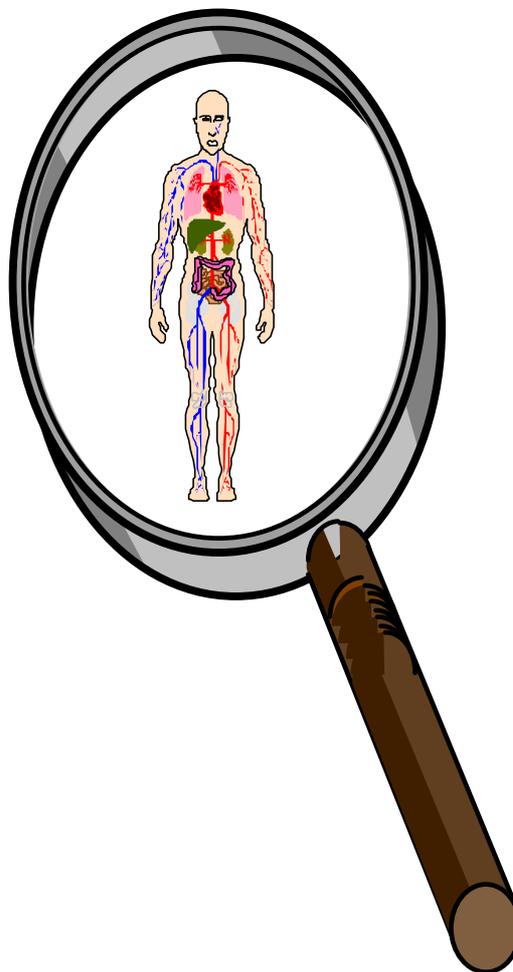


uff

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

**INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
GCM**

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS



PRÁTICA Nº 1 – TITULAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E ESTUDO DO EFEITO-TAMPÃO

1. Introdução

1.1. Aminoácidos – estrutura e propriedades

Em química, um aminoácido é qualquer molécula que contém simultaneamente grupos funcionais amina e ácido carboxílico. Em bioquímica, este termo é usado como termo curto e geral para se referir aos aminoácidos alfa: aqueles em que as funções amino (NH_3^+) e carboxila (COO^-) estão ligadas ao mesmo carbono, conforme a fórmula indicada na Figura 1:

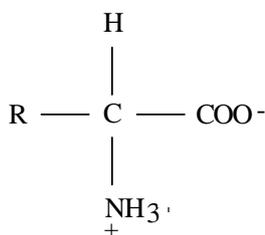


Figura 1 – Fórmula geral dos aminoácidos

Como se pode observar, ambos os grupos estão ligados ao carbono central, ao qual está também ligado um grupamento lateral variável, denominado **R**. A estrutura dos aminoácidos dá origem a dois isômeros opticamente ativos, isto é, capazes de promover a rotação do plano da luz polarizada (Figura 2).

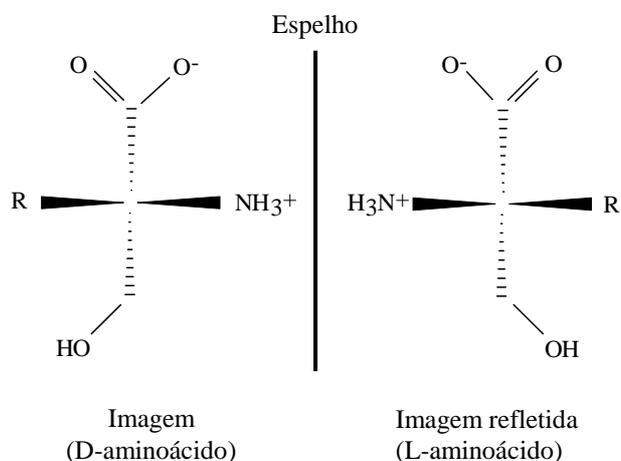


Figura 2 – Isomeria dos aminoácidos

Esses isômeros são denominados enantiômeros, são quirais (do grego *kiros*, que significa “mão”). São imagens especulares que não podem ser sobrepostas. A designação **L** ou **D** foi proposta por Emil Fischer, em 1891, com base na caracterização das formas L e D do gliceraldeído, conforme mostrado na Figura 3:

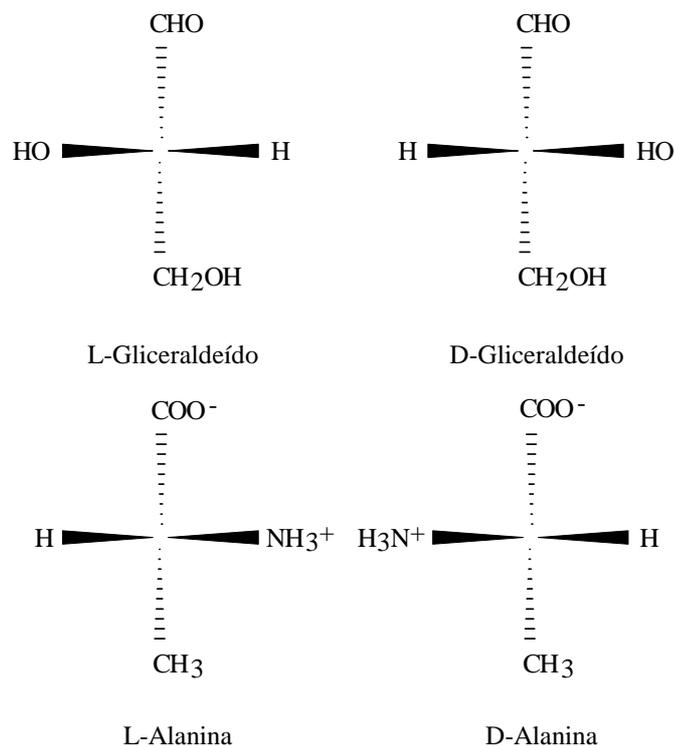


Figura 3 – Relação entre as formas L e D do Gliceraldeído e da Alanina.

Historicamente, as designações L e D foram usadas como abreviações dos adjetivos *levorrotatório* (provoca a rotação da luz para a esquerda) e *dextrorrotatório* (provoca a rotação da luz para a direita), respectivamente. Entretanto, sabe-se que nem todos os L-aminoácidos são levorrotatórios. Todos os aminoácidos das proteínas naturais têm a configuração L, porque as proteínas são sintetizadas por enzimas que reconhecem e inserem apenas L-aminoácidos nas cadeias peptídicas. Apenas alguns poucos peptídeos de

bactérias possuem aminoácidos na forma D (ex.: ácido D-glutâmico). Todos os 20 aminoácidos que compõem a estrutura das proteínas são α -aminoácidos, mas existem aminoácidos em que os grupos amino e carboxílico não estão ligados ao mesmo carbono; alguns desses aminoácidos são importantes precursores de algumas substâncias (ex.: β -alanina, precursora do ácido pantotênico) e possuem papéis celulares específicos (ex.: o ácido γ -aminobutírico ou GABA, um neurotransmissor).

A presença dos grupos amina e carboxila propicia aos α -aminoácidos um caráter **anfotérico** em solução aquosa, ou seja, um comportamento tanto de ácido como de base (Cabe aqui ressaltar um ponto importante: não há substâncias ácidas ou básicas em absoluto. Esses termos são **conceitos**; uma substância só é ácida ou básica **em relação** a outra substância). Em valores de pH 6,0 – 7,0, os aminoácidos existem predominantemente na forma dipolar iônica, cuja representação é aquela mostrada na Figura 1. Esta forma é denominada **zwitterion** (do alemão “íon híbrido”). Em faixas extremas de pH, por outro lado, eles se apresentarão como espécies iônicas diferentes (Figura 4):

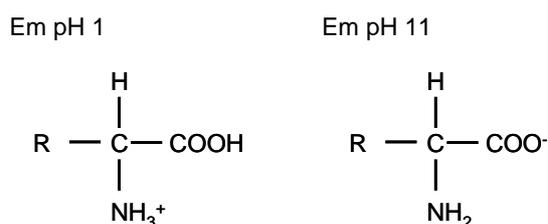


Figura 4 – Espécies iônicas dos aminoácidos em valores extremos de pH.

Portanto, os aminoácidos possuem *no mínimo* dois grupos (pois o R também pode ser ionizável) que podem sofrer protonações e desprotonações e essas reações dependerão do pH da solução em que os aminoácidos se encontram (Figura 5):

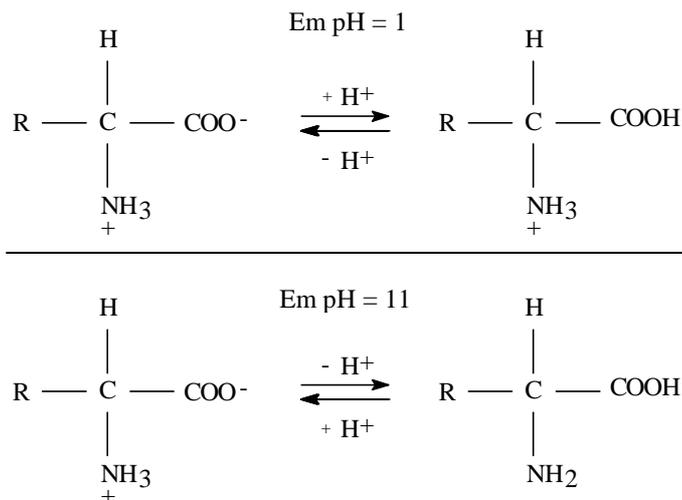


Figura 5 – Reações de protonação e desprotonação dos aminoácidos em valores extremos de pH.

Pode-se estudar a dissociação dos prótons de um aminoácido em solução realizando-se uma **curva de titulação** e observando-se a variação do pH do meio com o auxílio de um medidor de pH (ou pHmetro). A titulação de um aminoácido consiste na remoção gradual de prótons através da adição de uma base (como NaOH) e a curva de titulação corresponde ao gráfico dos valores de pH da solução em função do volume de base adicionado. Essa curva revela os **pK_as** (que são formas de expressão das **constantes de dissociação K_a**) dos grupos ionizáveis do aminoácido (lembre-se que $\text{pK}_a = -\log K_a$). À medida que a base é adicionada, a curva passa a apresentar estágios distintos, que dependem da concentração de cada uma das formas doadoras de prótons, como mostra a Figura 6:

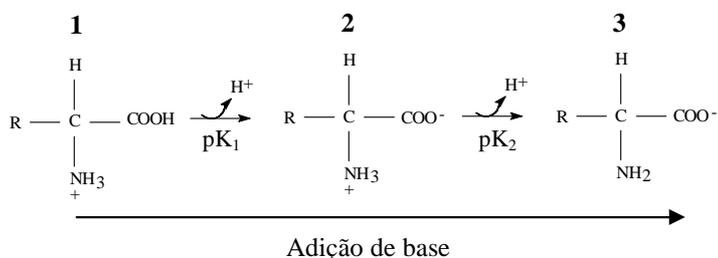
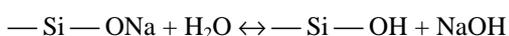


Figura 6 – Reações de dissociação de prótons de um α -aminoácido simples monocarboxílico.

Assim, para um α -aminoácido simples monocarboxílico, observaremos três pontos de inflexão na curva: A) um ponto no qual o pH é igual ao valor do pK do grupo carboxílico, onde estão presentes quantidades equimolares das formas A (carga líquida = +1) e B (carga líquida = 0); B) um ponto no qual o valor de pH corresponde ao **ponto isoeletrico (pI)** do aminoácido, onde a forma B está principalmente presente; e C) um ponto no qual o pH é igual ao valor do pK do grupo amino, onde estão presentes quantidades equimolares das formas B e C (carga líquida = -1). Portanto, cada aminoácido apresentará uma curva específica, já que esta depende das interações intramoleculares que o compõem. Além disso, alguns aminoácidos apresentarão mais de 2 valores de pK, uma vez que possuem mais um grupo ionizável no seu grupamento R.

1.1. O medidor de pH

Em linhas gerais, o medidor de pH é um aparelho capaz de converter a diferença de potencial (ou seja, é um **potenciômetro**) detectada pelo **eletrodo** em uma escala de pH. O eletrodo de vidro combinado (ver Figura 7) é um eletrodo compacto no qual o eletrodo de vidro acha-se envolvido pelo eletrodo de referência de Ag/AgCl (em alguns equipamentos esses eletrodos podem ser encontrados em separado). O eletrodo de vidro consiste de um tubo de vidro com um bulbo na extremidade inferior, feito de vidro especial (constituído de óxido de silício). Nele está contida uma solução de Ag/AgCl em solução de HCl 0,1 M. A superfície do bulbo é revestida de íons Na^+ que, quando em contato com os íons hidrogênio, são substituídos por prótons que permanecem em equilíbrio em cada lado da parede de vidro:



Quando o eletrodo é imerso numa solução que se deseja investigar, formam-se **potenciais de**

membrana e a condutividade elétrica é feita principalmente pelos íons Na^+ . A diferença de potencial estabelecida é comparada com o eletrodo de referência (Ag/AgCl ou Hg/HgCl₂) que envolve o eletrodo de vidro e entra em contato com a amostra através de uma junção cerâmica onde se forma uma ponte salina.

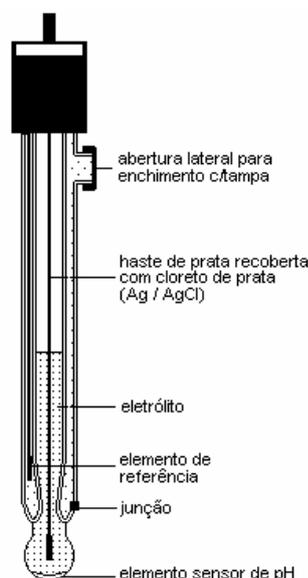


Figura 7 – Eletrodo de vidro combinado.

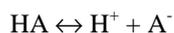
O medidor de pH possui um botão para ajuste da temperatura (já que esta influencia no equilíbrio químico dos tampões), um para calibração (com solução em pH neutro - 7,0) e outro para valores de pH extremos (normalmente 4 ou 10), que normalmente é chamado de botão de ajuste de assimetria e permite correções de desvios da curva do potencial do eletrodo. Além disso, alguns aparelhos possuem um botão para selecionar o tipo de leitura que se deseja realizar – em mV ou pH. Para a calibração do medidor, utiliza-se sempre soluções-padrão disponíveis comercialmente.

1.2. Soluções-tampão

As substâncias consideradas ácidos ou bases fortes são aquelas que tendem a se dissociar totalmente quando em solução, diminuindo ou aumentando o pH do meio, respectivamente. Assim, o pH de uma solução 0,1

M de HCl é praticamente 1,0 ($\text{pH} = -\log [0,1]$), enquanto o pH de uma solução 0,1 N de NaOH é praticamente 13,0 ($\text{pOH} = -\log [0,1]$ e $\text{pH} = 14 - 1$). O pH dos fluidos biológicos mantém-se mais ou menos constantes em valores próximos de 7,0 devido à presença de um grande número de substâncias capazes de captar ou liberar prótons. Nas células e nos fluidos biológicos predominam ácidos e bases fracos, que não são completamente ionizáveis em solução (alguns dissociam-se menos que 1 %). Sendo assim, a relação entre pH e o grau de dissociação de um ácido fraco não é direta como nos ácidos fortes. No entanto, ela pode ser analisada através da equação de Henderson-Hasselbach.

Considere a reação de dissociação de um ácido fraco em solução aquosa:



Aplicando a lei de ação de massas temos:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Onde K_a é a constante de equilíbrio da reação.

Rearranjando a equação temos:

$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_a} \times \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{Logo:}$$

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{K_a} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Chegamos finalmente à equação de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

A equação mostra que o pH de qualquer solução aquosa que contenha uma quantidade significativa de um ácido fraco dependerá da proporção (E NÃO DA QUANTIDADE ABSOLUTA) das formas dissociadas e não dissociadas do ácido e do $\text{p}K_a$ deste mesmo ácido. Se H^+ ou OH^- forem adicionados a uma solução contendo uma proporção adequada destas

formas, a razão [base]/[ácido] será alterada ao consumir esses $[\text{H}^+]$ ou $[\text{OH}^-]$, sem variar o pH do meio e, é claro, mantendo-se inalterada a constante de dissociação, K_a .

Assim, o TAMPONAMENTO DE UMA SOLUÇÃO é a capacidade desta em resistir a variações de pH. Substâncias cuja presença na solução são responsáveis por este efeito são conhecidas como TAMPÕES. O fenômeno do tamponamento é um dos fatores que possibilitou o surgimento da vida. Em organismos vivos o pH dos diferentes ambientes é mantido estável, mesmo após a “adição” de ácidos ou bases. Em laboratórios pode-se preparar uma solução tampão utilizando-se uma base fraca ou um ácido fraco (ex.: ácido acético) e sua base conjugada na forma de um sal (ex.: acetato de sódio). Em pesquisa científica os tampões são essenciais para a manutenção do pH em uma grande variedade de procedimentos, por exemplo, cultura de células e tecidos, medida de atividade enzimática, purificação de proteínas, etc... Normalmente utiliza-se um tampão para manutenção de um valor de pH que se encontre uma unidade acima ou abaixo de seu valor de $\text{p}K$, pois dentro desta faixa o seu efeito tamponante é muito mais eficiente (como exemplo, verifique as inflexões da curva de titulação dos aminoácidos nesta aula prática).

2. Objetivos

- Determinar os valores de $\text{p}K$ das soluções de aminoácidos (Glicina e Ácido glutâmico) através de titulação;
- Construir as curvas de titulação para cada um dos aminoácidos;
- Manusear e compreender o funcionamento de um medidor de pH.

- Estudar o efeito tamponante de misturas contendo proporções e concentrações diferentes de um ácido fraco e sua base conjugada.

3. Reagentes

Soluções de Glicina e ácido Glutâmico 0,02 M (pH 1);

Solução de NaOH 0,5 N.

Solução de HCl 1 M.

Soluções-padrão para calibração do medidor de pH.

Solução de ácido acético 0,2 M

Solução de acetato de sódio 0,2 M.

4. Procedimentos

4.1. Procedimentos gerais de ajuste do medidor de pH

- Ligar o aparelho;
- Retirar o eletrodo do recipiente contendo solução de KCl 3M e lavá-lo com água destilada.
- Imergir o eletrodo na solução-padrão de pH 7 e calibrar o aparelho no botão adequado.
- Retirar o eletrodo da solução e repetir o procedimento de ajuste, agora para a solução-padrão de pH 4,0, no botão adequado.
- Lembrar de sempre colocar o aparelho em “stand by” quando eletrodo não estiver imerso em uma solução.

4.2. Procedimentos para titulação dos aminoácidos

- Em um bécher colocar 40 mL de glicina ou ácido glutâmico.
- Mergulhar uma barra magnética na solução e posicionar o bécher sobre a placa agitadora.
- Inserir o eletrodo limpo e calibrado na solução, de modo que a junção cerâmica fique submersa

(cuidado para o bulbo não esbarrar na barra magnética).

- Sob agitação, titular com NaOH 0,5 N, adicionando 0,2 mL por vez e anotando o pH após cada adição (adicionar o NaOH diretamente à solução, sem esbarrar no eletrodo ou na parede interna do bécher).
- Construir o gráfico de pH da solução *versus* volume de NaOH adicionado.

4.3. Procedimentos para estudo da capacidade tamponante

- Em quatro bécheres, adicionar os volumes indicados das soluções de ácido acético, acetato de sódio e água:

Bécher	Ácido acético	Acetato de sódio	H ₂ O
1	20 mL	20 mL	--
2	10 mL	10 mL	20 mL
3	25 mL	15 mL	--
4	15 mL	25 mL	--

- Repetir os procedimentos descritos acima para titulação de cada uma das soluções, mas desta vez adicionar 5 x 0,5 mL de NaOH 0,5 N. Anotar o valor de pH a cada adição.
- Construir o gráfico de pH das soluções *versus* volume de NaOH adicionado.

5. Questões para discussão

1) Em relação à prática realizada:

- Quais os valores de pK e pI da glicina e do ácido glutâmico?
- Por que a curva de titulação do ácido glutâmico é diferente da curva da glicina?
- Calcule o pH teórico das soluções 1, 2, 3 e 4, sabendo que o K_a do ácido acético é $1,74 \times 10^{-5}$.

2) Você pode utilizar um aminoácido para fazer uma solução-tampão? Por quê?

3) Como a concentração de um tampão afeta a sua capacidade tamponante?

4) Um tampão mantém constante o pH de um meio indefinidamente?

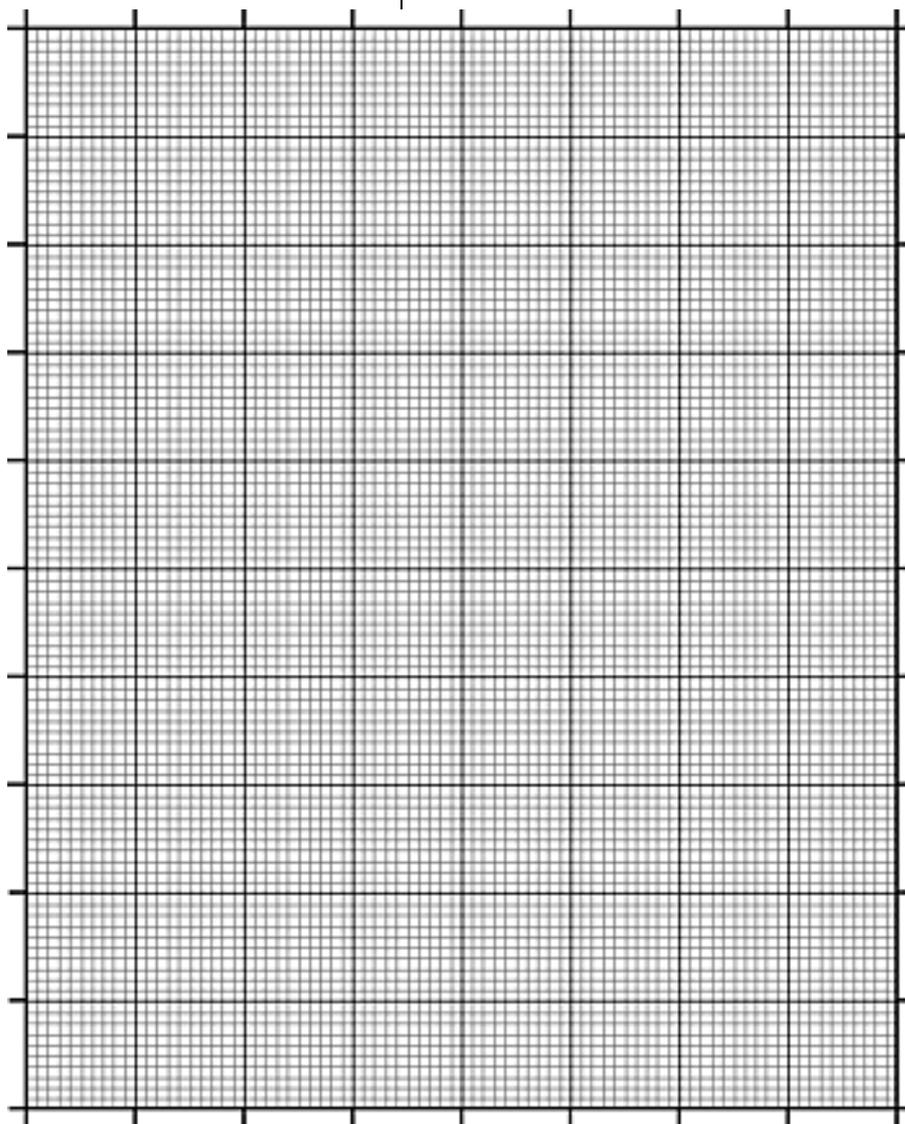
5) Calcule o grau de dissociação inicial do ácido acético 0,2 M. (Dica: considerando que a $[H^+]$ é igual à concentração de íons acetato, podemos reescrever a reação de dissociação da seguinte forma: $0,2 - y = y \times y$. Sendo assim a expressão de equilíbrio pode ser:

$$K_a = \frac{y^2}{0,2 - y}$$

o que gera uma equação do segundo grau que pode ser resolvida!).

6) Quais serão as concentrações de ácido acético e acetato de sódio necessárias para fazer um tampão de pH 5,1 com a soma ácido acético + acetato = 0,2 M?

7) Num laboratório hospitalar uma amostra de 10 mL de suco gástrico, obtida várias horas após uma refeição, foi titulada com NaOH 0,1N até neutralidade; foram necessários 7,3 mL. Como o estômago não continha nem alimento nem bebida, pode-se assumir que não havia tampões presentes. Qual o pH do suco gástrico?



PRÁTICA No 2 - FUNDAMENTOS DE FOTOMETRIA E ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO

1. Princípios gerais

O termo espectro foi utilizado inicialmente por Newton, quando este descobriu que a luz branca, ao atravessar um prisma, é dividida em várias cores. Atualmente, sabe-se que o espectro visível é apenas uma pequena parte do espectro eletromagnético. A luz é, portanto, definida como uma forma de energia eletromagnética, formada por ondas que apresentam comprimentos diferentes. O comprimento de onda (λ) é medido em nm onde 1,0 nm equivale a 10^{-9} m. A tabela abaixo mostra as regiões do espectro em relação ao comprimento de onda:

REGIÃO:	(λ) EM nm:
Raios X	0,1-100
Ultravioleta	100-400
Visível	400-800
Infravermelho	800-5000
Microonda	5000-30000

A cor dos objetos é devida a duas causas: reflexão e absorção. Assim, um papel transparente, vermelho, recebe todos os λ da luz branca, mas reflete e transmite somente o vermelho, sendo o restante absorvido. Quando um objeto é da cor branca, todos os λ são refletidos, se é negro, é porque, praticamente, todos os λ são absorvidos. No entanto, existe uma cor (ou λ) que é mais absorvida, a qual corresponde à chamada cor complementar. Se uma solução absorve na faixa de 435-480 nm, que corresponde à radiação azul, a sua cor (cor complementar) será o amarelo; a sensação visual do amarelo será dada pelo conjunto de todos os outros componentes da luz branca, que não foram absorvidos. A tabela abaixo mostra as cores de cada intervalo de radiação da faixa do visível e as suas respectivas cores complementares:

A capacidade que as diversas substâncias químicas têm de absorverem luz em determinados

INTERVALO (nm)	COR ABSORVIDA	COR COMPLEMENTAR
380-435	violeta	Verde-amarelada
435-480	azul	amarela
480-490	azul esverdeada	alaranjada
490-500	verde azulada	vermelha
500-560	verde	púrpura
560-580	Verde- amarelada	violeta
580-595	amarelada	azul
595-650	alaranjada	Azul-esverdeada
650-780	vermelha	verde-azulada

comprimentos de onda pode ser utilizada para a sua determinação quantitativa e qualitativa, uma vez que o espectro de absorção é característico para uma determinada substância e a quantidade de absorção (intensidade) é dependente da concentração do composto.

A intensidade da radiação transmitida por uma solução pode ser determinada em aparelho (fotômetro), que deverá ser constituído de: uma fonte luminosa, um seletor de λ (filtro ou prisma), um compartimento para a amostra, uma célula fotoelétrica (ou fototubo) e um sistema para amplificação e medida do sinal (corrente elétrica) proveniente da célula fotoelétrica (medidor de potencial elétrico = potenciômetro). Pode-se selecionar o comprimento de onda que incidirá sobre a solução usando-se um monocromador (prisma ou retículo de difração) ou um filtro óptico (vidro colorido ou quartzo, que transmite uma determinada faixa de λ na região do ultravioleta, UV). Se o aparelho dispõe de filtro óptico, é denominado fotômetro ou fotocolorímetro e se dispõe de prisma ou retículo é denominado de espectrofotômetro. Este último é muito útil, pois pode selecionar faixas de comprimentos de onda extremamente estreitas, nas regiões do UV, visível e infravermelho (IV).

A fotometria de absorção, portanto, presta-se tanto para a medida da concentração de compostos naturalmente corados, como daqueles incolores, mas passíveis de adquirirem cor mediante o emprego de certos reativos, bem como de compostos incolores que absorvem UV ou IV. Esta metodologia, por conseguinte, tem largo emprego na química analítica quantitativa. Alguns poucos exemplos: na determinação de atividade enzimática ou nas dosagens de compostos orgânicos em fluidos biológicos, como glicose, uréia, proteínas, etc., em que se dosa um produto colorido, obtido por meio de uma reação química, ou um produto incolor que absorva na região do UV ou do IV. Ensaio imunológico quantitativo (como o ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) também usam a fotometria.

1.1. Leis da fotometria

O princípio básico da fotometria é baseado no fato de que: partículas dispersas ou dissolvidas em uma solução interferem seletivamente com um raio de luz que passa através desta solução. Esta interferência depende dos seguintes fatores:

- cor do composto ou do tipo de ligação química presente;
- tamanho da partícula;
- transparência da solução;
- combinação dos fatores acima.

Deste modo, as partículas podem absorver e transmitir parte do espectro, dependendo da sua concentração, da sua natureza química e/ou da sua cor. Se pudermos medir o total de luz que incide (I_0) sobre a solução de uma determinada substância e o total da luz transmitida (I_t), podemos avaliar o quanto a substância absorveu (absorvância: A) O esquema abaixo mostra como funciona um fotômetro ou um espectrofotômetro:

A seguinte formulação pode ser feita:
Transmissão = I_t / I_0 (luz transmitida / luz incidente).
 Observe que o termo transmissão tem aplicação

limitada, uma vez que, a I_t é I_0 menos a luz que é absorvida não só pela substância que se deseja medir, mas também pelo solvente, pelo material da cubeta e por outras substâncias aí existentes. Assim, I_t é a luz transmitida após as absorções pela substância de interesse mais os interferentes. Para corrigir tal efeito, admite-se $I_t = 1$ (**100% de Transmitância**) a luz transmitida após I_0 atravessar a cubeta contendo uma solução denominada **branco**. Este branco contém todos os componentes do meio, exceto a substância a ser medida. No escuro, bloqueada a passagem de luz para o fototubo (fotocélula), a **Transmitância** = **0**, ou seja, não há luz transmitida a ser medida.

Na prática, a transmitância (T), que é medida em uma escala de 0 (no escuro) a 100% (com o branco na passagem da luz), é pouco utilizada, pois é substituída pelo valor de densidade óptica (**D.O.**) ou absorvância (A), termo mais aceito atualmente, que corresponde ao logaritmo do inverso da transmitância:

$$A = \log 1/T$$

A absorvância é, desta forma, medida em uma escala de 0 ($\log 1/1$) a infinito ($\log 1/0$). A relação da A com a concentração da substância pode ser compreendida pelas Leis de Lambert-Beer: a absorvância de uma solução é proporcional à concentração da substância na solução e à distância percorrida pelo feixe luminoso que atravessa a solução (caminho óptico): $A = \epsilon \cdot l \cdot c$,

onde: ϵ = coeficiente extinção molar, que é constante para cada substância, e definido como a absorvância (A) de uma solução 1 molar da substância em um determinado comprimento de onda (λ), numa cubeta de caminho óptico $l = 1$ cm (largura da cubeta) e $c =$ à concentração da solução.

Observe, portanto, que a absorvância é uma função linear da concentração. Assim, para uma mesma substância, considerando-se o caminho óptico constante, a A é diretamente proporcional à concentração desta

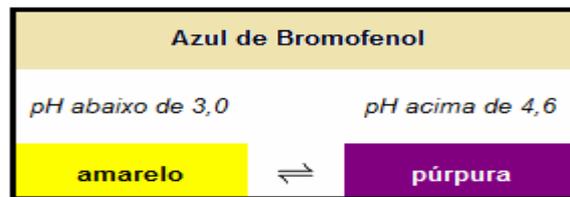
substância. No entanto, as Leis de Lambert–Beer nem sempre são obedecidas. Algumas desobediências são conhecidas e atribuídas a fatores como: mudança na natureza do soluto, valores muito altos ou muito baixos das concentrações das soluções, etc. Também as presenças de ácidos, bases e sais na solução podem contribuir para essas desobediências, por estarem mais completamente dissociados, à medida que aumenta a diluição, visto que absorção da luz pelos íons é diferente daquela apresentada pelas moléculas não ionizadas. Para se evitar discrepâncias das Leis de Lambert-Beer, deve-se trabalhar com soluções mais diluídas e construir, previamente, uma curva padrão, em que são usadas concentrações conhecidas (e crescentes) da substância em análise, e verificar as absorvâncias no comprimento de onda indicado e na cubeta de caminho óptico adequado. Desta forma, teremos os limites de concentração nos quais a solução obedece às Leis de Lambert-Beer, ou seja, onde há linearidade. Com o emprego da curva padrão, podemos, também, determinar a concentração de uma solução problema. O comprimento de onda (λ) usado para a obtenção da curva padrão é obtido pela preparação do espectro de absorção da substância em estudo e é, normalmente, o λ onde a absorvância para a substância apresenta o valor máximo.

2. Objetivos

- Determinar o espectro de absorção de uma solução de Azul de Bromofenol em pH neutro e em pH ácido;
- Caracterizar o comprimento de onda (λ) onde ocorre absorção máxima;
- Construir uma curva padrão do Azul de Bromofenol.

3. Reagentes

- Solução de Azul de Bromofenol 1 mg /100 mL em meio levemente ácido (amarelo) e Solução de Azul de Bromofenol 1 mg /100 mL (azul/violeta).



4. Procedimentos

4.1. Procedimentos gerais de ajuste do fotômetro

- Ligar o aparelho;
- Selecionar o comprimento de onda adequado.
- Ajustar o zero de transmitância;
- Introduzir a cubeta com o branco (água destilada) e ajustar a 100% de transmitância, no botão correspondente;
- Repetir os ajustes acima.
- **Obtenção do espectro de absorção:**
- Ajustar o comprimento de onda inicialmente em 400 nm;
- Ajustar o 100% de transmitância com o branco. Isto coincide com o 0 de absorvância;
- Colocar a cubeta com a solução de Azul de Bromofenol em meio ácido à concentração de 1 mg/100 mL;
- Ler a absorvância e registrá-la;
- Ajustar o λ a 430 nm, repetir o ajuste do branco, recolocar a solução de Azul de Bromofenol e ler, novamente, a absorvância correspondente a este λ ;
- Repetir estas operações para os seguintes valores de λ : 450, 470 e 490;
- O mesmo será feito para o Azul de Bromofenol em pH neutro. Sendo os comprimentos de onda analisados, respectivamente: 500, 530, 550, 570 e 590.
- Fazer o gráfico dos espectros de absorção do Azul de Bromofenol em papel milimetrado, relacionando absorvância (ordenada) contra λ (abscissa);
- Determinar o λ de absorvância máxima.

	Azul de Bromofenol (pH<3)	Azul de Bromofenol (pH>4,6)
λ	A	A
410		
430		
450		
470		
490		
510		
530		
550		
570		
590		

Dados:

- 1) Espectrofotômetro: TUNER, modelo 330
- 2) Solução: Azul de bromofenol em meio ácido (1mg/100ml) e Azul de bromofenol em pH neutro (1mg/100ml).
- 3) λ : comprimento de onda.
- 4) A: absorvância.

4.2. Curva padrão – Obtenção

- 1) Fazer diluição seriada:
 - Utilizar 6 tubos de ensaio e enumerá-los.
 - Adicionar 4ml de H₂O em cada tubo.
 - Colocar 4ml de Azul de Bromofenol no tubo 1 e agitar.
 - Retirar 4ml da solução do tubo 1 e adicionar no tubo 2. Repetir em todos os tubos.
 - No tubo 6 retirar 4ml e descartar.
 - Cada tubo estará, desta forma, diluído em 2x com relação ao anterior.
- 2) Preparar soluções de Azul de bromofenol nas concentrações citadas na tabela abaixo:

Concentração de Azul de Bromofenol (mg/100ml)	Absorvância (pH<3)	Absorvância (pH>4,6)
0,50 (¹ / ₂)		
0,25 (¹ / ₄)		
0,125 (¹ / ₈)		
0,0625 (¹ / ₁₆)		
0,03125 (¹ / ₃₂)		
0,015625 (¹ / ₆₄)		

- Ler as absorvâncias das diferentes soluções de Azul de Bromofenol (no λ ideal) e registrá-las;
- Construir, em papel milimetrado, a curva padrão (absorvâncias na ordenada e concentrações na abscissa), considerando os pontos zero de absorção e de concentração.

5. Questões para discussão

- 5.1- Explique porque o Azul de Bromofenol apresenta colorações diferentes com a mudança no pH da solução.
- 5.2- Você dispõe dos filtros azul, verde, vermelho e amarelo de um fotômetro. Qual deles você usará, para que uma solução de cor vermelha tenha uma absorção (contra o branco) o mais próximo de zero possível?
- 5.3- Avalie, nas condições experimentais acima, se o Azul de Bromofenol segue, estritamente, as Leis de Lambert-Beer, admitindo que nada interferiu em seu procedimento.
- 5.4- Explique por que não se deve usar cubetas de vidro para leituras na região do ultravioleta.

6. Questões complementares

- 6.1 – Você pesou 1, 2 e 3 mg de Azul de Bromofenol e dissolveu cada uma quantidade em 50 mL. As absorvâncias destas soluções, em 430nm, foram, respectivamente, 0,2, 0,4 e 0,6. A absorvância de uma solução desconhecida do sal foi 0,3. Calcule a sua concentração, em mg/100mL.
- 6.2 – Para a dosagem da glicose do sangue de um paciente, a amostra foi diluída em 10 vezes (no processo de desproteinização). 1mL do desproteinizado e 2mL de cada

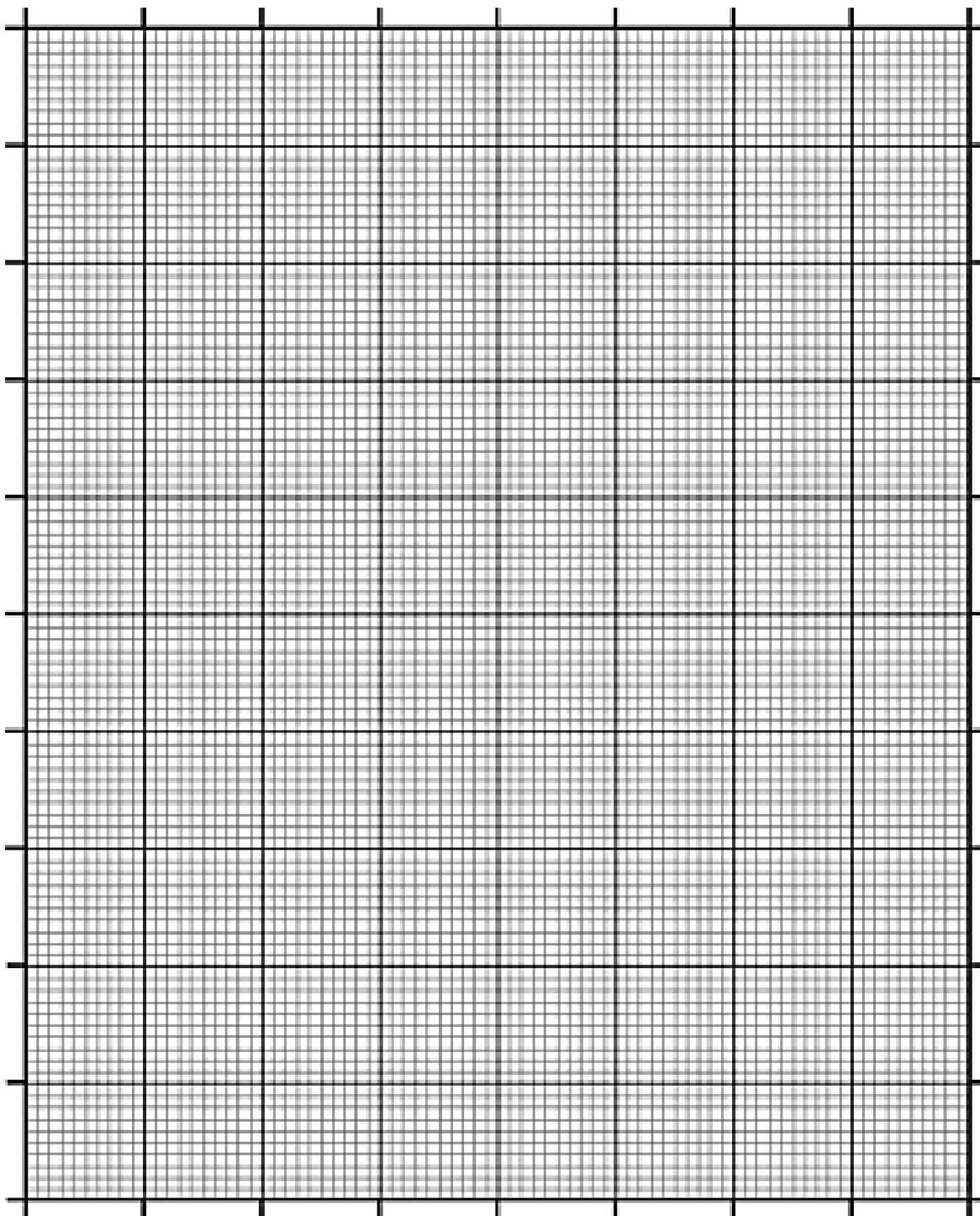
um dos padrões de glicose (P) de 10, 20 e 30mg/100mL foram processados para a dosagem da glicose, sendo o volume final, em todos os tubos, ajustados para 5mL. Após as leituras espectrofotométricas em comprimento de onda adequado, as absorvâncias obtidas foram:

Amostra..... 0,180
P-10 mg/100mL..... 0,150
P-20 mg/100mL.....0,298
P-30 mg/100mL.....0,400.

Qual a concentração da glicose no sangue do paciente?

6.3 - O coeficiente de extinção molar (ϵ) de uma substância de peso molecular 200 é 14,5. Uma solução desta substância apresentou , numa cubeta de caminho óptico de 2 cm, a absorvância de 0,800. Qual a concentração (em mg/L) da substância nesta solução?

- Papel milimetrado:



temperatura do meio, alteração do pH ou pela adição de solventes orgânicos. A alteração da estrutura primária das proteínas (quebra das ligações peptídicas) ocorre por tratamento à quente (100°C) em presença de ácido ou base forte ou através de adição de enzimas proteolíticas. Determinados agentes podem ser usados na precipitação de proteínas, o que é útil na desproteínização de materiais biológicos, como o sangue: ânions de ácidos complexos (tricloroacético, tânico, fosfotúngstico) formam sais insolúveis onde a proteína funciona como cátion; metais pesados (cobre, zinco, prata, mercúrio) em meio alcalino formam precipitados onde a proteína atua como ânion.

Os aminoácidos componentes de uma proteína podem ser genericamente caracterizados se, após sua hidrólise, efetuarmos a reação da ninhidrina. A ninhidrina (hidrato de tricetoidrindeno) reage com aminoácidos produzindo cor púrpura. É uma reação inespecífica quanto à identidade do aminoácido, sendo a reação dependente da presença de grupos amina livres. O aminoácido prolina, na verdade um iminoácido, ao reagir com a ninhidrina produz coloração amarela.

2. Objetivos

- Realizar reação específica para detecção de proteínas (reação do Biureto);
- Realizar reação específica de detecção de aminoácidos (reação com a ninhidrina);
- Verificar a alteração de solubilidade de proteínas em presença de soluções salinas e solventes orgânicos;
- Verificar a ação de agentes desnaturantes;
- Observar a separação cromatográfica (cromatografia de exclusão molecular) de substâncias de pesos moleculares diferentes.

3. Reagentes

- Reagente do Biureto: CuSO_4 em solução alcalina.
- Solução diluída de proteínas.

- Solução concentrada de proteínas.
- Solução de ninhidrina 0,1g% (P/V).
- Solução de aminoácidos.
- Ácido tricloroacético (TCA) 10% (P/V).
- Solução saturada de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- Solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0.
- Etanol gelado.
- Resina Sephadex G-25 (faixa de separação PM 1000-5000 D).
- Solução contendo compostos de diferentes pesos moleculares (azul de dextran: 2.000.000 D, vitamina B₁₂: 1355 D em tampão pH 7,0, contendo sacarose).

4. Procedimentos

- **Enumerar 12 tubos de ensaio**

4.1. Reação do Biureto:

- Tubo 1 (tubo branco): colocar: 1 mL do reativo do Biureto + 0,5 mL de água destilada;
- Tubo 2: colocar: 1 mL do reativo do Biureto + 0,5 mL da solução diluída de proteínas;
- Tubo 3: colocar: 1 mL do reativo do Biureto + 0,5 mL da solução de aminoácidos;
- Comparar o desenvolvimento de cor nos tubos.

4.2. Reação da ninhidrina:

- **Aquecer água à 100°C**
- Tubo 4 (tubo branco): colocar 2 mL da solução de ninhidrina + 0,5 mL de água destilada;
- Tubo 5: colocar 2 mL da solução de ninhidrina + 0,5 mL da solução diluída de proteínas;
- Tubo 6: colocar 2 mL da solução de ninhidrina + 0,5 mL da solução de aminoácidos;
- Ferver os tubos de ensaio 4, 5 e 6 por 5 minutos;
- Comparar o desenvolvimento de cor nos tubos.

4.4. Precipitação ácida:

- Tubo 7 (tubo de centrífuga): colocar 1 mL de TCA 10% (P/V). + 1 mL da solução diluída de proteínas;
- Agitar e observar;
- Centrifugar (por 10 minutos), separando as frações sobrenadante e precipitado;
- Colocar 0,5ml do sobrenadante no Tubo 8;
- Adicionar 1mL do reativo do biureto ao Tubo 8;
- Adicionar tampão ao precipitado do Tubo 7. Agitar;
- Comparar os resultados.

4.5. Efeito da adição de sais:

- Tubo 9: Colocar 2 mL da solução diluída de proteínas + 2 mL da solução saturada de sulfato de amônio. Agitar. Centrifugar à 3000rpm por 10 minutos, separar as frações sobrenadante e precipitado;
- Colocar o sobrenadante no tubo 10. Adicionar igual volume de TCA 10% (P/V)., agitar e centrifugar novamente. Se aparecer algum precipitado, tentar dissolvê-lo com 1 mL de tampão;
- Adicionar 1 mL de tampão ao precipitado do tubo 10 e agitar. Verificar o que acontece.

4.6. Efeito da adição de solventes orgânicos:

- Tubo 11: colocar 1mL da solução de proteínas + 2mL de etanol gelado (lentamente até o aparecimento de uma ligeira turvação).

4.7. Cromatografia em peneira molecular:

Montagem da coluna: numa coluna de vidro (aprox. 30 x 1,5 cm), colocar o gel suspenso em tampão pH 7,0, deixando a extremidade inferior da coluna aberta, até que o gel se acame. Cuidado para não deixar secar o gel, adicionando sempre tampão, até que o gel esteja equilibrado e acamado.

Aplicação da amostra: aplicar 1mL da amostra sobre a superfície da coluna, que deverá estar com cerca de 2 cm de tampão sobre o gel. Como a amostra está mais

densa, devido à presença da sacarose, esta se depositará sobre o gel.

Continuar adicionando o tampão e acompanhar o fracionamento dos componentes da amostra, anotando os resultados.

5. Questões para discussão:

5.1- Explique o que ocorreu em cada etapa executada.

5.2- Pelos resultados obtidos no item 4.5, podemos afirmar que a solução de sulfato de amônio saturado precipita todas as proteínas? Por quê? Como podemos saber se esta precipitação é reversível ou não?

5.3.- Pelos resultados obtidos no item 4.6, podemos afirmar que o etanol gelado precipita todas as proteínas? Por quê? Como poderíamos comprovar isto? O precipitado obtido (após centrifugação) seria redissolvido em tampão? Por quê?

5.4 - Qual foi a ordem de eluição das amostras na coluna (item 4.7)? Por quê?

6 - Exercícios complementares:

6.1- Você dispõe num laboratório de dois frascos idênticos, porém, não rotulados. Um deles contém solução de aminoácidos e, o outro, contém uma solução de proteínas. Qual seria o seu procedimento para identificar as duas soluções e rotular os frascos?

6.2- Descrever um método que permita separar a proteína nº 6 de uma mistura que contenha seis proteínas, sabendo-se que: a) as proteínas de nº 1, 3 e 5 precipitam pelo sulfato de amônio a 40% de saturação; b) as proteínas de nº 1, 2, 4 e 6 precipitam pelo etanol gelado; c) as proteínas de nº 1, 3, 5 e 6 precipitam pelo sulfato de amônio a 75% de saturação; d) os pontos isoelétricos das proteínas 1 e 3 são iguais a 6,5 ; o da proteína 2 é 7,2; o das proteínas 4 e 6 se igualam a 6,3 e o da proteína 5 é 6,8.

6.3- Num extrato biológico existem hormônios protéicos e isoenzimas, que devem ser isolados da maneira mais pura possível para uso posterior. Você dispõe de sulfato de amônio, TCA, etanol, resinas cromatográficas, equipamentos cromatográficos e de eletroforese. Que métodos você poderia utilizar? Explique o seu princípio e como executá-lo. Que métodos não poderiam ser utilizados?

6.4- Uma solução a 1% de hormônio anti-diurético (nonapeptídio) foi submetida aos tratamentos abaixo

com os seguintes resultados: a) reação **fortemente positiva** para o biureto e **fracamente positiva** para ninhidrina; b) a adição de ácido forte gelado e posterior neutralização do pH, não alteraram os resultados do item anterior; c) Com a adição de ácido forte à quente (100°C por 2 h) e posterior resfriamento e neutralização do pH, a reação da ninhidrina foi positiva (**fortemente positiva**). Interprete e explique estes resultados.

PRÁTICA Nº 4 - CINÉTICA ENZIMÁTICA

1. Introdução

Enzimas são catalisadores biológicos: aceleram a velocidade das reações químicas, diminuindo a energia de ativação. Possuem, em geral, estrutura protéica, sendo que foram descritas algumas moléculas de RNA com atividade catalítica. As enzimas não alteram a constante de equilíbrio nem a variação de energia livre das reações, sendo regeneradas, sob a forma original, ao final da catálise. As moléculas reagentes são denominadas substratos (S) e produtos (P) são formados ao final. As enzimas são, geralmente, bastante específicas com relação aos substratos, formando um complexo com estes durante a catálise:



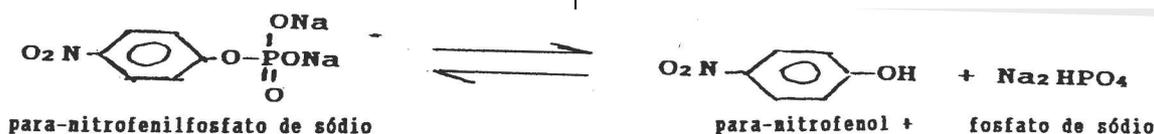
Algumas teorias procuram explicar esta especificidade: 1- teoria de Fischer (“chave-fechadura”), onde enzima e substrato seriam complementares; 2- teoria de Koshland do encaixe induzido, ou seja, o substrato durante a catálise se encaixa na enzima; 3- teoria que propõe o perfeito encaixe no estado de transição, estado onde a barreira energética (energia de ativação) foi vencida.

Diversos são os fatores que influenciam a velocidade de uma reação enzimática. Por terem estrutura protéica, alterações no pH, na temperatura, na força iônica do meio reacional podem modificá-las (às vezes, até a estrutura dos substratos é alterada), modificando, assim, a velocidade das reações. Como esperado, a concentração de substrato e de enzima no

meio reacional são determinantes para a velocidade reacional.

A velocidade de uma reação catalisada pode ser determinada, em instantes iniciais, através da determinação do produto formado por unidade de tempo (caso mais comum) ou através da mensuração do substrato consumido por unidade de tempo. O produto formado pode ser medido diretamente através de alguma propriedade físico-química característica, ou então fazer uma reação química com este produto produzindo um outro que possua propriedades apropriadas para medida. Uma propriedade freqüentemente usada para tal fim é a capacidade do produto a ser quantificado de absorver determinados comprimentos de onda de radiações luminosas (o que não deve, em princípio, acontecer com qualquer outra substância encontrada no meio reacional), aplicando-se os princípios da fotometria.

Os ensaios de atividade enzimática desenvolvidos na aula prática serão realizados com a enzima FOSFATASE, presente no extrato aquoso da batata inglesa. No ensaio, a enzima catalisará a reação de desfosforilação do para-nitrofenil fosfato, resultando na formação de um composto de cor amarelada em meio alcalino, o para-nitrofenol. Portanto, a atividade enzimática será detectada pelo aparecimento da coloração amarela no meio reacional.



2. Objetivos

Avaliar o efeito de alguns fatores que interferem na atividade enzimática, tais como, o tempo de reação, a concentração de substrato e a concentração de enzima.

3. Reagentes

- Uma batata inglesa média (cerca de 110g).
- Substrato: para-nitrofenilfosfato de sódio 1mM (solução fresca).
- NaOH 0,02N.
- Liquidificador.

4. Preparo de fração com atividade de fosfatase alcalina

- Descascar a batata;
- Homogeneizar a batata descascada em 200mL de água, usando um liquidificador;
- Filtrar o homogeneizado em algodão.

- **IMPORTANTE:** O homogeneizado deve ser usado no prazo máximo de 30 minutos.

5. Procedimentos

- Enumerar os tubos de ensaio que seu grupo vai usar;
- Colocar sempre os reagentes na mesma ordem em todos os tubos;
- **O HOMOGENEIZADO DEVERÁ SER ADICIONADA SEMPRE POR ÚLTIMO.**
- Após adicionar o homogeneizado, agite a mistura suavemente;
- A incubação será realizada à temperatura ambiente.

5.1. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO

TUBO	SUBSTRATO (mL)	ÁGUA (mL)	HOMOGENEIZADO (mL)	Tempo após a adição de 2mL de NaOH 0,02N (min)
1	3,0	2,0	0,5*	0
2	3,0	2,0	0,5	2
3	3,0	2,0	0,5	5
4	3,0	2,0	0,5	10
5	3,0	2,0	0,5	20
6	3,0	2,0	0,5	30

*Adicionar 2mL de NaOH 0,02N antes da adição do homogeneizado (SOMENTE NO TUBO 1)

- Observe a cor desenvolvida em todos os tubos.
- Anote os resultados.

5.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

TUBO	SUBSTRATO (mL)	ÁGUA (mL)	HOMOGENEIZADO (mL)
7	3,0	1,0	0,0
8	3,0	0,9	0,1
9	3,0	0,5	0,5
10	3,0	0,0	1,0

- Após **5 minutos** de reação, adicione 2mL de NaOH 0,02N em cada tubo.
- Observe a cor desenvolvida nos tubos (7-10). Anote os resultados.

5.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO. (curva [S] x velocidade da reação)

TUBO	SUBSTRATO μM	SUBSTRATO (mL)	ÁGUA (mL)	HOMOGENEIZADO (mL)
11	0,0	0,0	5,0	0,5
12	54,5	0,3	4,7	0,5
13	163,0	0,9	4,1	0,5
14	272,0	1,5	3,5	0,5
15	545,0	3,0	2,0	0,5
16	909,0	5,0	0,0	0,5

- Após **10 minutos** de reação, adicione 2mL de NaOH 0,02N em cada tubo.
- Observe a cor desenvolvida nos tubos (11-16). Anote os resultados.

6. Questões para discussão:

- 6.1- Por que a enzima (homogeneizado) só deve ser adicionada por último?
- 6.2- Como são fixadas as condições de dosagem de uma determinada enzima em condições ótimas?
- 6.3- Explique os resultados de cada item.

7. Exercícios complementares

7.1- A variação da velocidade de reação de uma enzima em função de sua concentração foi analisada em 5 tubos conforme o indicado na tabela abaixo. Cada tubo recebeu 0,8 mL de uma solução de substrato 0,01mM. A enzima usada (E) estava contida num homogeneizado hepático a 10g% e na tabela abaixo estão indicados os volumes deste homogeneizado adicionado a cada tubo. O volume final em cada tubo foi o mesmo, ajustado com tampão apropriado. Ao final de 30 minutos de reação a quantidade de produto formado foi igual em todos os tubos, exceto no tubo 5 que foi mantido a 0°C durante toda a experiência. Com estas informações, discuta:

- a) o fato de ter sido obtida a mesma quantidade de produto nos quatro primeiros tubos;
- b) sem alterar o tempo de reação, como seria possível aumentar a quantidade de produto formado nesses quatro tubos?
- c) o que teria acontecido no tubo 5?

TUBO	ENZIMA (mL)
1	0,2
2	0,4
3	0,6
4	0,8
5	0,8

7.2 - Ao estudar-se “in vitro” a cinética da reação onde a formação do produto P (fumarato), a partir do substrato S (succinato) é catalisada pela enzima E (succinato desidrogenase) verificou-se que:

- I) não sendo possível obter-se a enzima pura, usou-se, sempre, um mesmo volume do mesmo extrato celular;
- II) a quantidade de substrato inicial estava em ligeiro excesso;
- III) o pH tinha sido previamente estudado e escolheu-se aquele que proporcionava o máximo de atividade enzimática;
- IV) a formação de produto cresceu entre o instante zero (início da reação) até 20 minutos da reação;
- V) a partir do 20^o minuto de incubação, a velocidade de reação medida pela quantidade de produto formado por minuto, diminuiu.
- VI) todas as observações acima foram obtidas em temperatura ótima de reação.

Pede-se: discutir os fatores, dentre aqueles analisados, que poderiam acarretar a diminuição da velocidade a partir do 20^o minuto de incubação.

PRÁTICA Nº 5 – URINÁLISE

1. Introdução

Os rins desempenham suas funções mais importantes ao filtrarem o plasma sanguíneo e removerem as substâncias do filtrado em quantidades variáveis, dependendo das necessidades do corpo. Além disso, eles “depuram” as substâncias indesejáveis do filtrado (e, portanto, do sangue), ao excretá-las na urina, enquanto devolvem ao sangue as substâncias indispensáveis ao metabolismo. A intensidade de excreção de diferentes substâncias na urina representa a soma de três processos renais: filtração glomerular, reabsorção de substâncias dos túbulos renais para o sangue e secreção de substâncias do sangue para os túbulos renais.

A urina normal é essencialmente composta de água, tem coloração variável entre o incolor e o amarelo (dependente da dieta, atividades físicas e principalmente da ingestão de água), e carrega substâncias de excreção, resultantes do metabolismo do organismo. Todo sangue, ao passar pelos rins, é filtrado ou depurado, eliminando seus catabólitos, que são veiculados pela água. Entretanto, podem aparecer na urina elementos anormais, como: albumina, glicose e altas quantidades de corpos cetônicos, sais e pigmentos biliares (urobilinogênio e urobilina). A análise da urina fornece valiosas informações no diagnóstico de doenças renais, das vias urinárias, do trato genital e até de doenças sistêmicas.

Esta prática refere-se a dois dos exames de rotina de urina, através dos quais é possível observar o metabolismo anormal envolvendo algumas substâncias como a glicose e os corpos cetônicos.

Em condições normais, não aparece glicose na urina em quantidade detectável pelos reagentes convencionais, visto que, praticamente, toda a glicose

filtrada é reabsorvida pelos rins. Entretanto, quando a carga filtrada excede a capacidade de reabsorção da glicose, a sua excreção urinária se dá em nível detectável. Um grande aumento da concentração plasmática de glicose, capaz de elevar a carga de filtração renal acima de 320 mg/minuto, ocasiona a excreção do excesso de glicose na urina. A glicose plasmática no indivíduo sadio quase nunca fica elevada o suficiente para causar a sua excreção pela urina. A glicosúria (presença de glicose na urina) pode estar relacionada a várias causas, como, por exemplo: fatores endócrinos, hepáticos, neurológicos e alimentares. No *diabetes mellitus* não-controlado, o nível plasmático de glicose pode atingir valores elevados, com conseqüente excreção urinária desta ose. A presença de glicose na urina pode ser evidenciada através da redução alcalina pelo cobre. Portanto, utiliza-se para a pesquisa de glicose na urina o reagente de Benedict, que consiste de uma solução de sulfato de cobre em um meio alcalino.

Os chamados corpos cetônicos (acetoacetato, ácido β -hidroxibutírico e acetona), quando presentes em níveis elevados na urina, indicam um quadro de jejum severo e prolongado ou *diabetes mellitus* não tratado. Em condições normais, o ácido acetoacético e o ácido β -hidroxibutírico que entram na corrente sanguínea são transportados, tão rapidamente, para os tecidos, que suas concentrações plasmáticas, combinadas, raramente se elevam acima de 3 mg/dL. Os corpos cetônicos são liberados do fígado e transportados até as células. Todavia, as células são limitadas, quanto à quantidade de corpos cetônicos que podem oxidar, devido a várias razões, dentre as quais pode-se destacar a quantidade de oxaloacetato que é necessário para iniciar a oxidação de Acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico. Os corpos cetônicos no sangue e na urina podem atingir níveis

extraordinariamente altos, provocando uma condição conhecida como: cetonemia e cetonúria, respectivamente. A pesquisa de corpos cetônicos na urina é realizada através do reagente de Imbert. Este reagente é de uma solução de nitroprussiato de sódio em ácido acético glacial.

2. Objetivo

Analisar amostras de urina, quanto à presença ou ausência de glicose e de corpos cetônicos.

3. Reagentes

- 8,5 mL de urina.
- 2,5 mL de Reativo de Benedict (CuSO_4 ; citrato de sódio e Na_2CO_3).
- 1 mL de Reativo de Imbert (nitroprussiato de sódio e ácido acético glacial).
- 3 mL de NH_4OH 10% (p/v).

4. Procedimentos

4.1. Pesquisa de Glicose

- colocar 2,5 ml do Reativo de Benedict em um tubo de ensaio;
- depositar 4 gotas de urina límpida;
- misturar e levar ao banho-maria até entrar em ebulição;
- deixar esfriar espontaneamente (aproximadamente 15 minutos);
- observar a coloração do líquido.

RESULTADOS	
cor inalterada (azul)	negativo
verde-azulado ou verde	traços

verde (qualquer tom) com precipitado amarelo	positivo +
castanho ou marrom	positivo ++
vermelho tijolo	positivo +++

4.2. Pesquisa de Corpos Cetônicos

- colocar 8 ml de urina em um tubo de ensaio;
- adicionar 12 gotas do Reativo de Imbert e misturar;
- inclinar o tubo e com o auxílio de uma pipeta, deixar escorrer pelas paredes do tubo aproximadamente 3 ml de NH_4OH 10%, lentamente, de tal maneira que os dois líquidos não se misturem;
- observar a superfície de contato entre os dois líquidos.

RESULTADOS	
Nenhuma alteração ocorrida	negativo
Presença de um anel violeta	positivo

5- Questões para Discussão

5.1- Comente (sucintamente) a participação dos hormônios: adrenalina, cortisol, glucagon e insulina no controle da glicemia, envolvendo as vias metabólicas e os seus mecanismos de ação.

5.2- Por que em condições de jejum severo e prolongado ou o diabetes melito não compensado pode acarretar uma cetonemia e conseqüente cetonúria?

5.3- Conceitue e diferencie (metabolicamente): “*diabetes insipidus*” e “*diabetes mellitus*” e “*diabetes renallis*”.

PRÁTICA Nº 6 - ISOLAMENTO DE DNA DE CÉLULAS DE CEBOLA

1. Introdução

Nos organismos eucariontes e procariontes a informação genética está localizada nas moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA), que são polímeros de nucleotídeos, nos quais o açúcar é a desoxirribose. O DNA está localizado principalmente no núcleo dos eucariontes, associado com proteínas (principalmente histonas) e dentro de organelas como mitocôndrias e cloroplastos.

Os métodos utilizados para a detecção e dosagem do DNA celular nuclear de eucariontes (pois o de cloroplastos e mitocôndrias não é em geral, detectado pelas técnicas rotineiras) implicam no rompimento das membranas citoplasmática e nuclear. Neste experimento, o rompimento das membranas plasmática e nuclear será realizado com o tratamento do detergente aniônico duodecil sulfato de sódio (SDS). Os tratamentos com detergentes, iônicos ou não, são largamente utilizados na solubilização de proteínas e lipídeos de membrana. Nestes processos de solubilização por detergentes, são formadas micelas, que consistem de proteínas, lipídios e detergentes. O tratamento das células com uma concentração relativamente alta de SDS resulta no rompimento das membranas celulares com a conseqüente liberação das nucleoproteínas. A atividade da enzima digestiva (DNAase) será inibida pela ação do EDTA em meio alcalino – que altera pH e quebra os íons divalentes necessários à ação da DNAase. A adição de etanol sobre a fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos dissolvidos, resultará na precipitação destes, uma vez que o etanol diminui a constante dielétrica da água, promovendo uma menor solubilização das moléculas de DNA.

Nas técnicas de biologia molecular, o DNA deve estar livre de proteínas, para isto, estas devem ser extraídas. Normalmente, esse procedimento é realizado

utilizando-se uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico, que desnatura as proteínas e, após centrifugação, estas são retiradas da solução de DNA.

2. Objetivo

Isolar DNA de células de cebola.

3. Material

- Cebola.
- Solução salina-EDTA:
NaCl 0,15 M
EDTA 0,1 M (pH=8,0).
- SDS 2% (P/V).
- Etanol absoluto 95%.
- Solução Tris-EDTA (TE)*
10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA - pH 7,5.

Obs:

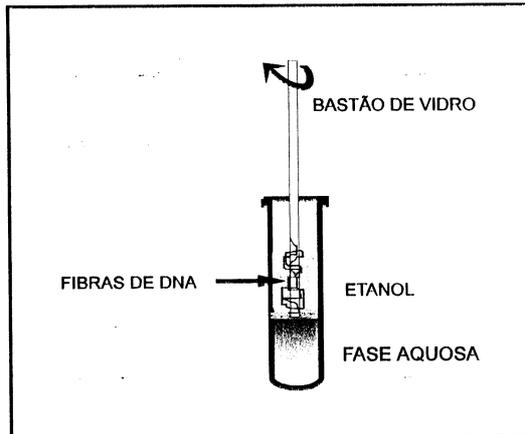
*Esta solução mantém a força iônica, dissolvendo o DNA, além de quelar íons divalentes, necessários para a ação da DNase.

4. Procedimentos

- Cortar 5 g de cebola (fatia fina e bem picotada);
- Colocar a cebola picada em um tubo Falcon de 15 mL;
- Adicionar 2.5 mL de solução salina EDTA;
- Adicionar 1.0 mL de SDS 2%;
- Macerar a cebola com ajuda de um bastão de vidro durante 5 minutos;
- Filtrar a solução com gaze para retirar os fragmentos de cebola;
- Colocar o filtrado em um tubo de vidro;
- Adicionar, lentamente, com pipeta, 4 mL de álcool etílico 95% de modo que os dois líquidos não se

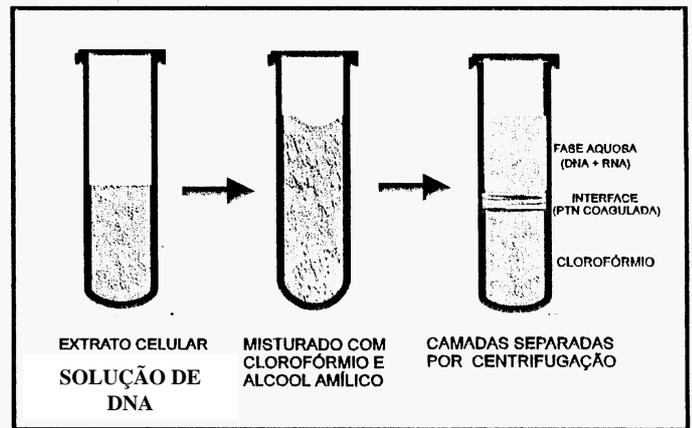
misturem. Notar que na interface, forma-se um material insolúvel filamentososo, o DNA;

- Introduzir um bastão até a região de interface. Imprimir-lhe um movimento circular e verificar que o material filamentososo irá aderir ao mesmo;
- Retirar o bastão e dissolver o precipitado a ele aderido em 2 mL da solução de Tris-EDTA.



Desproteinização – (Não realizada durante a aula prática):

- Após a dissolução do DNA, adicione igual volume (2 mL) da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (V/V), e agite vigorosamente por 30 minutos;
- Centrifugue a emulsão resultante a 3000 rpm durante 10 minutos;
- A emulsão será separada em 3 camadas;



- A camada superior (aquosa) contém os dois tipos de ácidos nucleicos (DNA e RNA) que devem ser coletados para posterior utilização.

5. Questões para discussão:

5.1 - Qual a função da solução de SDS?

5.2 - Ao romper a célula e, também, suas organelas, pela técnica descrita acima, o DNA não seria degradado por enzimas lisossomais?