_\_\_\_\_. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3. ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 2002. p. 89-122.

NOZAKI, Y.; TANFORD, C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. **Journal of Biological Chemistry**. v. 238, n. 12, p. 4074-4081, dez. 1963.

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **PNAS**. v. 95, n. 16, p. 9268-9273, ago. 1998.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: Creighton, T. E., Protein structure: a practical approach, Oxford: IRL Press, 1989, p. 331-345.